UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

ANDREZA BORBA DA SILVA

Efeito de temperaturas termofílica e hipertermofílica na produção de hidrogênio e 1,3propanodiol a partir de vinhaça de cana-de-açúcar e glicerol bruto como cossubstratos em reatores anaeróbios de leito fluidificado.

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos 2021

ANDREZA BORBA DA SILVA

Efeito de temperaturas termofílica e hipertermofílica na produção de hidrogênio e 1,3propanodiol a partir de vinhaça de cana-de-açúcar e glicerol bruto como cossubstratos em reatores anaeróbios de leito fluidificado.

> Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências: Engenharia Hidráulica e Saneamento

Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Silva

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues Fontes da EESC/USP com os dados inseridos pelo(a) autor(a).

Borba da Silva, Andreza Efeito de temperaturas termofilica e hipertermofilica na produção de hidrogênio e 1,3-propanodiol a partir de vinhaça de cana-de-açúcar e glicerol bruto como cossubstratos em reatores anaeróbios de leito fluidificado. / Andreza Borba da Silva; orientador Edson Luiz Silva. São Carlos, 2021. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento e Área de Concentração em Hidráulica e Saneamento --Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2021.

Digestão anaeróbia. 2. Biohidrogênio. 3.
 Metabólitos solúveis. 4. Biocombustível. I. Título.

Eduardo Graziosi Silva - CRB - 8/8907

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Bacharela ANDREZA BORBA DA SILVA,

Título da dissertação: "Efeito de temperaturas termofilica e hipertermofilica na produção de hidrogênio e 1,3-ppertermofilica na produção de hidrogênio e 1,3-propanodiol a partir de vinhaça de cana-de-açúcar e glicerol bruto com cossubstratos em reatores anaeróbios de leito fluidificado".

Data da defesa: 07/04/2021.

Comissão Julgadora

Resultado

movada

Prof. Titular **Edson Luiz Silva** (Orientador) (Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

Prof. Dr. Marcelo Loureiro García (Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/UNESP – Rio Claro)

Prof. Dr. Wu Hong Kwong (Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

Amorada

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento: Prof. Dr. Eduardo Mario Mendiondo

Presidente da Comissão de Pós-Graduação: Prof. Titular **Murilo Araujo Romero**

À minha avó Lídia e aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo seu amor e por me permitir ultrapassar todos os obstáculos encontrados ao longo da realização deste trabalho.

Agradeço aos meus pais e avós, por todo apoio, amor incondicional e pelos princípios que hoje prezo.

À minha família por todo incentivo e apoio.

Ao meu orientador Dr. Edson Luiz Silva pelas orientações, ensinamentos e pelo comprometimento com este trabalho.

Ao meu parceiro de mestrado e da vida, Gabriel Guedes, por ser o meu ponto de paz e por enfrentar todos os obstáculos da vida ao meu lado. Você foi o melhor presente do mestrado.

À Escola de Engenharia de São Carlos (USP) e ao Departamento de Engenharia Química (UFSCar) pelo suporte ao desenvolvimento dessa pesquisa.

À Prof. Dra. Sandra Santaella, minha referência de profissional. Obrigada por todas as oportunidades e ensinamentos.

Aos colegas do LCAII/DEQ/UFSCar, Alexandre, Camila, Lucas, Schayanna, Priscilla e Lívia. À Schayanna pela leveza e alegria. À Priscila pela sua doçura e por estar sempre disposta a ajudar. Ao Alexandre, parceiro de longas datas, obrigada pela parceria e amizade. Ao Lucas por toda paciência, pelos conselhos e ensinamentos ao longo dessa jornada. Em especial, a Camila, pelo companheirismo, os ensinamentos, as caronas e as risadas.

Agradeço a Ana Paula e a Priscila, que tornaram essa jornada mais leve e feliz. Obrigada por tudo.

Aos meus queridos colegas de turma (André, Heitor e Alexandre) por todos os momentos de parceria e boas risadas.

À banca examinadora, por aceitarem o convite e pelas importantes contribuições.

Agradeço as minhas amigas Cássia Liliane, Amanda Brandão, Iana Letícia e Thayná Alves, que mesmo distantes fisicamente se fizeram presentes.

"Todas as vitórias ocultam uma abdicação".

Simone de Beavoir

RESUMO

SILVA, A. B. Efeito de temperaturas termofílica e hipertermofílica na produção de hidrogênio e 1,3-propanodiol a partir de vinhaça de cana-de-açúcar e glicerol bruto como cossubstratos em reatores anaeróbios de leito fluidificado. 2021. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2021.

A produção de H₂ e intermediários químicos por processos fermentativos é uma linha de pesquisa atual e pode representar uma alternativa para o setor sucroenergético e para a indústria de biodiesel, possibilitando melhorias na eficiência produtiva e energética dos processos. Nesse sentido, o objetivo principal deste trabalho foi investigar a produção de H₂ e 1,3-Proponodiol (1,3-PDO) pela estratégia de codigestão de vinhaça de cana-de-açúcar e glicerol, em reatores anaeróbios de leito fluidificado (RALF), sob condições termofílicas e hipertermofílicas (55, 60 e 65°C). Neste estudo, foram utilizados três reatores, com concentração afluente fixa (10 g DQO.L⁻¹), contudo com proporções previamente estabelecidas para cada reator (RALF 1: 75% DQO vinhaça + 25% DQO glicerol; RALF 2: 50% DQO vinhaça + 50% DQO glicerol; RALF 3: 25% DQO vinhaça + 75% DQO glicerol). As fases de operação dos reatores foram estabelecidas em função do aumento da temperatura na faixa termofilica e hipertermofílica (55, 60 e 65°C). Os maiores valores de produção volumétrica de H₂ (PVH) registrados no presente trabalho foram obtidos no RALF 1 (75% DQO vinhaça + 25% DQO glicerol), com PVH máxima de 2,92 \pm 0,45 L.h⁻¹ L⁻¹ e rendimento de H₂ (HY) de 0,74 mmol H₂ g DQO_{adicionada}⁻¹. Os valores máximos relacionados a PVH foram obtidos nas temperaturas de 55°C para os RALFs 1 e 2. No RALF 3 a PVH máxima e o HY foram registrados na temperatura de 60°C. É pertinente sugerir que durante a 3° fase (65°C) dos RALFs 1, 2 e 3 ocorreu síntese de células, visto que em maiores temperaturas o crescimento celular líquido é menor e a produção celular necessita compensar essa perda. O mesmo foi observado na 2° fase (60°C) do RALF 2. A elevada temperatura pode ter causado alterações no metabolismo dos microrganismos, implicando prejuízo a PVH. Quanto à produção de 1,3 propanodiol (PV 1,3-PDO), os maiores valores foram observados no RALF 2 (50% DQO vinhaça + 50% DQO glicerol), com PV 1,3-PDO de 0,41 \pm 0,11 g.L⁻¹ h⁻¹ e rendimento de 1,3-PDO (1,3-PDOY) de 0,89 \pm 0,26 mol 1,3 PDO.mol⁻¹ glicerol_{consumido}. Notou-se que a temperatura de 65°C não implicou prejuízo na produção de 1,3-PDO, no RALF 2, visto que os valores de PV 1,3-PDO e 1,3-PDOY mantiveram-se estáveis. Contudo, foi observado decréscimo nos valores de PV 1,3-PDO e 1,3-PDOY nos RALFs 1 e 3, durante a 3° fase experimental (65°C), indicando que, assim como na produção de H₂, o aumento da temperatura exerceu influência negativa na produção de 1,3-PDO.

Palavras-chave: Digestão anaeróbia. Biohidrogênio. Metabólitos solúveis. Biocombustível.

ABSTRACT

SILVA, A. B. Effect of thermophilic and hyperthermophilic temperatures on hydrogen and 1,3propanodiol production from sugarcane vinasse and raw glycerol as co-substrates in anaerobic fluidized bed reactors. 2021. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2021.

The production of H₂ and chemical intermediates by fermentative processes is a current research line and may represent an alternative for the sugar-energy sector and for the biodiesel industry, enabling improvements in the production and energy efficiency of the processes. In this sense, the main objective of this work was to investigate the production of H₂ and 1,3-Proponodiol (1,3-PDO) by the codigestion strategy of sugarcane and glycerol vinasse, in anaerobic fluidized bed reactors (RALF), under thermophilic and hyperthermophilic conditions (55, 60 and 65°C). In this study, three reactors were used, with fixed affluent concentration (10 g COD.L⁻¹), however with proportions previously established for each reactor (RALF 1: 75% COD vinasse + 25% COD glycerol; RALF 2: 50% COD vinasse + 50% COD glycerol; RALF 3: 25% COD vinasse + 75% COD glycerol). The operating phases of the reactors were established due to the increase in temperature in the thermophilic and hyperthermophilic range (55, 60 and 65°C). The highest values of volumetric production of H₂ (HPR) recorded in the present work were obtained in RALF 1 (75% COD vinasse + 25% COD glycerol), with maximum HPR of $2.92 \pm$ 0.45 Lh⁻¹ L⁻¹ and H₂ yield (HY) of 0.74 mmol H₂ g added DQO⁻¹. The maximum values related to HPR were obtained at temperatures of 55°C for RALFs 1 and 2. In RALF 3 the maximum HPR and HY were recorded at a temperature of 60°C. It is pertinent to suggest that during the 3rd phase (65°C) of RALFs 1, 2 and 3, cell synthesis occurred, since at higher temperatures the liquid cell growth is lower and cell production needs to compensate for this loss. The same was observed in the 2nd phase (60°C) of RALF 2. The high temperature may have caused changes in the metabolism of microorganisms, causing damage to HPR. As for the production of 1.3 propanediol (PV 1.3-PDO), the highest values were observed in RALF 2 (50% COD vinasse + 50% COD glycerol), with PV 1.3-PDO 0.41 ± 0 , 11 g L⁻¹ h⁻¹ and yield of 1,3-PDO (1,3-PDOY) of 0.89 ± 0.26 mol 1.3 PDO.mol⁻¹ glycerol consumed. It was noted that the temperature of 65°C did not affect the production of 1,3-PDO, in RALF 2, since the PV values 1,3-PDO and 1,3-PDOY remained stable. However, a decrease in the values of PV 1,3-PDO and 1,3-PDOY was observed in RALFs 1 and 3, during the 3rd experimental phase (65°C), indicating that, as in the production of H_2 , the increase temperature had a negative influence on the production of 1,3-PDO.

Keywords: Anaerobic digestion. Biohydrogen. Soluble metabolites. Biofuel

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 29 - Produção volumétrica de H2 no RALF 2.	118
Figura 30 - Produção volumétrica de H ₂ no RALF 3	119
Figura 31- Produção volumétrica de hidrogênio nos RALFs	120
Figura 32- Rendimento de H ₂ no RALF 1	122
Figura 33- Rendimento de H ₂ no RALF 2	123
Figura 34- Rendimento de H ₂ no RALF 3	123
Figura 35- Rendimentos de hidrogênio nos RALFs	124
Figura 36 - Concentrações de metabólitos solúveis produzidos no RALF 1 e	em função da
temperatura	131
Figura 37 - Fração molar dos principais metabólitos produzidos no RALF 1	131
Figura 38- Razão HBu/HAc e o HY ao longo da operação do RALF 1	135
Figura 39- Concentrações de metabólitos solúveis produzidos no RALF 2 e	m função da
temperatura	137
Figura 40- Fração molar dos principais metabólitos produzidos no RALF 2	138
Figura 41- Razão HBu/HAc e o HY ao longo da operação do RALF 2	
Figura 42 - Concentrações de metabólitos solúveis produzidos no RALF 3 e	em função da
temperatura	
Figura 43- Porcentagem molar dos principais metabólitos produzidos no RALF 3	3143
Figura 44 - Razão HBu/HAc e o HY ao longo da operação do RALF 3	144
Figura 45 - Relação entre HY e 1,3-PDOY no RALF 1	147
Figura 46 - Relação entre HY e 1,3-PDOY no RALF 2	
Figura 47- Relação entre HY e 1,3-PDOY no RALF 3.	

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Processamento da cana-de-açúcar para produção de etanol
Tabela 2- Características físico-químicas de vinhaças de cana-de-açúcar. 39
Tabela 3- Metais pesados encontrados na vinhaça da cana-de-açúcar
Tabela 4- Capacidade normal e produção de biodiesel, por região, no Brasil (2017)43
Tabela 5- Matéria-prima utilizada para produção de biodiesel, no Brasil (m3)44
Tabela 6- Propriedades físico-químicas do glicerol. 46
Tabela 7 - Estequiometria e variação da energia livre de Gibbs ($\Delta G0$) das reações de
acidogênese, acetogênese e metanogênese
Tabela 8 - Principais ácidos orgânicos produzidos pela fermentação, valores aproximados no
mercado e possíveis aplicações55
Tabela 9- Produtos com valor agregado, produzidos a partir do glicerol, e as suas aplicações.
Tabela 10- Produção de H_2 utilizando o processo de fermentação escura a partir da vinhaça. 62
Tabela 11- Produção fermentativa de hidrogênio a partir do glicerol65
Tabela 12- Estudos realizados na faixa mesofílica para produção de H ₂ 78
Tabela 13- Estudos realizados na faixa termofílica e hipertermofílica para produção de H_2 79
Tabela 14- Características físico-químicas da vinhaça de cana-de-açúcar
Tabela 15- Especificações técnicas do glicerol. 88
Tabela 16- Soluções de nutrientes adicionada à alimentação
Tabela 17- Características físicas do material suporte. 90
Tabela 18- Análises realizadas em amostras afluentes e efluentes dos RALFs
Tabela 19- Concentrações e conversões médias de carboidrato nos reatores. 99
Tabela 20- Concentrações e conversões médias de glicerol nos reatores
Tabela 21- Concentrações afluente e efluente e remoções médias de DQO nos reatores109
Tabela 22- Valores médios de pH afluente e efluente dos reatores112
Tabela 23- Valores médios de SST, SSV e SSF no efluente dos reatores
Tabela 24- Comparação do desempenho do RALF 1, 2 e 3, em relação a trabalhos reportados
na literatura, a partir da vinhaça e glicerol, sob condições termofílicas e hipertermofílicas,
visando a produção de H ₂ 126
Tabela 25- Concentrações (g.L ⁻¹) e frações molares (%) dos metabólitos detectados durante a
operação dos RALFs

Tabela 26 - Produção volumétrica e rendimento de 1,3-PDO obtidos nos RALFs, nas diferentes
temperaturas
Tabela 27- Comparação do desempenho na produção de 1,3 PDO entre os trabalhos reportados
na literatura e o presente estudo151
Tabela 28- DQO equivalentes utilizadas nos cálculos dos balanços de massa 154
Tabela 29- Balanço de massa da fração solúvel em relação à DQO total efluente do RALF 1.
Tabela 30- Balanço de massa da fração solúvel em relação à DQO total efluente do RALF 2.
Tabela 31- Balanço de massa da fração solúvel em relação à DQO total efluente do RALF 3.

LISTA DE ABREVIAÇÕES E SIGLAS

ABR	Reator anaeróbio compartimentado (Anaerobic baffled reactor)
AGCL	Ácidos graxos de cadeia longa
AGV	Ácidos orgânicos voláteis
Aneel	Agência Nacional de Energia Elétrica
ANP	Agência Nacional de Petróleo
AnSBBR	Bateladas sequenciais (Anaerobic sequencing batch biofilm reactor)
APBR	Reator anaeróbio de leito empacotado (Anaerobic packed-bed reactor)
APHA	American Public Health Association
ASBR	Bateladas sequenciais (Anaerobic sequencing batch reactor)
BuOH	Butanol
Ca	Cálcio
CH ₄	Metano
CNPE	Conselho Nacional de Política Energética
CO_2	Dióxido de carbono
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
CSTR	Reator tanque agitado contínuo (Continuous Stirred-Tank Reactor)
DQO	Demanda química de oxigênio
EGSB	Reator anaeróbio de leito granular expandido (Expanded granular slugde bed)
EPE	Empresa de Pesquisa Energética
Eq.	Equação
EtOH	Etanol
EUA	Estados Unidos
H_2	Hidrogênio
H ₂ O	Água
H_2SO_4	Ácido sulfúrico
HAc	Ácido acético
HBu	Ácido butírico
НСа	Ácido capróico
HCl	Ácido clorídrico
HIsoBu	Ácido isobutírico
HLa	Ácido lático

HPLC	Cromatografia líquida (High Performance Liquid Cromatography)
HPr	Ácido propiônico
HSu	Ácido succínico
HVa	Ácido valérico
HY	Rendimento de hidrogênio (Hydrogen Yield)
INPM	Instituto Nacional de Pesos e Medidas
Κ	Potássio
М	Molar
MetOH	Metanol
Mg	Magnésio
Ν	Nitrogênio
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
pH	potencial Hidrogeniônico
Proálcool	Programa Nacional do Álcool
PVH	Produção volumétrica de hidrogênio
RALF	Reator Anaeróbio de Leito Fluidificado
SST	Sólidos suspensos totais
SSV	Sólidos suspensos voláteis
STV	Sólidos totais voláteis
TCO	Taxa de carregamento orgânico
TDH	Tempo de detenção hidráulica
UASB	Reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (Upflow Anaerobic Sludge Blanket)
Vmf	Velocidade de mínima fluidificação
Y1,3-PDO	Rendimento de produção de 1,3-propanodiol
1,3-PDO	1,3-Propanodiol
$%H_2$	Percentual de hidrogênio

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

Н	Produção acumulada de H ₂
KJ	Quilojoule
m.v ⁻¹	Massa por volume
Mg	Miligrama
Ml	Mililítro
°C	Grau celsius
v.v ⁻¹	Volume por volume
%	Por cento
±	Mais ou menos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
2	OBJETIVOS	31
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	33
3.1	BIOCOMBUSTÍVEIS: ETANOL E BIODIESEL	33
3.1.1	Processamento Industrial da Cana de Açúcar e a Vinhaça como Subproduto .	34
3.1.2	Setor de Biodiesel no Brasil e o Glicerol como Subproduto	40
3.2	HIDROGÊNIO: UTILIZAÇÃO, OBSTÁCULOS E PERSPECTIVAS FUTURAS	47
3.3	PRODUÇÃO BIOLÓGICA DE HIDROGÊNIO VIA PROCESSO	OS
FERME	NTATIVOS	49
3.3.1	Fermentação de Carboidratos	52
3.3.2	Fermentação do Glicerol	55
3.3.3	Resíduos Utilizados na Produção de Hidrogênio	59
3.4	CODIGESTÃO	66
3.5	FATORES QUE AFETAM A PRODUÇÃO FERMENTATIVA DE HIDROGÊN	Ю
	69	
3.5.1	Inóculo	69
3.5.2	Potencial Hidrogeniônico (pH)	70
3.5.3	Reator Anaeróbio de Leito Fluidificado	71
3.5.1	Temperatura	74
3.6	CONSIDERAÇÕES PRELIMINARES	83
4	MATERIAL E MÉTODOS	85
4.1	REATOR ANAERÓBIO DE LEITO FLUIDIFICADO	85
4.2	SUBSTRATOS E MEIO NUTRICIONAL	87
4.3	INÓCULO E MATERIAL SUPORTE	89
4.4	PROCEDIMENTO DE PARTIDA DOS REATORES	90
4.5	CONDIÇÕES OPERACIONAIS	93
4.6	MÉTODOS ANALÍTICOS	94
4.6.1	Análises Físico-Químicas	95
4.6.2	Determinação de Carboidratos	95
4.6.3	Determinação da Concentração de Glicerol	95
4.6.4	Determinação da Produção e Composição do Biogás	95

4.6.5	Análise de Metabólitos Solúveis	96
4.6.6	Frequência das Análises	96
4.7	CÁLCULO DOS PRINCIPAIS INDICADORES DE DESEMPENHO	97
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	99
5.1	CONVERSÃO DE CARBOIDRATOS	99
5.2	CONSUMO DE GLICEROL 1	03
5.3	PARÂMETROS DE CONTROLE DOS SISTEMAS ACIDOGÊNICOS 1	09
5.3.1	Demanda Química de Oxigênio1	109
5.3.2	Influência do pH 1	11
5.3.3	Sólidos Suspensos1	12
5.4	DESEMPENHO DOS RALFS NA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO 1	14
5.4.1	Percentual de Hidrogênio1	14
5.4.2	Produção Volumétrica de Hidrogênio1	17
5.4.3	Rendimento de Hidrogênio1	21
5.5	AVALIAÇÃO DOS PRODUTOS INTERMEDIÁRIOS DA FERMENTAÇÃO . 1	29
5.5.1	Metabólitos solúveis detectados durante a operação do RALF 1 1	130
5.5.2	Metabólitos solúveis detectados durante a operação do RALF 2 1	136
5.5.3	Metabólitos solúveis detectados durante a operação do RALF 3 1	41
5.5.4	Produção Volumétrica e Rendimento de 1,3-Propanodiol1	46
5.6	BALANÇO DE MASSA 1	153
6	CONCLUSÕES 1	158

1 INTRODUÇÃO

A criação do Programa Nacional do Álcool (Proálcool), em 1975, estabeleceu a canade-açúcar como uma das fontes mais importantes do país para a geração de energia através da biomassa. Apesar de tratar-se de uma fonte de energia limpa, o setor sucroalcooleiro gera grandes volumes de águas residuárias, especialmente a vinhaça, podendo causar problemas ambientais com a destinação inadequada desse subproduto (MORAES et al., 2015).

No Brasil, a vinhaça é comumente aplicada no solo como fertilizante para a cultura de cana de açúcar, devido aos seus altos níveis de matéria orgânica e nutrientes (NASPOLINI et al., 2017), porém a disposição da vinhaça no solo pode gerar impactos negativos a longo prazo, como o acúmulo de nutrientes no solo, incluindo salinização e fertilização excessiva do mesmo, aumentando a instabilidade do solo e eutrofização dos corpos d'água (FUESS e GARCIA, 2014). Nesse contexto, baseando-se na expressividade da produção brasileira de etanol, visto que o país ocupa o 2° lugar entre os maiores produtores mundiais (Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), 2019), é imprescindível a aplicação de tecnologias que possibilitem um adequado reúso da vinhaça.

Assim como o etanol, o biodiesel é uma alternativa ecológica de combustível para veículos, visto que é biodegradável, não é tóxico, possui baixos índices de emissões de poluentes, e pode ser produzido por materiais renováveis e de baixo custo. A transesterificação de ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) é o método mais utilizado no Brasil para a produção de biodiesel, no qual o óleo (triglicerídeo) reage com um álcool simples (metanol ou etanol), formando o biodiesel como produto principal e o glicerol como subproduto (CHEN et al., 2007).

O glicerol é utilizado como matéria-prima para fabricação de produtos de higiene e nas indústrias alimentícia e farmacêutica, porém o mercado atual não é suficiente para consumir a elevada produção dessa substância. Com o intuito de evitar futuros problemas derivados da acumulação de glicerol e para tornar a produção de biodiesel mais competitiva, torna-se necessário buscar alternativas para utilização desse subproduto, de modo a estabilizar o preço e a oferta do biodiesel e do seu subproduto (LEONETI et al., 2012).

Os avanços científicos e tecnológicos proporcionam desenvolvimento de estudos voltados à recuperação de energia e produtos, através de tratamentos biológicos. A digestão anaeróbia pode ser uma alternativa para a disposição desses subprodutos, minimizando o impacto ambiental causado por estes no meio ambiente (MORAES et al., 2015). A técnica chamada codigestão anaeróbia pode promover a digestão simultânea de dois ou mais substratos com características complementares. Esta técnica pode elevar a eficiência do sistema e potencializar a produção de biogás e produtos de valor agregado (ANJUM et al., 2017). Além disso, pode melhorar a estabilização do processo, o equilíbrio de nutrientes, os efeitos sinérgicos de microrganismos, a redução das emissões de gases de efeito estufa e os custos de processamento (HENARD et al., 2017). Entretanto, para uma codigestão eficiente, a seleção de cossubstratos e a utilização de proporções adequadas na mistura é imprescindível, visto que ambos interferem diretamente na estabilidade do processo (YAO et al., 2014).

Dentre os resíduos agroindustriais que podem ser utilizados na digestão anaeróbia, a vinhaça se destaca como um dos mais problemáticos devido a presença de compostos orgânicos recalcitrantes, como os fenóis, que podem causar instabilidade no processo (PANT; ADHOLEYA, 2007; SILES et al., 2011; LAZARO et. al., 2014; FUESS; GARCIA, 2015; LOVATO; RATUSZNEI; RODRIGUES, 2015; RAMOS; SILVA, 2020). Uma alternativa para a digestão anaeróbia de vinhaça de cana-de-açúcar é a adição de um cossubstrato. O glicerol, subproduto da indústria do biodiesel, pode ser utilizado como cossubstrato, visto que possui pH adequado para processos anaeróbios, boa capacidade tampão (RIVERO; SOLERA; PEREZ, 2014), pode ser facilmente armazenado dentro da planta industrial, pois possui propriedades físico-químicas adequadas para armazenamento (incolor, inodoro, líquido não tóxico e não explosivo (LOVATO; RATUSZNEI; RODRIGUES, 2015). Assim como a vinhaça de cana-de-açúcar, o glicerol é produzido em grandes quantidades. Não há uma destinação adequada para estes subprodutos, portanto a codigestão de ambos pode ser atrativa.

O gás hidrogênio (H₂), produzido a partir da digestão anaeróbia, é uma possibilidade promissora de combustível alternativo, considerada renovável e ecologicamente correta, visto que possui poder calorífico elevado (122 kJ g⁻¹) e não produz substâncias poluidoras em seu processo de combustão (DAS e VEZIROGLU, 2001). Além disso, ao utilizar o glicerol como substrato, a produção de H₂ geralmente é acompanhada pela formação de outros produtos, devido à complexidade metabólica da fermentação do glicerol, como o 1,3-Propanodiol (1,3-PDO), que vem se destacando como importante intermediário para a síntese de compostos cíclicos (benzeno, naftaleno, porfirina, entre outros) e monômeros para poliésteres, poliuretanos e polipropileno tereftalato (PAJUELO et al., 2004).

Alguns parâmetros influenciam o processo de digestão anaeróbia, dentre eles a temperatura, visto que a mesma interfere nas taxas de crescimento e nas rotas metabólicas preferenciais aos microrganismos. Levando em consideração a utilização de cultura mista, o aumento da temperatura eleva as reações químicas e enzimáticas nas células de alguns microrganismos, até determinada faixa de temperatura. Apesar da temperatura termofílica não

ser preferível do ponto de vista econômico, visto que a energia necessária para cultivar e manter a com unidade termofílica é aproximadamente 2,5 vezes maior que a comunidade mesofílica (RAJ et al., 2012), no tratamento de águas residuárias despejadas em altas temperaturas, como o glicerol bruto (70°C) (COSTA, 2017) e a vinhaça de cana-de-açúcar (90 °C) (FUESS et al., 2016; NOVA CANA, 2017), a energia necessária para manter o sistema diminui consideravelmente, o que pode diminuir os custos da planta de tratamento e valorizar a cadeia produtiva do biodiesel e etanol. Há poucos trabalhos reportados na literatura de referência avaliando o efeito da faixa termofílica e hipertermofílica na produção de H₂, quando comparada com a quantidade de estudos na literatura em faixa mesofílica.

Estudos avaliando a influência de diferentes proporções de vinhaça e glicerol na codigestão de ambos, ainda não foram relatados na literatura de referência. Assim como o estudo do efeito da variação de temperatura nas faixas termofílicas e hipertermofílica na codigestão de vinhaça de cana-de-açúcar e glicerol, em reator anaeróbio de leito fluidificado (RALF). Nesse contexto, o presente estudo apresenta o seu diferencial no processo contínuo de produção fermentativa de H₂ e 1,3-PDO, sob condições termofílicas e hipertermofílicas (55, 60 e 65° C) e cultura mista, em três RALFs alimentados com vinhaça de cana-de-açúcar e glicerol bruto, a partir de diferentes proporções.

O objetivo principal deste trabalho foi investigar a produção de H_2 e 1,3-PDO pela estratégia de codigestão de vinhaça de cana-de-açúcar e glicerol, em reatores anaeróbios de leito fluidificado.

Visando alcançar o objetivo geral, os objetivos específicos propostos foram:

- Avaliar o efeito de diferentes proporções de vinhaça de cana-de-açúcar e glicerol, com concentração afluente de substratos fixa em 10 g DQO.L⁻¹, na produção de H₂ e 1,3-PDO.
- ii. Analisar o efeito da temperatura na faixa termofílica e hipertermofílica (55, 60 e 65°C)
 na produção de H₂ e 1,3-PDO.
- iii. Comparar a produção de metabólitos solúveis, nas diferentes proporções de substratos e temperaturas utilizadas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Visando a contextualização e embasamento deste estudo, o presente capítulo contém uma abordagem sobre a matriz energética, a evolução da indústria sucroalcooleira no Brasil, com ênfase na vinhaça de cana-de-açúcar, subproduto proveniente da destilação do etanol, além da produção de biodiesel, levando em consideração a produção de glicerol como subproduto. E por fim, como esses subprodutos podem ser aplicados na digestão anaeróbia para a produção de H_2 , a fim de embasar a discussão e realizar comparações dos estudos da literatura de referência com os resultados obtidos neste trabalho.

3.1 BIOCOMBUSTÍVEIS: ETANOL E BIODIESEL

A evolução da sociedade foi associada ao uso de fontes de combustíveis para suprimento de suas necessidades energéticas. As tecnologias empregadas ao longo do tempo evoluíram desde madeira, gordura animal e carvão até o petróleo, gás natural e outras fontes de combustíveis fósseis e, mais recentemente, fontes renováveis. Fatores como limitação da oferta de combustíveis fósseis e poluição ambiental constante chamam a atenção global para o aumento de fonte energéticas sustentáveis que possam garantir esse suprimento no futuro (WANG et al., 2013; TAVARES; FERREIRA; COELHO, 2015; SARMA et al., 2015; REN et al., 2016).

De acordo com a Agência Nacional de Energia Elétrica (ANEEL) (2019), 75% da energia gerada no Brasil é proveniente de fontes renováveis, de modo que a energia solar é responsável por 1,5%, a energia eólica por 9%, e com 64% as hidrelétricas correspondem a principal força. Contudo, a geração de energia a partir de fontes renováveis alternativas representa menos de 20% da sua capacidade total. O baixo percentual demonstra que há muitos recursos a serem explorados para a produção de energia elétrica. Assim, o foco da evolução tecnológica de novas fontes de combustíveis deve se dirigir para a exploração de alternativas renováveis, associadas à viabilidade econômica e eficiência energética.

Os biocombustíveis são produzidos a partir de biomassa renovável e podem substituir, parcial ou totalmente, combustíveis derivados de petróleo e gás natural, diante disso estão conquistando espaço no mercado energético e nas pesquisas científicas (TAVARES; FERREIRA; COELHO, 2015). A Política Nacional de Biocombustíveis (RenovaBio), instituída pela Lei n°13.576, de 26 de dezembro de 2017, tem como objetivo estimular o aumento da produção de biocombustíveis em padrões sustentáveis. As principais metas relacionadas aos biocombustíveis a serem alcançadas até 2030 são: redução de 43% das

emissões de gases de efeito estufa, participação de 45% de energias renováveis e de 18% da bionergia na matriz energética (BRASIL, 2017).

No Brasil, os dois principais biocombustíveis utilizados são o etanol, obtido a partir de cana-de-açúcar e, em escala crescente, o biodiesel, que é produzido a partir de óleos vegetais ou de gorduras animais e adicionado ao diesel de petróleo em proporções variáveis. As políticas energéticas implementadas, no Brasil, a partir do início da década de 1970, foram primordiais para inserção do álcool e do biodiesel na matriz energética do país (ETENE, 2019).

3.1.1 Processamento Industrial da Cana de Açúcar e a Vinhaça como Subproduto

A cana-de-açúcar foi introduzida no Brasil em 1532 e, desde então, tem relevância na economia. A cadeia agroindustrial da cana-de-açúcar é uma das mais antigas e está associada aos grandes eventos históricos do país (FARINA, 1998). Quando ocorreu a crise do petróleo em países do Oriente Médio, em 1973, o Brasil importava cerca de 80% do petróleo consumido no país. Sendo assim, o governo iniciou uma série de ações como investimentos no setor sucroenergético com o propósito de reduzir a importação e consumo de diesel (VIEIRA et al., 2007).

De acordo com Moraes e Shikida (2002), além da instabilidade dos países do Oriente Médio, outros fatores são responsáveis pelo aumento da produção e uso do etanol, dentre eles: o risco do esgotamento das reservas de petróleo, o crescimento demográfico mundial, alta de preços de combustíveis fósseis, além disso o etanol possui caráter renovável e polui menos, quando comparado com a gasolina.

Com a criação do Proálcool, em 1975, a indústria de etanol no Brasil foi consolidada e o crescimento do cultivo de cana foi estimulado, contribuindo com a redução da dependência do petróleo como fonte energética (CHRISTOFOLETTI, 2013). Como consequência, o volume de vinhaça, resíduo proveniente da destilação do etanol, aumentou e, desse modo, as consequências de sua deposição no ambiente passaram a se tornar mais perceptíveis. Com isso, foram desenvolvidos estudos sobre alternativas ambientalmente corretas para sua disposição e o país tornou-se referência nos estudos sobre cana-de-açúcar (SILVA, 2012).

Os efeitos sociais do setor sucroenergético se fundamentam na geração de aproximadamente 950 mil empregos diretos, que somados aos indiretos totalizam cerca de três milhões de empregos. O número de produtores independentes de cana de açúcar é também expressivo, aproximando se de 70 mil em todo o Brasil. Com faturamento na ordem de 80

bilhões de reais, a cadeia produtiva da cana de-açúcar enquadra-se como o 4º segmento na pauta de exportação do agronegócio brasileiro (ASSAD, 2017).

O Brasil produz etanol em grande escala para combustível automotivo. De acordo com a Agência Internacional de Energia (*International Energy Agency* -IEA) (2015), o país ocupa a segunda posição entre os maiores produtores de etanol, sendo superado apenas pela produção dos Estados Unidos (EUA), principalmente a partir do milho. No Brasil, para cada litro de etanol produzido, são gerados, em média, 13,70 litros de vinhaça (CAVALETT et al., 2012). Considerando uma produção de aproximadamente 27,7 bilhões de litros de etanol na safra 2017/18 (CONAB, 2018), estima-se que a produção média de vinhaça foi de aproximadamente 379 bilhões de litros.

De acordo com os dados do 3° levantamento da safra de cana 2019/20, realizado pela CONAB (2019), das 642,7 milhões de toneladas de cana-de-açúcar a serem moídas no Brasil, cerca de 65% são destinadas à produção de etanol e 35% para açúcar. O crescimento foi 3,6% em relação à safra anterior. Já a área diminuiu 1,3%, alcançando 8,48 milhões de hectares. Esse fato se deve à boa produtividade dos canaviais que marca atualmente 75,70 toneladas/hectare e aumento de 4,9%. Em algumas regiões, os cultivadores estão mudando as áreas de produção para as de renovação, em busca de maior produtividade.

Com base nos dados pode-se observar uma tendência de um incremento considerável na produção de álcool em relação ao açúcar. Esta tendência responde ao comportamento dos dois mercados, pois o consumo do açúcar tem um padrão estável de crescimento, e o álcool, por sua qualidade como combustível automotor, ocupa espaços significativos como um produto de fonte limpa e renovável, com capacidade de adição e substituição da gasolina (CONAB, 2008).

Na produção de etanol é necessário diferenciar o etanol anidro, que é caracterizado pelo teor alcoólico mínimo de 99,3° (INPM- Instituto Nacional de Pesos e Medidas), utilizado como combustível para veículos e como matéria-prima na indústria de tintas, solventes e vernizes. E o hidratado, que é uma mistura hidroalcoólica, com teor alcoólico mínimo de 92,6° (INPM), é usado na indústria farmacêutica, alcoolquímica e de bebidas, no combustível para veículos e em produtos para limpeza (NOVA CANA, 2017).

A produção total de etanol na safra 2019/20, proveniente da cana-de-açúcar e do milho, é de 35,50 bilhões de litros, com um acréscimo de 7,2%, comparado à safra 2017/18. Só da extração da cana são 33,80 bilhões de litros e crescimento de 4,6%. Desse total, a maior parte vai para o etanol hidratado, gerando 23,60 bilhões de litros, enquanto que o anidro corresponde 10,20 bilhões (CONAB, 2019). Na tabela 1, estão descritas as etapas do processo industrial para produção de etanol a partir da cana-de-açúcar.

Etapa	Descrição
Lavagem	A cana de açúcar, chegando às usinas em sua forma pura, é colocada em uma esteira rolante e submetida a lavagem. Na sequência, é picada e passa por um eletroímã que retira materiais metálicos do produto.
Moagem	A cana é moída por rolos trituradores, produzido um líquido, chamado melado (70% do produto original vira melado e 30% se transforma em bagaço). O melado, continua no processo de fabricação de etanol.
Eliminação de impurezas	O líquido passa por uma peneira e segue para o processo de decantação. Depois, o melado puro é extraído e recebe o nome de caldo clarificado, que posteriormente é aquecido para eliminar microrganismos.
Fermentação	O caldo é levado aos tanques e misturado a um fermento com leveduras, que quebram as moléculas de glicose, produzindo etanol e gás carbônico. Nessa etapa é produzido o vinho fermentado.
Destilação	Estando o etanol misturado ao vinho fermentado, o próximo passo é separá- lo da mistura. Para isso, o líquido é distribuído em colunas de destilação, sendo aquecido até evaporar, seguido do processo de condensação. Dessa forma, o vinho é separado do etanol.
Desidratação	Com o álcool hidratado preparado, basta retirar o restante de água contida nele para transformá-lo em álcool anidro. Essa é a etapa de desidratação, em que um solvente é adicionado ao álcool hidratado, misturando-se apenas com a água, e são evaporados juntos. Permanece apenas o álcool anidro.

Tabela 1- Processamento da cana-de-açúcar para produção de etanol.

Fonte: Nova Cana (2017).
As usinas anexas produzem açúcar e etanol e a vinhaça gerada é proveniente de um mosto misto. As usinas autônomas, produzem apenas etanol e, nesse caso, a vinhaça é originada a partir do caldo de cana. Na Figura 1 está ilustrado, resumidamente, uma típica usina do tipo anexa.



Figura 1- Fluxograma simplificado do processamento da cana-de-açúcar para produção de açúcar e etanol

Fonte: Adaptado de Moraes et al., (2015).

Os resíduos sólidos gerados no processo de produção de açúcar e etanol a partir da canade-açúcar, possuem uma destinação satisfatória, visto que o bagaço e parte da palha resultantes do processamento são queimados em caldeiras para geração de vapor e eletricidade. Porém, o processo de produção do etanol e açúcar gera grandes volumes de águas residuárias, especialmente a vinhaça, podendo causar sérios problemas ambientais dependendo da destinação desse resíduo (MORAES; ZAIAT; BONOMI, 2015).

A vinhaça é um subproduto proveniente da destilação de uma dissolução alcoólica chamada "vinho". O vinho é um produto da fermentação alcoólica do caldo de cana, do melaço ou da mistura de ambos em distintas proporções. De acordo com a localização, a vinhaça recebe diferentes nomes, como vinhoto, restilo ou garapão (ELIA NETO, 2014)

A vinhaça possui uma alta demanda química de oxigênio (DQO), além de conter potássio (K), nitrogênio (N), cálcio (Ca) e magnésio (Mg), que são os principais componentes químicos, sendo K o elemento mineral mais importante, justificando o uso agrícola do subproduto na fetirrigação (PRADO et al., 2013). Vale ressaltar que a caracterização da vinhaça varia de acordo com a matéria prima utilizada. Na Tabela 2 estão apresentadas características composicionais básicas de vinhaças de cana-de-açúcar, tendo em vista o emprego de caldo e melaço.

No Brasil, a vinhaça é comumente aplicada no solo como fertilizante para a cultura da cana-de-açúcar devido aos seus altos níveis de matéria orgânica e nutrientes (NASPOLINI et al., 2017). Embora estudos tenham associado resultados benéficos à fertirrigação (BARROS, 2012), incluindo redução de gastos com fertilizantes inorgânicos, a disposição da vinhaça no solo pode gerar impactos negativos a longo prazo (FUESS et al., 2014), como o acúmulo de nutrientes no solo, incluindo salinização e fertilização excessiva do mesmo, levando à lixiviação de sais para as águas subterrâneas, aumentando a instabilidade do solo e/ou eutrofização dos corpos d'água. Além da contaminação com metais tóxicos, como zinco, cobre ou bário, entre outros metais, quantificados na Tabela 3, pode ocorrer a acidificação permanente do solo e dos recursos hídricos, assim como causar interferência no processo de fotossíntese devido à alta cor e turbidez da vinhaça e/ou entupimento nos poros do solo por sobrecarga orgânica. Esses fatores diminuem a transferência de oxigênio e a atividade microbiana, além de causar odores desagradáveis (FUESS; GARCIA, 2014).

	Matéria-prima					
	Caldo + Melaço	Melaço	Caldo			
рН	4,6	4,0	3,9			
DQO (g.L ⁻¹)	35,2	121,0	42			
DBO $(g.L^{-1})$	16,7	ND	11,3			
Nitrogênio (mg.L ⁻¹)	700	1,3	70			
Fósforo (mg.L ⁻¹)	Fósforo (mg.L ⁻¹) 160		200			
Potássio (mg.L ⁻¹)	ND	7,2	2,300			
Referências	Ferraz Jr. et al., (2014b)	España-Gamboa et al., (2012)	Ferreira et al., (2011)			

Tabela 2- Características físico-químicas de vinhaças de cana-de-açúcar.

Fonte: Elaboração própria.

Siglas: ND= dado/valor não disponível.

Elementos	Concentração (mg.L ⁻¹)		
Bário (Ba)	0,41		
Cromo (Cr)	0,04		
Cobre (Cu)	0,35		
Mercúrio (Hg)	0,0019		
Molibdênio (Mo)	0,008		
Níquel (Ni)	0,03		
Zinco (Zn)	1,66		

Tabela 3- Metais pesados encontrados na vinhaça da cana-de-açúcar.

Fonte: Adaptado de Christofoletti et al., (2013).

Devido aos impactos negativos citados, países como EUA e Uruguai, proibiram o uso da vinhaça como fertilizante (RFS2, 2010). Porém, a aplicação da vinhaça ainda é recomendada e legal no Brasil. Na década de 1970, leis restritivas proibiam a descarga de vinhaça em corpos d'água, incentivando, assim, a fertirrigação (DIAS et al., 2015). As grandes áreas onde era depositada a vinhaça, foram chamadas de "áreas de sacrifício", e com o passar do tempo, tornavam-se inutilizadas (GRANATO, 2003).

Ribeiro et al., (2010) enfatizaram que deve ser dada atenção especial a áreas que recebem vinhaça, por um longo período de tempo, pois estas estão eventualmente sujeitas a contaminação por chumbo. Da mesma forma, Madrid e Díaz (1998) observaram aumento da lixiviação de zinco e cobre quando a vinhaça concentrada, a partir da beterraba, foi depositada no solo, e sugeriram uma remoção prévia de compostos solúveis orgânicos, a fim de minimizar os danos. Segundo Alves e Lavorenti (2004), o fosfato e a matéria orgânica prejudicam a adsorção de sulfato na superfície do solo. Em consequência, é provável que ocorra lixiviação de sulfato, como observado por Motavalli et al., (1993) e Dynia e Camargo (1995), em alguns latossolos brasileiros.

A partir das informações apresentadas nesse tópico e tendo em vista que os avanços científicos e tecnológicos alcançados nos últimos anos proporcionaram desenvolvimento de pesquisas voltadas à recuperação de energia e produtos a partir de subprodutos, através de tratamentos biológicos a digestão anaeróbia é uma alternativa viável para a disposição da vinhaça, minimizando o impacto ambiental do uso desse subproduto como fertilizante (MORAES; ZAIAT; BONOMI, 2015; SILVEIRA, 2015; FERRAZ JR. et al., 2016; LAMAISON et al., 2015; LAZARO et al., 2014; SANTOS et al., 2014b).

O etanol e o biodiesel são os biocombustíveis mais utilizados no Brasil (ETENE, 2019). Durante o processamento, ambos geram subprodutos que podem ser utilizados na produção de energia. O glicerol é o principal subproduto gerado na indústria de biodiesel, apesar de ser utilizado em várias indústrias, o mercado atual não é suficiente para utilizar esta substância (DASARI et al., 2005; LEONETI et al., 2012; PEITER et al., 2016). Assim como a vinhaça de cana-de-açúcar, o glicerol pode ser empregado nos processos de digestão anaeróbia para obtenção de biogás, visto que é considerado uma boa fonte de carbono para os microrganismos (RIVALDI et al., 2007).

3.1.2 Setor de Biodiesel no Brasil e o Glicerol como Subproduto

O biodiesel é uma alternativa ecológica de combustível para veículos, comumente produzido pela transesterificação de ácidos graxos de cadeia longa (AGCL), presentes em gorduras vegetais e animais ou até mesmo em resíduos gordurosos. Apresenta algumas características vantajosas sobre o diesel à base de petróleo, como a sua biodegradabilidade, não

é tóxico, possui índices baixos de emissões de poluentes, e pode ser produzido por materiais renováveis e de baixo custo (RAMOS et al., 2011).

A transesterificação é o método mais utilizado no Brasil para a produção de biodiesel (Figura 2), no qual o óleo (triglicerídeo) reage com um álcool simples (metanol ou etanol), formando como produto principal o biodiesel e o glicerol como subproduto. No final do processo, o glicerol e os ésteres formam uma massa líquida de duas fases que podem ser facilmente separáveis por decantação. Na fase superior, encontram-se os ésteres metílicos ou etílicos constituintes do biodiesel. E na fase inferior, contém as impurezas, resultantes tanto da transesterificação (água, sais, ésteres, álcool e óleo residual) quanto da formação de sabão devido à reação dos ácidos graxos livres com excesso de catalisador (RIVALDI et al., 2007; CORDEIRO et al., 2011).





Fonte: Ma e Hanna (1999).

Na Figura 3 está apresentado o fluxograma do processo produtivo do biodiesel, o qual se inicia pela escolha da matéria-prima utilizada no processo. A etapa de preparação consiste nos processos de clareamento (remoção de pigmentos) e degomagem (retirada de resquícios de umidade), as quais preparam o óleo ou a gordura para o processo de transesterificação. Tal processo ocorre em meio alcalino e em temperatura próxima a 60°C. Após a reação de transesterificação é obtida uma massa constituída por duas fases: mais densa e menos densa, as quais são separáveis por decantação (em tanques horizontais) ou centrifugação (KNOTHE; GERPEN,2006).



Figura 3 - Fluxograma simplificado do processo produtivo do biodiesel.

Fonte: Knothe; Gerpen (2006).

De acordo com dados da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) (2018), o Brasil é o segundo maior produtor e consumidor mundial de biodiesel, sendo superado apenas pelo EUA. O processamento de biodiesel no Brasil em 2017 foi de 4,29 milhões de m³, no mesmo ano o EUA produziu 7 bilhões de m³. O Brasil possui elevada capacidade ociosa em todas as regiões (Tabela 4).

Região	Capacidade (Mil m³/ano)	Produção (Mil m ³ .ano ⁻¹)	Produção/Capacidade (%)
Norte	241,6	7,8	3,20
Nordeste	455,4	290,9	63,90
Sudeste	664,0	334,1	50,30
Centro-Oeste	3.026,3	1.896,3	62,70
Sul	2.918,3	1.762,2	60,40
Brasil	7.350,6	4.291,3	58,70

Tabela 4- Capacidade normal e produção de biodiesel, por região, no Brasil (2017).

Fonte: ANP (2018).

O Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB) foi lançado em 2004 com o objetivo de aumentar a produção e uso de biodiesel de forma sustentável. Para atender aos objetivos propostos foram criados diversos instrumentos como o Programa de Financiamento a Investimentos em Biodiesel (PFIB) e a redução fiscal. O PNPB tinha como intenção priorizar as regiões Norte e Nordeste, a mamona como matéria-prima e a agricultura familiar (ETENE, 2019).

Em 2005, o biodiesel foi introduzido na matriz energética brasileira, através da Lei n° 11.097, de 13 de janeiro de 2005 que estabeleceu, para todo o território nacional, a adição de biodiesel ao diesel de no mínimo 2% a partir de janeiro de 2008 e de 5% a partir de janeiro de 2013. O modo de utilização e o regime tributário foram distinguidos por região de plantio, oleaginosa e categoria de produção, agronegócio e agricultura familiar (BRASIL, 2005). Em 2018, o Conselho Nacional de Política Energética (CNPE) aprovou o percentual de 10% de biodiesel misturado ao óleo diesel (ETENE, 2019). Na Figura 4 são apresentados os percentuais de adição de biodiesel ao diesel, no Brasil, ao longo dos anos.



Figura 4 - Evolução dos percentuais de adição de biodiesel ao diesel ao longo dos anos.

Fonte: ANP (2019e); ANP (2018).

Por ter uma cadeia produtiva já consolidada, a soja foi a oleaginosa que deu início à produção de biodiesel (SAMPAIO; BONACELLI, 2018). E mesmo após a implantação do PNPB, o óleo de soja ainda é a matéria-prima mais utilizada para a produção de biodiesel no Brasil (Tabela 5). Segundo Souza et al., (2015) os incentivos oferecidos pelo PNPB não foram suficientes para viabilizar a produção de óleo de mamona e outras oleaginosas, que possuem pouca viabilidade econômica. Sampaio e Bonacelli (2018) relatam que a cultura contribuiu para a concentração da produção de biodiesel no Centro-Oeste e Sul do país.

Tubera 5 Materia prina annizada para produção de brodieser, no Brash (mo).						
Matéria-prima	2013	2014	2015	2016	2017	* (%)
Óleo de soja	2.231.464	2.625.558	3.061.027	3.020.819	3.072.446	71,6
Óleo de algodão	64.359	76.792	78.840	39.628	12.426	0,3
Gordura animal (1)	578.427	675.861	738.920	622.311	720.935	16,8
Outros materiais graxos(2)	46.756	37.225	60.086	134.297	483.544	11,3
Total	2.921.006	3.415.466	3.938.873	3.817.055	4.289.251	100

Tabela 5- Matéria-prima utilizada para produção de biodiesel, no Brasil (m3).

Fonte: ANP (2018). *Representatividade de produção por matéria-prima.

Notas: 1) Gordura bovina, gordura de frango e gordura de porco. 2) Óleo de palma, amendoim, nabo-forrageiro, girassol, mamona, sésamo, fritura, entre outros.

O PNPB não foi eficaz em alcançar as populações das regiões Norte e Nordeste. Em 2014, a maioria das matérias-primas para produção de biodiesel foram fornecidas por agricultores da região Sul (85%), apenas 7% por agricultores da região Nordeste, visto que a agricultura familiar desta região não produziu volume de mamona suficiente para atender a demanda gerada pelos crescentes percentuais de mistura obrigatória do biodiesel ao diesel (SOUZA et al. 2015; SAMPAIO; BONACELLI, 2018).

A ampliação da mistura de biodiesel de 6% para 10%, entre 2014 e 2018, resultou no aumento de 56,40% da produção de biodiesel no Brasil. O produto é comercializado através de leilões em quantidade suficiente para compor a mistura imposta pela legislação. A maior parte da produção de biodiesel no Brasil está concentrada no Sul e Centro-Oeste, o que está relacionada à ampla participação da soja como matéria-prima para produção de biodiesel (ETENE, 2019).

O glicerol é o principal subproduto da indústria de biodiesel. Aproximadamente 10% do volume total de biodiesel produzido corresponde ao glicerol (DASARI et al., 2005). Este subproduto apresenta impurezas, dentre elas encontram-se os ácidos graxos (SILES LÓPEZ et al., 2009), metanol, catalisadores, sais de potássio e sódio, metais pesados, sabão (RYWINSKA et al., 2009), água, lignina e outras impurezas orgânicas (PAPANIKOLAOUA et al., 2008). A concentração destas impurezas no glicerol residual, bem como alguns parâmetros físico-químicos como pH, densidade, cor e concentração de matéria orgânica, varia em função da natureza do óleo vegetal ou animal e do processo de fabricação de biodiesel (LIANG et al., 2010; MA et al., 2008). Na Tabela 6 estão apresentadas algumas propriedades físico-químicas do glicerol à temperatura de 20°C.

As propriedades físicas do glicerol podem ser explicadas pela sua estrutura molecular (Figura 5), que permite várias ligações de hidrogênio. Devido a presença de um grupo OH ligado a cada um dos três átomos de carbono, o glicerol tem grande potencial para participar de uma variedade de reações químicas.

Parâmetros	Valores		
Massa molecular	92,09 g.mol ⁻¹		
Densidade	1,26 g.cm ⁻³		
Viscosidade	1,50 Pa s		
Ponto de fusão	18,2°C		
Ponto de ebulição	290°C		
Ponto de fulgor	160°C		
Tensão superficial	64,00 nN.m ⁻¹		

Tabela 6- Propriedades físico-químicas do glicerol.

Fonte: Adaptado de Lide (2006).





Fonte: Guia IUPAC (2002).

O glicerol pode ser utilizado em várias indústrias. Na Figura 6 estão apresentados os principais setores industrias que utilizam o glicerol como matéria-prima. Vale salientar que, por possuir impurezas pode afetar e encarecer o seu processamento industrial.

Com o intuito de evitar futuros problemas derivados da acumulação de glicerol, uma vez que o mercado atual não é suficiente para consumir a grande produção dessa substância, e para tornar a produção de biodiesel mais competitiva, torna-se necessário buscar alternativas para utilização desse resíduo, de modo a estabilizar o preço e a oferta do biodiesel e do seu subproduto (DASARI et al., 2005; LEONETI et al., 2012; PEITER et al., 2016).

Os produtores de biodiesel têm pouco incentivo financeiro para purificar o glicerol bruto e, por conter metanol, é considerado perigoso. Portanto, é fundamental o desenvolvimento de processos inovadores para o gerenciamento e utilização do glicerol. A longo prazo, à medida que os suprimentos continuarem a aumentar, o glicerol se tornará um produto químico versátil para a produção de compostos de alto valor dentro de uma biorrefinaria integrada (TACONI; VENKATARAMANAN; JOHNSON, 2009).



Figura 6 - Principais setores industrias que utilizam o glicerol como matéria-prima.

Embora o glicerol seja estruturalmente semelhante aos açúcares, o carbono no glicerol encontra-se em estado mais reduzido. Sendo assim, quando comparado à glicose, a fermentação de glicerol gera o dobro de equivalentes de redução que devem ser oxidados, resultando em maiores rendimentos de compostos mais reduzidos, como butanol, etanol e 1,3-propanodiol. (TACONI; VENKATARAMANAN; JOHNSON, 2009).

3.2 HIDROGÊNIO: UTILIZAÇÃO, OBSTÁCULOS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Há muitos processos para produção de H₂ a partir de fontes convencionais e alternativas (Figura 7). Os processos, de modo geral, são classificados em dois: físico-químicos (por meio da eletrólise (YING et al., 2020), gaseificação de carvão (AL-ZAREER, DINCER E ROSEN, 2020) e reforma à vapor de hidrocarbonetos, normalmente por gás natural (KALAMARAS; EFSTATHIOU, 2013) e biológicos (biofotólise da água usando algas e cianobactérias (SENGMEE et al., 2017), fotofermentação (GARCÍA-SÁNCHEZ et al., 2018) e digestão anaeróbia (MENEZES; SILVA, 2019). O gás natural é a principal fonte para a produção de H₂, pelo método de reforma do metano a vapor, porém devido ao elevado custo do gás natural e sua alta taxa de depleção não se torna atrativo (KALAMARAS; EFSTATHIOU, 2013).

Fonte: Adaptado de Pagliaro et al., (2007).



Figura 7 - Produção de hidrogênio através de diferentes fontes utilizadas.

Fonte: Adaptado de Kalamaras e Efstathiou (2013).

O H₂ é utilizado principalmente nas refinarias de petróleo, produção de amônia, fertilizantes (GADOW et al., 2013) e, em menor grau, para refino de metais, como o níquel, molibdênio, cobre, zinco, urânio e chumbo (KRAUSE et al., 2013). Além disso, o H₂ é usado para refino e dessulfuração (reações de hidrogenação, hidrodessulfurização), hidrogenação de resíduos perigosos (dioxinas, PCB), síntese de metanol, etanol, éter dimetílico (DME), gás para tecnologia de síntese líquida (GTL), combustível de foguete, veículos e fornos industriais (PANDEY; PRAJAPATI; SHETH, 2019).

Vale salientar que o H_2 tem propriedades mais vantajosas quando comparado com a gasolina e o diesel, possui maior fração de energia por massa entre todos os combustíveis conhecidos e a sua combustão gera apenas água, não poluindo o ambiente (DUTTA, 2014), velocidade de queima rápida, sem necessidade de atomização, número de octanas altamente eficaz, potencial de formação de ozônio e maior limite de inflamabilidade com ar. Portanto, os veículos movidos a H_2 serão significativamente mais eficientes do que os veículos movidos a combustíveis convencionais (BALAT, 2008).

Apesar das vantagens e do interesse na produção biológica de H_2 , os avanços técnicos envolvidos nos processos biológicos são extremamente necessários para que o mercado de H_2 seja economicamente viável (GUO et al., 2010). O custo do H_2 , por unidade de energia, é mais do que o dobro do custo do diesel e da gasolina, o seu uso como recurso energético tem sido restrito devido aos elevados custos de produção. O desenvolvimento de pesquisas envolvendo o H_2 podem contribuir com a produção ambientalmente sustentável, em termos de custo mais competitivo em relação aos combustíveis de petróleo (ACAR; DINCER, 2013).

Existem algumas barreiras tecnológicas que devem ser superadas para a transição de um sistema de energia baseado em carbono (combustível fóssil) para uma economia baseada em

H₂. O uso do H₂ exige algumas medidas para uma distribuição sustentável do produtor até os usuários finais, como instalações de suporte, estações de abastecimento entre outros conceitos e tecnologias (PANDEY; PRAJAPATI; SHETH, 2019).

Os principais mercados de H_2 dependem principalmente de quatro fatores: (a) o custo do H_2 , (b) a taxa de avanços de várias tecnologias que usam H_2 , (c) potenciais restrições de longo prazo sobre os gases de efeito estufa, e (d) o custo dos sistemas de energia concorrentes (MÜLLER; ARLT, 2013)

Apesar dos obstáculos, o futuro da economia de H_2 é promissor. Sabe-se que, atualmente, a demanda mundial de energia está aumentando devido às relações entre as atividades humanas com aparelhos movidos a energia elétrica, a mecanização rápida, a melhoria dos padrões de vida e o aumento do consumo de energia global. Já foi identificado que a energia gerada a partir de combustíveis fósseis tem duas grandes preocupações: i) poluição, causando aquecimento global, mudanças climáticas, entre outros efeitos nocivos, ii) não é sustentável por um período mais longo (PANDEY; PRAJAPATI; SHETH, 2019).

No Plano Nacional de Energia (PNE) as metas de biogás são consideradas, incluindo o desenvolvimento de uma cadeia de serviços de biogás em 2030 e a geração de eletricidade utilizando 13% do potencial teórico de produção de biogás, a partir de resíduos agrícolas, em 2050 (EPE, 2014).

A produção biológica de H₂, vem ganhado crescente destaque, apesar dos custos de produção energia, a partir de combustíveis fósseis, tenham se apresentado mais vantajosos em comparação ao uso de fontes renováveis, espera-se uma alteração neste cenário, devido à pressão pela adequação ambiental, as vantagens do processo e os avanços tecnológicos (ELBESHBISHY et al., 2017; FERREIRA et al., 2018; YADAV; PARITOSH; VIVEKANAND, 2019).

3.3 PRODUÇÃO BIOLÓGICA DE HIDROGÊNIO VIA PROCESSOS FERMENTATIVOS

A digestão anaeróbia é um processo biológico, no qual um consórcio microbiano estabiliza a matéria orgânica na ausência de oxigênio, por meio de reações bioquímicas complexas. Em síntese, o processo de digestão anaeróbia ocorre em quatro etapas principais: 1) Hidrólise, 2) Acidogênese, 3) Acetogênese e 4) Metanogênese. Na Tabela 7 estão apresentadas as estequiometrias e variações da energia livre de Gibbs das principais reações que ocorrem na digestão anaeróbia.

A hidrólise consiste na quebra de moléculas complexas (proteínas, lipídios e carboidratos) em moléculas mais simples (aminoácidos, ácidos graxos, açúcares) por meio de enzimas hidrolíticas para que possam penetrar na membrana celular dos microrganismos (BUNDHOO; MOHEE, 2016). Em seguida ocorre a acidogênese, em que os compostos hidrolisados são transformados em H₂, gás carbônico (CO₂) e ácidos orgânicos voláteis, como ácido lático, acético, butírico, entre outros. A rota metabólica que o processo irá seguir depende de fatores ambientais e nutricionais que selecionam os organismos no sistema. A partir das principais rotas de transformação, cada sistema apresentará um determinado rendimento, uma vez que a concentração final de H₂ depende da rota de acidificação (FERNANDES et al., 2010). A acetogênese ocorre posteriormente, produzindo H₂, CO₂ e acetato (SAADY, 2013), e é seguida pela metanogênese, em que as arqueias metanogênicas hidrogenotróficas transformam o H₂ e CO₂ em metano (CH₄) e as arqueias metanogênicas acetoclásticas transformam o acetato em CH₄ e CO₂ (MOSEY, 1983).

Quando o processo anaeróbio visa a geração de energia, devem estar presentes microrganismos formadores de formiato, acetato, H_2 e dióxido de carbono. Porém, nem todas as reações de acetogênese ocorrem espontaneamente sob condições ambientais padrões (pH neutro, 25°C e 1 atm), como é o caso do propionato, butirato e etanol, sendo necessário que ocorra um mecanismo de remoção de H_2 do meio, e assim ocasione o deslocamento da reação no sentido de formar acetato, H_2 e dióxido de carbono (na forma de íon bicarbonato). Um dos mecanismos de remoção de H_2 do meio é através do seu consumo pelas arqueas metanogênicas hidrogenotróficas. Quando a pressão de H_2 no meio está entre 10^{-4} e 10^{-6} atm, as reações se tornam termodinamicamente favoráveis (LETTINGA et al., 1999). Quando o H_2 é o principal produto desejado da digestão anaeróbia, torna-se necessário interromper o processo metanogênico durante a etapa em que ocorre a acidogênese, levando em consideração que, nas próximas etapas, ocorrerá o consumo de hidrogênio para o equilíbrio do sistema e a formação de metano (SIMÕES, 2017).

Acidogênese	Reação	$\Delta G^0 (KJ.mol^{-1})$
Glicose \rightarrow Acetato	$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COO^- + 2CO_2 + 2H^+ + 4H_2$	-206
Glicose \rightarrow Propionato	$C_6H_{12}O_6 + 2H^+ \rightarrow 2CH_3CH_2COO^- + 2H_2 + 2H^+$	-356
Glicose \rightarrow Butirato	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CH_2CH_2COO^- + 2CO_2 + H^+ + 2H_2$	-255
Acetogênese	Reação	$\Delta G^0 (KJ.mol^{-1})$
Propionato \rightarrow Acetato	$CH_{3}CH_{2}COO^{-}+3H_{2}O \rightarrow CH_{3}COO^{-}+H^{+}+HCO_{3}^{-}+3H_{2}O$	+76,1
Butirato \rightarrow Acetato	CH ₃ CH ₂ CH ₂ COO- + 2H2O → 2CH3COO- + H+ 2H ₂	+48,1
Etanol \rightarrow Acetato	$CH_{3}CH_{2}OH + H_{2}O \rightarrow CH_{3}COO^{-} + H^{+} + 2H^{2}$	+9,6
Lactato \rightarrow Acetato	$CH_{3}CHOHCOO^{-} + 2H_{2}O \rightarrow CH_{3}COO^{-} + HCO_{3}^{-} + H^{+} + 2H_{2}$	-4,2
Bicarbonato →Acetato	$2HCO_3^- + 4H_2 + H^+ \rightarrow CH_3COO^- + 4H_2O$	-70,3
Metanogênese	Reação	$\Delta G^0 (KJ.mol^{-1})$
Acetato → Metano	$CH_3COO^- + H_2O \rightarrow CH_4 + CO_2 + 2HCO_3^-$	-31,0
Hidrogênio e Dióxido de Carbono →		
Metano	$4H_2 + HCO_3^- + H^+ \rightarrow CH_4 + 3H_2O$	-135,6
Formiato → Metano	$4\text{HCOO}^{-} + \text{H}_2\text{O} + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}^4 + \text{HCO}_3^{-}$	-32,6

Tabela 7 - Estequiometria e variação da energia livre de Gibbs ($\Delta G0$) das reações de acidogênese, acetogênese e metanogênese.

Fonte: Adaptado de Harper e Pohland (1986).

O processo biológico descrito no parágrafo anterior é denominado fermentação escura, o qual possui baixo consumo de energia, operação simples, utilização de diversos substratos orgânicos, maior taxa de produção de H_2 e maior crescimento bacteriano, quando comparado com a fotofermentação, além de possibilitar a produção de solventes orgânicos e commodities químicos (WANG; WAN, 2009).

É importante salientar que a degradação incompleta de compostos orgânicos pela via fermentativa limita o rendimento da produção de H₂. Visto que a formação de pequenas moléculas como ácido láctico, ácido butírico e ácido propiônico não são conversíveis pela via fermentativa (LAZARO; VARESCHE; SILVA, 2015).

3.3.1 Fermentação de Carboidratos

Os substratos ricos em glicose e sacarose (constituído pelos monossacarídeos glicose e frutose) são ideais para produzir biocombustíveis, a partir da fermentação anaeróbia em cultura mista (LEE et al., 2014). O gênero *Clostridium*, juntamente com *Enterobacter* e *Thermo-anaerobacterium* são predominantes durante a fase de hidrólise e acidogênese de açúcares simples (ELSHARNOUBY et al., 2013), esses microrganismos são capazes de crescer utilizando a energia, proveniente da sacarose, para seus processos metabólicos. A hidrólise da sacarose é termodinamicamente favorável (exotérmica), assim como a oxidação da glicose, evidenciando que a degradação anaeróbia de carboidratos simples é energeticamente favorável ao metabolismo microbiano (GHIMIRE et al., 2015). A representação esquemática dos mecanismos que desencadeiam a formação de H₂ no processo fermentativo, bem como a produção de metabólitos está apresentada na Figura 8.



Figura 8 -Esquema geral da diversidade metabólica presente na fermentação, destacando a geração de ácidos e utilização de cultura mista.

Fonte: Adaptado de Oh et al., (2011); Saady (2013).

Os processos de oxirredução da fase acidogênica são mediados por carreadores de elétrons. Em geral, as rotas metabólicas são condicionadas pelas coenzimas de difusão livre, chamadas de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) e a NAD-fosfato (NADP⁺). As bactérias acidogênicas, utilizam o fluxo de elétrons entre as moléculas de NADH (forma reduzida) e NAD⁺ (forma oxidada), transportando H₂ de uma cadeia carbônica para outra (MOSEY, 1983) (Equação 1). Em contrapartida, para manter o equilíbrio entre as concentrações de NAD⁺ e NADH, parte do H₂ pode ser liberado no meio líquido (Equação 2) (MOSEY, 1983).

$$Piruvato^{-} + NADH \rightarrow Lactato^{-} + NAD^{+}$$
(1)

$$NADH + H^+ \rightarrow H_2 + NAD^+$$
(2)

A maior formação teórica de H₂ ocorre quando o Acetil-CoA é metabolizado somente em acetato como produto final da fermentação (Equação 3) (CAI et al., 2011).

Glicose
$$\rightarrow$$
 Ácido Acético
 $C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2C_2H_4O_2 + 2CO_2 + 4H_2$
(3)

A formação dos ácidos butírico (HBu) (Equação 4) (HARPER; POHLAND, 1986) e propiônico (HPr) (Equação 5) (CAI et al., 2011) em sistemas anaeróbios pode ser considerada uma resposta das bactérias acidogênicas ao acúmulo de H₂ no meio. O direcionamento das rotas metabólicas para produção de HBu e HPr implica a redução da produção de H₂, seja a partir de menores rendimentos (rota do HBu) ou pelo próprio consumo do H₂ (rota do HPr).

Glicose
$$\rightarrow$$
 Ácido Butírico (4)
C₆H₁₂O₆ \rightarrow C₄H₈O₄ + 2CO₂ + 2H₂

$$Glicose \rightarrow \acute{A}cido \operatorname{Propiônico}$$

$$C_{6}H_{12}O_{6} + 2H_{2} \rightarrow 2C_{3}H_{6}O_{6} + 2H_{2}O$$
(5)

O acúmulo de H_2 no meio (presença em excesso de NADH) pode ocasionar desvio de rota metabólica para HPr (WANG; ZHOU; LI, 2006). A produção de HPr gera mais NAD⁺ do que a produção de HBu, adequando a proporção de NADH/NAD⁺ dentro da célula (SIVAGURUNATHAN; SEN; LIN, 2014). Além do acúmulo de H₂ no meio, outros fatores podem acarretar no acúmulo de HPr, como mudanças nas espécies dominantes de populações acidogênicas causadas por variações de pH, tipo de substrato ou sobrecarga de material orgânico (WANG; ZHOU; LI, 2006; SIVAGURUNATHAN; SEN; LIN, 2014).

Na Tabela 8 estão dispostos alguns metabólitos considerados atualmente *commodities* químicos, passíveis de serem produzidos por meio de processo fermentativo e que são substratos para a produção de compostos industriais mais complexos.

Ácidos	Preço (US\$.taçúcar ^{.1})	Aplicação
Acético	600	Polímeros (PVA); Tintas; Revestimentos; Intermediários têxteis; Alimentos; Polímeros (PET); Corantes e Pigmentos têxteis.
Butírico	411	Plásticos; Processos de curtimento de couro; Produção de medicamentos (sabor).
Propiônico	845	Antifungicidas na indústria alimentícia; Produção de medicamentos (sabor).

Tabela 8 - Principais ácidos orgânicos produzidos pela fermentação, valores aproximados no mercado e possíveis aplicações.

Fonte: Adaptado de Kim et al. (2018) e Freitas (2018).

3.3.2 Fermentação do Glicerol

O glicerol é considerado uma fonte de carbono assimilável por bactérias e leveduras para a obtenção de energia metabólica, como regulador do potencial redox e para a reciclagem de fosfato inorgânico dentro da célula (RIVALDI et al., 2007). O glicerol penetra na célula por difusão, sem a necessidade de microrganismos hidrolíticos. Dentro das células microbianas, os ácidos são incorporados a complexos lipídicos, tais como a membrana plasmática, ou catabolizados para a formação de compostos de baixa massa molar (CO₂, CH₄ e H₂) (MENDES et al., 2005).

As rotas metabólicas podem ocorrer por via redutora ou por via oxidativa (Figura 9). Pela via redutora, o glicerol sofre um processo de desidratação, resultando na produção de 1,3-PDO. A rota oxidativa consiste em desidrogenar o glicerol, formando o composto dihidroxiacetona que, após sofrer fosforilação pode ser convertido a piruvato ou a succinato, que é posteriormente convertido a propionato. As reações que levam à formação de compostos a partir do piruvato variam de acordo com as condições ambientais e com as enzimas que mediam a reação, podendo originar compostos mais simples, como 2,3 butanodiol, lactato, butirato, etanol, formiato, acetato, H₂ e dióxido de carbono (BIEBL et al., 1999).

Muitas espécies possuem a capacidade de fermentar o glicerol produzindo 1,3-PDO, entre elas podem ser citadas *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium butyricum*, *Enterobacter agglomerans*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri* e *Bacillus welchii* (XIU et al., 2007).

De forma similar às outras fermentações, a transformação dos produtos na fermentação a 1,3-PDO necessita, principalmente, do pH e disponibilidade da fonte de carbono e energia. Quando a concentração de glicerol é o fator limitante, a formação da biomassa celular é otimizada e o etanol é produzido. No entanto à medida que o glicerol aparece no meio, devido ao aumento da inibição pelos subprodutos, a formação de etanol cessa e o rendimento de 1,3-PDO se aproxima do seu valor máximo (BIEBL et al., 1999).

Algumas reações que levam a formação de diferentes metabólitos, por meio de *Klebsiella pneumonie* e *Clostridium butyricum*, são descritas a seguir, as quais podem produzir concomitantemente H₂ ou consumi-lo (ZENG et al., 1996):

Glicerol
$$(C_3H_8O_3) \rightarrow \text{ Acido Acético (CH_3COOH)}$$

 $C_3H_8O_3 + H_2O \rightarrow CH_3COOH + 3H_2 + CO_2$
(6)

Glicerol
$$(C_3H_8O_3) \rightarrow \text{ Acido Butírico } (C_4H_8O_2)$$
 (7)
 $2C_3H_8O_3 \rightarrow C_4H_8O_2 + 4H_2 + 2CO_2$

Glicerol (C₃H₈O₃)
$$\rightarrow$$
 Ácido Propiônico (C₃H₆O₂)
C₃H₈O₃ \rightarrow C₄H₆O₂ + H₂O
(8)

Glicerol
$$(C_3H_8O_3) \rightarrow 1,3$$
-Propanodiol $(C_3H_8O_2)$
 $C_3H_8O_3 + H_2 \rightarrow C_3H_8O_2 + H_2O$
(9)



Figura 9 - Vias metabólicas de assimilação do glicerol por microrganismos anaeróbios e seus possíveis produtos.

Fonte: Adaptado de BIEBL et al., (1999).

Compostos com valor agregado produzidos a partir do glicerol podem ser utilizados em diversas aplicações na indústria. Na tabela 9, estão descritas as possíveis aplicações desses produtos e os microrganismos produtores.

Produto	Aplicação	Microrganismos produtores	Referências
Etanol	Produção de bebidas alcoólicas, de combustíveis e de biodiesel	Kluyvera cryocrescens, Enterobacter aerogenes	Chatzifragkou; Papanikolaou (2012)
Polihidroxialca noatos	Produção de embalagens, na área médica, indústria farmacêutica e na agricultura	Pseudomonas	Papanikolaou (2012)
Hidrogênio	Geração de energia	Enterobacter Clostridium, Rhodopseudomonas Syntrophomonas	Dounavis et al. (2015)
Ácidos orgânicos	Indústria de alimentos, indústria química e na produção de polímeros	Yarrowia lypolitica, Anaerobiospirillum Succiniciproducen, Propionibacteria	Paranhos; Silva (2020)
Metano	Geração de energia	Methanoplanus, Methanosaeta, Methanosarcina, Methanobacterium	Meier (2020)
1,3- Propanodiol	Produção de poliésteres, poliuretanos, tintas, lubrificantes, resinas, anticoagulantes e cosméticos	Klebsiella, Citrobacter, Enterobacter, Clostridium, Propionibacterium, Anaerobiospirillum	Paranhos; Silva (2020)

	1 1	1 • 1	. 1 1	1 1' ~
Tabela 9- Produtos co	om valor agregado	produzidos a	narfir do glicero	Leas suas aplicações
	Jill valor agregado,	produzidos d	purtil do Sheero	i, e us suus upneuções.

Fonte: Elaboração própria.

3.3.3 Resíduos Utilizados na Produção de Hidrogênio

Os principais critérios para seleção de substratos adequados para a produção biológica de H₂ são a disponibilidade, o custo, a pureza do substrato e a sua biodegradabilidade. Muitos dos processos que produzem H₂ a partir de biomassa são complementares aos processos de produção de biomateriais. Portanto, países de grandes economias agriculturais possuem potencial para se desenvolverem economicamente de forma significativa ao incorporarem a bioenergia na bioindústria. (SHOW et al. 2012). A produção de H₂ utilizando resíduos orgânicos como substrato é uma abordagem de baixo custo e promissora. O uso de matérias-primas de menor custo pode tornar os processos de produção de H₂ mais competitivos em relação aos processos convencionais (eletrólise, gaseificação de carvão e reforma à vapor de hidrocarbonetos) (VI; SALAKKAM; REUNGSANG, 2017).

A aplicação da digestão anaeróbia no tratamento de vinhaça de cana-de-açúcar pode ser considerada uma opção tecnológica atrativa, baseando-se na disponibilidade da água residuária e nas concentrações apreciáveis de carboidratos residuais usualmente observadas em sua composição. Ferraz Júnior et al. (2014) utilizaram a vinhaça de cana-de-açúcar para avaliar o efeito da taxa de carregamento orgânico (TCO) na produção de H₂. Para isso, os autores utilizaram quatro reatores de leito fixo (55°C) e tempo de detenção hidráulica (TDH) variando entre 24 e 8 h, correspondente a valores de TCO entre (36,20-108,80 kg DQO.m⁻³.d⁻¹). A maior porcentagem de H₂ foi registrada no reator operado com o TDH de 8 h(108,6 kg DQO m⁻³.d⁻¹). No entanto, os valores máximos de produtividade volumétrica de hidrogênio (PVH) e rendimento de H₂ (HY) (1.023 mL H₂.d⁻¹.L⁻¹ e 2,4 mol H₂.mol carboidrato⁻¹, respectivamente), foram obtidos com TDH de 12 h (TCO de 72,4 kg DQO.m⁻³.d⁻¹).

A produção fermentativa de H₂ foi estudada por Santos et al. (2014b) e, assim como Ferraz Júnior et al. (2014), utilizaram a vinhaça de cana-de-açúcar como substrato. Os autores avaliaram o efeito do TDH na produção de H₂, utilizando dois reatores de leito fluidificado (RALF) (RALF 1 e RALF 2), sob condições termofílicas (55°C), com concentrações de 10 e 30 g DQO.L⁻¹, respectivamente. O TDH variou entre 6 e 1 h (TCO: 40 e 240 kg DQO.m⁻³.d⁻¹) no RALF 1 e para o RALF 2 variou entre 8 e 1 h (TCO: 90 e 720 kg DQO.m⁻³.d⁻¹). O maior valor de HY observado no RALF 1 foi de 2,86 mmol.g⁻¹ DQO aplicada (40 kg DQO.m⁻³.d⁻¹), no TDH de 6 h. O maior valor de HY registrado no RALF 2 (0,79 mmol.g⁻¹DQO aplicada), com TDH de 6 h (120 kg DQO.m⁻³.d⁻¹), foi menor que o obtido no RALF 1. Assim como no HY a PVH foi maior no RALF 1 (47,04 L H₂.d⁻¹.L⁻¹), com TDH de 1 h (240 kg DQO.m⁻³.d⁻¹), enquanto que no RALF2 foi obtida a PVH máxima de 19,44 L H₂.d⁻¹.L⁻¹ no TDH de 2 h (360 kg DQO.m⁻³.d⁻¹).

Os mesmos autores, Santos et al. (2014c), investigaram a produção de H₂, com variação no TDH (6 e 1 h), utilizando dois RALFs (RALF 1 e RALF 2), sob condições termofílicas (55°C), sendo o RALF 1 operado com 15 g DQO.L⁻¹ e o RALF 2 operado com 20 g DQO.L⁻¹ de vinhaça de cana-de-açúcar. A TCO variou entre 60-360 no RALF 1 e 60-480 kg DQO m⁻³.d⁻¹ no RALF 2. Com a redução do TDH a produção volumétrica de hidrogênio (PVH) foi elevada de 10,80 para 35,76 L H₂.d⁻¹.L⁻¹ no RALF 1 e 12,96 para 28,80 L H₂.d⁻¹.L⁻¹ no RALF 2. O HY variou entre 2,23 e 1,62 mmol.g⁻¹DQO aplicada no RALF 1 e 1,85 e 1,51 mmol.g⁻¹DQO aplicada no RALF 2. Os resultados sugerem que, em ambos os reatores, com TCO acima de 80 kg DQO.m⁻³.d⁻¹, a produção de H₂ ocorreu sob condição de sobrecarga.

Utilizando vinhaça de cana-de-açúcar (5 g DQO.L⁻¹), Rego (2016) operou RALF mesofílico (30°C), variando o TDH entre 8 e 1h. O percentual máximo de H₂ (13%) foi detectado no TDH de 2h, passando a 9% no TDH de 1h. Embora tenha sido detectado H₂ na composição do biogás, não houve produção volumétrica desse gás. O autor atribuiu esse resultado aos metabólitos produzidos, visto que no TDH de 2h as concentrações elevadas de ácido acético ocorreram em decorrência do processo de homoacetogênese. No TDH de 1h a presença de ácido propiônico em grandes concentrações pode ter inibido a produção de H₂.

O efeito do TDH (24 a 1 h) na produção de H₂, a partir da vinhaça de cana-de-açúcar, foi avaliado por Bernal (2018). Três reatores anaeróbios de leito granular expandido (EGSB) mesofílicos (30°C) (EGSB-10, EGSB-20 e EGSB-30) foram operados em diferentes concentrações afluentes (10, 20 e 30 g DQO.L⁻¹, respectivamente). No EGSB-10 não foi detectado H₂, o HAc produzido pela via homoacetogênica pode justificar a ausência de H₂. No EGSB-20 a produção de H₂ ocorreu apenas no TDH de 1 h (480 kg DQO m⁻³ d⁻¹), sendo a PVH igual a 4,36 L.H₂.d⁻¹.L⁻¹ e o HY 0,34 mmol H₂.g⁻¹ DQO. No EGSB-30 a PVH máxima foi obtida no TDH de 1 h (8,77 L.H₂.d⁻¹.L⁻¹) e o maior HY foi obtido no TDH de 2 h (0,33 mmol H₂.g⁻¹ DQO).

Pouresmaeil, Nosrati e Ebrahimi (2019) avaliaram a produção de H₂ a partir de vinhaça de cana-de-açúcar e cultura mista, utilizando reatores em batelada (36°C) e TDH de 24h. O aumento na concentração de substrato variando de 1,70 a 11,60 g.L⁻¹ causou acréscimo no rendimento de H₂ (45,90 para 58,41 mL H₂.g⁻¹ DQO), porém nas concentrações de substrato superiores a 11,60 g.L⁻¹ teve efeito negativo (58,41 para 1,28 mL H₂.g⁻¹ DQO). O rendimento máximo de H₂ em termos de DQO inicial foi de 58,41 mL.g⁻¹, o qual foi obtido na concentração de substrato de 11,6 g.L⁻¹.

Visando avaliar a produção de H₂, Fuess, Zaiat e Nascimento (2019) utilizaram reator anaeróbio de leito estruturado (AnSTBR) na fermentação escura de vinhaça de cana-de-açúcar, sob condições termofílicas (55°C), com variação de TDH entre 24 e 6 h, correspondendo a valores de TCO entre 40 e 120 kg DQO.m⁻³d⁻¹. O aumento da TCO aplicada afetou positivamente a produção de H₂ (755 – 2.074 NmL H₂.L⁻¹d⁻¹), atingindo 2.074 NmL H₂.L⁻¹d⁻¹, com TDH de 12 h (TCO - 70 kg DQO.m⁻³d⁻¹). O HY máximo (3,1 g mmol H₂.g⁻¹ DQO) foi obtido no TDH de 24 h. A principal estratégia para manter as condições de produção de H₂ foi controlar o pH da fermentação (5.0-5.5). As correlações metabólicas apontaram o lactato como substrato primário para a produção de H₂. Na Tabela 10 estão compilados dados de desempenho de reatores na fermentação de vinhaça de cana-de-açúcar para produção de H₂.

Reator	Concentração (g.L ⁻¹)	Temperatura (°C)	TDH (h)	РVН	НҮ	Referência
UAPRB	36,2	55	12	1,02 L.H ₂ .d ⁻¹ .L ⁻¹	2,4 mol H ₂ .mol carboidrato ⁻¹	Ferraz Jr. et al. (2014)
RALF	10	55	1 e 6	47,04 L H ₂ .d ⁻¹ .L ⁻¹	2,86 mmol.g ⁻¹ DQO	Santos et al. (2014b)
RALF	15	55	1 e 6	35,76 L H ₂ .d ⁻¹ .L ⁻¹	2,23 mmol.g ⁻¹ DQO	Santos et al. (2014c)
EGSB	30	30	1 e 2	8,77 L.H ₂ .d ⁻¹ .L ⁻¹	0,33 mmol H ₂ .g ⁻¹ DQO	Bernal (2018)
Batelada	11,6	36	24	28,1 mL H ₂ .L ⁻¹ .h ⁻¹ *	58,41 mL H ₂ .g ⁻¹ DQO	Pouresmaeil; Nosrati; Ebrahimi (2019)
AnSTBR	-	55	12 e 24	2074 N mL H ₂ .L ⁻¹ .d ⁻¹	3,1 g mmol H ₂ .g ⁻¹ DQO	Fuess;Zaiat; Nascimento (2019)

Tabela 10- Produção de H₂ utilizando o processo de fermentação escura a partir da vinhaça.

Fonte: Elaboração própria.

Siglas: Reator: RALF = reator anaeróbio de leito fluidificado, UAPBR = reator anaeróbio de leito compactado de fluxo ascendente (*up-flow anaerobic packed bed reactor*), TDH = tempo de detenção hidráulica; HY= rendimento de hidrogênio. *Valor obtido com 10 g DQO.L⁻¹ de vinhaça de cana-de-açúcar.

Além da vinhaça de cana-de-açúcar, o glicerol pode ser utilizado na digestão anaeróbia para a produção de H₂. Uma das vantagens do uso do glicerol está relacionada às suas características, visto que o mesmo possui um pH adequado para processos anaeróbios, boa capacidade de tamponamento e propriedades físico-químicas adequadas para armazenamento (líquido incolor, inodoro, viscoso, não tóxico e não explosivo) (RIVERO; SOLERA; PEREZ, 2014). A tabela 11 apresenta o desempenho da produção fermentativa de H₂ a partir do glicerol.

Utilizando glicerol como substrato, Sittijunda e Reungsang et al. (2012) utilizaram a metodologia de superfície de resposta, com Design Composto Central Rotacional (DCCR), para otimizar a produção de H₂. Os ensaios foram realizados utilizando *Enterobacter aerogenes* KKU-S1, reatores em batelada, com variações no pH do meio (4 - 8), na temperatura (50 - 70°C) e na concentração de glicerol (20 e 150 g.L⁻¹). Os autores relatam que o pH de 5,5, temperatura de 55°C e concentração inicial de glicerol de 25 g.L⁻¹ foram mais eficientes na produção acumulativa de H₂ (1078,79 mL H₂.L⁻¹). O aumento na concentração de glicerol de 25 para 50 g.L⁻¹ resultou em uma ligeira diminuição na produção acumulativa de H₂ para 921,71 mL H₂.L⁻¹. A mudança na concentração de glicerol de 25 para 20 g.L⁻¹ causou uma diminuição acentuada na produção acumulativa de H₂ para 550,86 mL H₂.L⁻¹. Os produtos metabólicos do processo de fermentação foram 1,3-propanodiol (1,3-PDO), etanol, ácidos acético, fórmico, lático, butírico e propiônico.

Visando otimizar a produção de H_2 e outros metabólitos Paranhos (2016) também utilizou metodologia de superfície de resposta, com DCCR. Durante a operação do RALF mesofílico (30°C), as concentrações de glicerol (17,1 a 2,9 g.L⁻¹) e TDH (9,24 h a 0,76 h) variaram. O máximo rendimento (0,17 mol H_2 .mol⁻¹ de glicerol consumido) foi atingido com a concentração de 17,1 g.L⁻¹ de glicerol e TDH de 5 h. Contudo, a PVH máxima (1,84 mmol H_2 .L⁻¹.h⁻¹) foi obtida com a concentração de 15 g.L⁻¹ de glicerol e TDH de 8 h. Dentre os principais metabólitos solúveis produzidos, 1,3-PDO e HPr se destacaram.

Sittijunda e Reungsang (2017) investigaram a influência da TCO (25, 37.5, 50, 62.5 g.L⁻¹.d⁻¹) na produção de H₂, 1,3-PDO e etanol, a partir de glicerol puro e bruto em UASB (37°C). Após estabelecer a TCO ótima (50 g.L^{-1.}d⁻¹), o reator foi alimentado com glicerol bruto. A produção máxima de H₂(134,20 mmol.L⁻¹), etanol (78,90 mmol.L⁻¹) e 1,3-PDO (60,90 mmol.L⁻¹) a partir de glicerol bruto foi obtida na mesma taxa de carregamento orgânico que o glicerol puro. O HY máximo foi de 0,58 mol H₂.mol⁻¹ de glicerol. A análise da comunidade microbiana indicou que os produtores predominantes de H₂, quando o glicerol bruto foi utilizado como substrato, foram *Clostridium sp., Enterobacter sp., Firmicutes* e *Actinobacterium*, enquanto *Enterobacter sp., Klebsiella sp.*, foram os produtores predominantes de 1,3-PDO. Os efeitos do pH (5,0 e 6,5) e TDH (14 e 8 h) na produção de H₂ e nas estruturas da comunidade microbiana foram avaliados por Illanes et al. (2017). Os autores utilizaram CSTR (37°C) inoculado com microflora mista e glicerol como substrato. Notou-se uma forte influência desses parâmetros operacionais nos rendimentos e produtividade H₂, onde HY máximo (0,58 \pm 0,13 mol H₂.mol⁻¹ de glicerol) e PVH (0,09 mol H₂.L⁻¹.d⁻¹) foram alcançados em pH 5,5 e TDH de 12 h. Foi observado que o parâmetro TDH se relacionou com alterações nos padrões metabólicos e influenciou a composição de microrganismos subdominantes, sugerindo que eles possam ter um papel fundamental na alteração da capacidade do consórcio e/ou da atividade de microrganismos dominantes em produzir H₂.

Nazareth et al. (2018) analisaram a produção de H₂ e metabólitos solúveis, a partir de glicerol bruto (5 g.L⁻¹). O experimento foi realizado em RALF mesofílico (30°C), com variação no TDH (8 e 5 h) e pH controlado entre 4,5 e 5,5. A maior PVH (13,19 mL .h⁻¹.L⁻¹) foi registrada no TDH de 1 h. Os principais metabólitos solúveis obtidos foram HPr e 1,3-PDO com rendimentos máximos de 1,77 e 0,82 mol.mol glicerol ⁻¹, respectivamente, no TDH de 8 h.

A produção contínua de H₂, utilizando glicerol bruto como substrato, cultura mista e RALF termofílico (55°C) foi avaliada por Costa (2017). O autor variou o TDH entre 8 a 0,5 h, enquanto que a concentração afluente de glicerol foi fixada em 10 g.L⁻¹. A máxima produtividade volumétrica de H₂ (1,46 L.h⁻¹.L⁻¹) foi alcançada no TDH de 0,5 h. O máximo valor de rendimento de H₂ foi de 1,28 mol H₂.mol⁻¹ de glicerol consumido, atingido no TDH de 1 h. Os principais metabólitos relacionados à elevada produção de H₂ foram o ácido butírico e o butanol, porém foi observada elevada produção de 1,3-PDO no TDH de 6 h, alcançando rendimento máximo de 0,80 mol 1,3-PDO.mol⁻¹ de glicerol consumido.

Rodrigues et al. (2019) compararam a produção de H₂ por culturas mistas e puras a partir do glicerol bruto. Dois ensaios foram realizados em batelada: (I) cultura mista e (II) cultura pura. Os experimentos foram conduzidos a 37°C, pH inicial de 5,5 para o ensaio I e 7,0 para o ensaio II, com 20 g DQO.L⁻¹ de glicerol bruto. O consumo de glicerol foi de 56,21% e 88% para o ensaio I e II, respectivamente. Os rendimentos de H₂ foram de 0,80 mol H₂.mol⁻¹ glicerol para o ensaio I e 0,13 mol H₂.mol⁻¹ glicerol para o ensaio II. A via metabólica redutiva foi predominante com *Enterobacter sp.*, gerando 1.460 mg.L⁻¹ de 1,3-PDO, e mostrou-se mais sensível na presença de metanol do glicerol bruto do que a cultura mista, em que a via metabólica oxidativa com a geração de H₂ foi predominante.

Reator	Inóculo	Temperatura (°C)	pH Inicial	DQO (g.L ⁻¹)	Rendimento (mol H2.mol ⁻¹ de glicerol)	Referências
Batelada	Klebsiella pneumonia	40	8	20	0,25	Chookaew et al. (2012)
Batelada	Clostridium pasteurianum	35	7,5	20	0,93	Lo et al. (2013)
CSTR	Clostridium pasteurianum	35	7,5	10	0,77	Varrone et al. (2013)
UASB	Cultura mista	37	5,5		0,58	Sittijunda; Reungsang (2017)
CSTR	Cultura mista	37	5,5		0,58	Illanes et al. (2017)
Batelada	Cultura mista	37	5,5	20	0,80	Rodrigues et al. (2019)

Tabela 11- Produção fermentativa de hidrogênio a partir do glicerol.

Fonte: Elaboração própria. Siglas: CSTR = reator anaeróbio continuamente agitado (*continuously stirred-tank reactor*).

3.4 CODIGESTÃO

A técnica chamada codigestão anaeróbia, promove a digestão anaeróbia simultânea de dois ou mais substratos que possuam características complementares, a fim de elevar a eficiência do sistema e potencializar a produção de biogás (HAGOS et al., 2017; ANJUM et al., 2017; BELLE et al., 2015; YAO et al., 2014; GARCÍA et al., 2014; LIJÓ et al, 2014; LINKE et al., 2013). Desse modo, além de viabilizar uma destinação ambientalmente adequada ao subproduto, tal possibilidade promove a produção de biocombustível passível de conversão em energia limpa e renovável.

Entretanto, é necessário selecionar o cossubstrato apropriado. Além disso, as proporções dos substratos utilizados no processo de codigestão devem ser adequadas e equilibradas, para que se opere em condições de estabilidade, de forma a maximizar a produção de biogás, minimizar efeitos adversos aos microrganismos e evitar a inibição do processo (FERRER et al., 2014; GARCÍA et al., 2014; MATA-ALVAREZ et al., 2014; HENARD et al., 2017; TASNIM et al., 2017), bem como tornar as unidades de biogás rentáveis (ÁLVAREZ et al., 2010).

Dentre os resíduos agroindustriais que podem ser utilizados na digestão anaeróbia, a vinhaça se destaca como um dos mais problemáticos devido à sua alta demanda química de oxigênio (10 a 60 g DQO.L⁻¹) e grande volume de produção (PANT; ADHOLEYA, 2007; FUESS; GARCIA, 2015). Além disso, a produção de H₂ pelo tratamento anaeróbio da vinhaça apresenta alguns problemas relacionados a sua composição, como a presença de compostos orgânicos recalcitrantes como fenóis, teor de potássio, sulfato e melanoidinas, que podem causar instabilidade no processo e diminuição da eficiência da produção de biogás (SILES et al., 2011; LAZARO et. al., 2014; RAMOS; SILVA 2020). Diante o exposto, para melhorar a biodegradabilidade dessa complexa água residuária, a adição de um cossubstrato pode ser uma estratégia promissora na melhoria do desempenho de produção de biogás (XIA et al., 2012; RAMOS; SILVA, 2020).

Um possível cossubstrato para a vinhaça de cana-de-açúcar é o glicerol, subproduto da indústria de biodiesel, tendo em vista que o mesmo possui pH adequado para processos anaeróbios e boa capacidade tampão (RIVERO; SOLERA; PEREZ, 2014). Além disso, pode ser facilmente armazenado na planta industrial, visto que possui características e propriedades físico-químicas adequadas para armazenamento (incolor, inodoro, viscoso, não tóxico e não explosivo). Os produtores de biodiesel pagam para descartar o glicerol excedente, visto que é produzido em grandes quantidades (cerca de 10 kg de glicerol são produzidos para cada 100 kg de biodiesel) e, por conter impurezas, precisa ser purificado, o que dificulta a venda do

subproduto (VIANA et al., 2012). Assim como o glicerol, a vinhaça de cana-de-açúcar não possui uma destinação satisfatória. No Brasil, a vinhaça é usualmente utilizada na fertirrigação, tal prática pode acarretar problemas na estrutura do solo e nos corpos d'água, além de reduzir a produtividade da colheita (PANT; ADHOLEYA, 2007; FUESS; GARCIA, 2015; JANKE et al., 2016). Tendo em vista os aspectos mencionados, associar esses dois subprodutos, vinhaça de cana-de-açúcar e glicerol, em processos fermentativos para a produção de H₂ pode ser favorável (FRANCO, 2012).

Há muitos trabalhos na literatura avaliando a codigestão de vinhaça com diversos substratos, para produção de H₂ e/ou CH₄, como glicerol e esgoto doméstico (FERNANDES et al. 2010), melaço (ALBANEZ et al. 2016), soro de leite (LOVATO et al. 2018), soro de queijo (SOUZA et al. 2019), entre outros. Da mesma forma, existem diversos trabalhos relacionados com a codigestão de glicerol com vários substratos, para produção de H₂ e/ou CH₄, como material lignocelulósico (AMON et al. 2006), água residuária proveniente do processamento de batata (MA et al., 2008), esterco bovino (DAUN et al. 2009), lactose (MIRZOYAN; TRCHOUNIAN, 2019), estrume suíno (AGUILAR et al. 2019), entre outros.

Alguns autores como Lovato et al. (2019) e Meier et al. (2016) avaliaram a codigestão de vinhaça de cana-de-açúcar e glicerol para produção de CH₄. Porém estudos com a codigestão de vinhaça de cana-de-açúcar e glicerol para produção de H₂ ainda não foram relatados na literatura de referência. Portanto, desenvolver pesquisas avaliando a codigestão de ambos pode render resultados favoráveis em relação a produção de H₂.

A seguir estão apresentados alguns trabalhos avaliando a produção de H_2 a partir da codigestão de vinhaça de cana-de-açúcar e soro de queijo (RAMOS; SILVA 2018), e vinhaça de cana-de-açúcar e melaço (ALBANEZ et al. 2016; ALBANEZ et al. 2018). Assim como, trabalhos com codigestão de glicerol e melaço (PEREYRA et al., 2020) e glicerol e soro de queijo (LOVATO et al. 2017).

A codigestão de vinhaça e melaço para a produção de H₂ foi investigada por Albanez et al. (2016), utilizando reator anaeróbio de biofilme em batelada sequencial. Os resultados mostraram que as melhores condições ocorreram com a concentração afluente de 6 gDQO.L⁻¹, composta por 67% de vinhaça e 33% de melaço, com pH de 6,1. Os melhores resultados foram $PVH = 13,5 \text{ moLH}_2.\text{m}^{-3}.\text{d}^{-1} \text{ e HY} = 6,2 \text{ moL H}_2.\text{kg}^{-1} DQO \text{ com tempo de fermentação de 3 horas.} O aumento da proporção de vinhaça acima de 67% mostrou ser desfavorável à produção de hidrogênio.$

Os mesmos autores, Albanez et al. (2018) avaliaram a viabilidade da produção de H_2 a partir da codigestão de vinhaça de cana-de-açúcar e melaço, em batelada (30°C) com 3

g DQO.L⁻¹. Os experimentos foram realizados em três diferentes condições: 1) 33% de vinhaça e 67% de melaço, com tempo de fermentação (TF) de 4 horas e pH de 5.6; 2) 33% de vinhaça e 67% de melaço com TF de 3 horas e de pH 5.3; e 3) 75% de vinhaça e 25% de melaço, com TF de 3 horas e pH de 5.6. Os melhores resultados de rendimento (0,5 mmoL H₂.g⁻¹DQO) e produtividade de H₂ (3,8 moL H₂.m⁻³.d⁻¹) foram observados na mesma condição (2), onde o TF foi de 3 horas, com a proporção de substratos de 33% de vinhaça e 67% de melaço e pH afluente de 5,3.

A cofermentação de vinhaça de cana-de-açúcar e soro de leite em RALF termofílico $(55^{\circ}C)$ foi analisada por Ramos e Silva (2018). A concentração de soro de leite foi acrescida ao longo da operação do reator (2, 4, 6, 8 e 10 g DQO.L⁻¹), enquanto que a concentração de vinhaça foi mantida em 10 g DQO.L⁻¹. O afluente foi mantido entre 4,26 e 4,95. Na etapa inicial, o TDH foi mantido em 8 h. Em seguida, foi ajustado para 6 h, com a concentração de soro de leite em 2 g DQO.L⁻¹. Os valores máximos de PVH (1,41 LH₂.d⁻¹.L⁻¹) e HY (0,82 mmoLH₂.gDQO⁻¹) foram observados com TDH de 8 h e concentração de soro de leite de 2 g DQO.L⁻¹. Os valores de HY e PVH diminuem, sendo HY<0,25 mmoLH₂.gDQO⁻¹ e PVH< LH₂.d⁻¹.L⁻¹ para todas as demais condições.

Dentre os trabalhos de codigestão com glicerol relatados na literatura encontra-se o de Lovato et al. (2017). Os autores avaliaram a codigestão de soro de leite com glicerina na produção de H₂ utilizando reatores anaeróbio de leito estruturado (30°C). A influência da batelada alimentada, tempo de fermentação (2, 3 e 4 h), e os efeitos das interações entre concentração afluente (4,7 - 9,3 g DQO.L⁻¹) e o tempo de fermentação foram investigados pelos autores. Os resultados indicaram que a batelada alimentada apresentou melhores resultados relacionados a produção de H₂. O melhor HY (5,4 moL H₂.kg⁻¹ DQO) e PVH (129,0 moLH₂.m⁻³.d⁻¹) foram obtidos com o tempo de fermentação de 3h e concentração afluente de 7 g DQO.L⁻¹.

A codigestão avaliada por Pereyra et al. (2020) foi realizada a partir de glicerol e melaço, objetivando a produção de H₂ e produtos de valor agregado. Para isso, os autores utilizaram RALF (28°C), TDH de 4 h, pH entre 5.65 e 6.11, concentração de melaço fixa (4 g DQO.L⁻¹) e concentração de glicerol bruto variando entre 1 e 3 g DQO.L⁻¹. O melhor HY (2,11 moL H₂.moL glicose) e PVH (0,32 L.H₂.h⁻¹L⁻¹reator) ocorreram com 1 g DQO.L⁻¹ de glicerol e 4 g DQO.L⁻¹ de melaço. Os principais metabólitos solúveis produzidos foram 1,3-PDO (14,40-38,82%), propionato (12,1–37,53%) e acetato (13,24–26,91%). A maior produção de 1,3-PDO (0,99 g.L⁻¹) ocorreu com 3 g.L⁻¹ de glicerol e 4 g DQO.L⁻¹ de melaço.

3.5 FATORES QUE AFETAM A PRODUÇÃO FERMENTATIVA DE HIDROGÊNIO

Para a produção fermentativa de H_2 é necessário otimizar condições específicas de operação como temperatura, pH, tipo de substrato, reator, inóculo, entre outros, tendo em vista que, cada um desses parâmetros, pode interferir significativamente o desempenho da digestão anaeróbia (PANDEY, 2011; HALLENBECK; GHOSH, 2009).

3.5.1 Inóculo

As bactérias capazes de produzir H₂ existem amplamente em ambientes naturais, como solo, lodo de águas residuárias, resíduos orgânicos, entre outros (WANG; WAN, 2009). As culturas mistas têm sido amplamente utilizadas como inóculo para a produção fermentativa de H₂, tendo em vista que são mais simples de operar e controlar, podendo inclusive ser capazes de metabolizar um maior espectro de substratos, demonstrando, em geral, um maior rendimento na produção de H₂, quando comparado às culturas puras (HEIJNE et al., 2017; PARK et al., 2018; PINHO et al., 2019; POIRIER et al., 2020). Do ponto de vista de engenharia, a seleção de culturas mistas é considerada favorável para a aplicação em larga escala. Isto ocorre devido ao fato de que o controle e a operação do processo são facilitados quando não é exigida esterilização do meio (MENEZES; SILVA, 2019).

Segundo Maintiguer et al. (2008), ao utilizar cultura mista para produção de H₂ é necessário realizar pré-tratamento do inóculo, a fim de eliminar arqueas metanogênicas hidrogenotróficas, visto que estas utilizam o H₂ em seu metabolismo, dando preferência às bactérias produtoras (acidogênicas) formadoras de esporos. Os métodos de pré-tratamento relatados para selecionar bactérias produtoras de H₂, a partir de culturas mistas, incluem principalmente choque térmico, ácido, base, aeração, congelamento e descongelamento, clorofórmio, bromoetanossulfonato de sódio ou ácido 2-bromoetanossulfônico e iodopropano (WANG; WAN, 2009).

O efeito do método de eliminação de arqueas metanogênicas, na produção de H₂, foi analisado por Viana et al. (2019). O glicerol bruto (16 g DQO.L⁻¹) foi utilizado nos experimentos. Quatro inóculos foram testados: 1) lodo anaeróbio que tratava águas residuárias municipais, 2) lodo anaeróbio que tratava águas residuárias de cervejaria, 3) líquido ruminal de cabra e 4) mistura dos três primeiros inóculos. Cada inóculo foi submetido a três tratamentos diferentes para inibir a metanogênese: adição de clorofórmio, choque ácido e choque térmico. Os resultados indicam que o líquido ruminal tratado com clorofórmio alcançou o maior

rendimento de H₂ (0,208 mol H₂.mol⁻¹ de glicerol). A comunidade microbiana presente após todos os tratamentos testados apresentou boa funcionalidade e estabilidade em termos de composição de espécies, além de suportar mudanças nas condições ambientais.

3.5.2 Potencial Hidrogeniônico (pH)

O pH é conhecido por ser um dos principais fatores ambientais que afetam as vias metabólicas e o rendimento de H₂. As enzimas são ativas apenas em um determinado intervalo específico de pH e têm uma atividade máxima a um pH específico (DABROCK et al. 1992). Estudos têm demonstrado que em altas concentrações de ácidos dissociados, devido a uma alta força iônica no meio, a produção de H₂ muda de fase acetogênica para solventogênica. O mesmo tipo de inibição ocorre em baixo pH, quando ácidos apolares não dissociados presentes no meio penetram na parede celular (KHANAL et al. 2004). Apesar de não existir consenso sobre o melhor pH para a produção de H₂ (MOTA et al., 2018), normalmente, são utilizados valores de pH entre 4,5, e 6,5 para esta finalidade (ELBESHBISHY et al., 2017).

Nesse contexto, a produção de H_2 , a partir de sacarose, sem controle de pH foi investigada por Mota et al. (2018). Na primeira fase experimental, três reatores foram comparados: 1) Leito fixo estruturado, 2) UASB granular e 3) UASB floculento. Eles foram operados com TDH de 3,3 h e 33 g DQO.L⁻¹.d⁻¹ de TCO, sob condições mesofilicas (30°C). A produção de H₂ ocorreu durante todo o período experimental com pH médio de efluente de apenas 2,8. Os reatores de leito fixo estruturado, UASB granular e UASB floculento apresentaram taxas de produção volumétrica de H₂ de 95, 45 e 54 mL H₂, L⁻¹h⁻¹, respectivamente; e rendimentos de H₂ de 1,5, 0,8 e 1,2 mol H₂.mol⁻¹sacarose consumida, respectivamente. O reator UASB floculento apresentou resultados intermediários, mas sem tendência de declínio, ao contrário do observado no reator de leito fixo estruturado. Posteriormente, um UASB floculento foi aplicado na segunda fase experimental, com um TDH de 4,6 h, resultando em uma TCO de 25 g DQO.L⁻¹.d⁻¹. A PVH e o HY aumentaram consideravelmente para 175 mL H₂,L⁻¹,h⁻¹ e 3,4 mol H₂,mol⁻¹sacarose consumida, respectivamente. Contrariando os dados reportados na literatura que relatam inibição da produção de H₂, por fermentação escura, a pH menor que 4,0, o reator UASB floculento apresentou produção estável de H₂ a longo prazo, com rendimentos satisfatórios em pH médio de 2,7.

Depraect et al. (2019) estudaram o efeito do pH na produção de H₂ à base de lactato e acetato, a partir da fermentação escura de 80% (v.v⁻¹) de vinhaça da tequila e 20,% (v.v⁻¹) de

águas residuais de nixtamalização, com 61,9 g DQO.L⁻¹. Para isso, foram utilizados reatores em batelada (35° C) e valores constantes de pH entre 5,8 e 6,5. Não foram observadas diferenças significativas na quantidade de H₂ produzido. Quando comparado com o pH 5,8, o pH 6,5 diminuiu a produção de H₂ através da formação de propionato. Com base nos resultados, uma estratégia de pH controlado de dois estágios foi proposta mantendo o primeiro estágio em pH 6,5 e o segundo estágio em pH 5,8, para evitar o longo tempo de fermentação e produção de ácido propiônico, respectivamente. A estratégia de mudança de pH reduziu o tempo operacional e aumentou a produção de H₂ em 17%, essa estratégia também estimulou a sintrofia entre *Clostridium* e *Lactobacillus* e reduziu a proliferação de *Blautia* e *Propionibacterium*, levando a produção de H₂ a uma eficiência aprimorada (2,5 NmL. L⁻¹). O controle do pH foi crucial para promover uma melhor organização funcional nas comunidades microbianas e inibir vias metabólicas indesejadas.

3.5.3 Reator Anaeróbio de Leito Fluidificado

De acordo com Barca et al. (2015), o RALF possui leito trifásico (sólido, líquido e gasoso), no qual a fase sólida, composta de material inerte ou granular permite a retenção de sólidos suspensos e a fixação da biomassa, e encontra-se imersa na fase líquida, a qual é renovada continuamente pelo suprimento de afluente. A fase gasosa corresponde ao biogás. O material suporte utilizado apresenta elevada superfície específica para a adesão da biomassa, sendo em maioria grãos de pequeno diâmetro (0,2 a 2,0 mm).

As condições hidrodinâmicas no reator podem ser descritas pela relação entre a perda de carga e a velocidade ascensional do líquido. A fluidização do leito se dá a partir da velocidade ascensional, quando a perda de carga no reator se torna constante. Neste estado de fluidização, o peso de uma partícula no leito se iguala à força de arraste, devido à velocidade ascensional e, em consequência, o seu movimento é independente das demais partículas. À medida que a velocidade aumenta o leito de partículas vai se expandindo gradualmente. Este fenômeno caracteriza o reator de leito fluidificado (GONÇALVES et al., 2001; BARCA et al., 2015).

O RALF apresenta alguns fatores positivos como o acúmulo de grande quantidade de biomassa aderida ao meio suporte, suportando TCO elevadas, possibilidade de aplicação de baixos TDH e boas características de mistura, otimizando a transferência de massa entre o substrato e os microrganismos, além de promover alta velocidade de agitação na fase líquida favorece o desprendimento do hidrogênio nesta fase (ZHANG et al., 2007; BARCA et al. 2015).

Diversos estudos avaliando a produção de H₂ em RALF foram realizados no Laboratório de Controle Ambiental II (LCA-II) do Departamento de Engenharia Química da UFSCar (WU et al., 2003; LIN et al., 2006; KOSKINEN et al., 2007; ZHANG et al., 2007; LIN et al., 2009; SHIDA et al., 2009; AMORIM et al., 2009; AMORIM et al., 2012; BARROS et al., 2011; REIS; SILVA, 2011; BARROS; SILVA, 2012; SHIDA et al., 2012; WU et al., 2012; ROSA et al., 2014a; ROSA et al., 2014b; SANTOS et al. 2014a; SANTOS et al. 2014b; SANTOS et al. 2014a; SANTOS et al. 2014b; SILVA, 2018; FERREIRA, 2014; FERREIRA, 2018; NAZARETH, 2015; RAMOS; SILVA, 2018; FERREIRA, 2018; PARANHOS; SILVA, 2020).

Dentre eles encontra-se o estudo de Amorim et al. (2009), o qual avaliou a produção de H₂ em RALF (30°C), a partir de água residuária sintética à base de glicose (2 g DQO.L⁻¹) e argila expandida como material suporte. O TDH variou entre 8 e 1 h. Os autores observaram que houve aumento do HY de 1,41 para 2,49 mol H₂.mol⁻¹ glicose, quando avaliado a redução de TDH de 8 para 2 h, porém, para o TDH de 1 h houve redução deste parâmetro para 2,41 mol H₂.mol⁻¹ glicose. O biogás produzido foi composto por H₂ e CO₂, sendo que a diminuição do TDH implicou incremento da concentração de H₂ de 8 para 35%. Ao longo do experimento, os principais metabólitos produzidos foram HAc (36,11 - 53,32%) e HBu (36,13 - 44,9%).

Também utilizando água residuária sintética à base de glicose (2 g DQO. L⁻¹), Shida et al. (2012) investigaram o desempenho da produção fermentativa de H₂ em RALF (30°C). A argila expandida foi utilizada como material suporte. O experimento foi conduzido com variações no TDH entre 8 e 1 h, e o pH foi mantido entre 3,50 e 4,39. Os autores obtiveram o HY de 1,84 mol H₂.mol⁻¹ glicose no TDH de 8 h. Contudo, o HY aumentou significativamente com a diminuição do TDH (1 h), com valor máximo de 2,29 mol H₂.mol⁻¹ glicose. Enquanto que a PVH máxima (1,15 L.h⁻¹.L⁻¹), foi obtida no TDH de 2 h. Os resultados relatados pelos autores indicam que houve produção estável de H₂ e ácidos orgânicos no RALF durante todo o período experimental.

A influência de diferentes materiais suportes (poliestireno, pneu triturado e polietileno tereftalato) na produção de H₂ e etanol (EtOH) foi analisada por Barros et al. (2012). Os RALFs (23°C) foram alimentados com glicose (4 g DQO.L⁻¹) e operados com variação de TDH entre 8 e 1 h, e pH de 3,5. Os maiores valores relacionados à produção de H₂ foram obtidos no RALF utilizando pneu triturado como material suporte, no TDH de 2 h, cujo máximo HY foi de 2,11 mol H₂.mol⁻¹ glicose. Os principais metabólitos solúveis detectados nos reatores foram HAc, HBu, ácido láctico (HLa) e EtOH. O RALF com pneu triturado apresentou maiores concentrações de HAc e HBu (0,434 e 1,013 g.L⁻¹, respectivamente). A maior produção de EtOH (1,94 g.L⁻¹) foi obtida no RALF com polietileno tereftalato.
Objetivando avaliar a aplicação de RALF na fermentação de glicerol bruto (5 g DQO.L⁻¹), Ferreira (2014) utilizou argila expandida como material suporte, a fim de analisar a produção de H₂ mediante as condições operacionais estabelecidas. A temperatura do reator foi mantida em 55 °C e o pH entre 4,0 e 5,5. Além disso, o TDH variou entre 14 e 1 h. Os resultados indicaram que o máximo HY (3,0mol H₂.mol⁻¹ glicerol) e PVH (1,5 mL.L⁻¹ h⁻¹), foram registrados no TDH de 1 h. Entre os TDHs de 14 a 2 h, houve o predomínio de 1,3-PDO, EtOH, HAc e HBu. No entanto, ao reduzir o TDH para 1 h, a produção de EtOH cessou e a produção de HPr foi favorecida.

Rosa et al. (2014) investigaram o efeito do TDH e de diferentes fontes de inóculo na produção de H₂ e EtOH, utilizando soro de queijo como substrato em RALF (30°C). O TDH variou entre 4 e 1 h e os inóculo avaliados foram provenientes de lodo suíno e de aves. A concentração de substrato foi fixada em 5 g DQO.L⁻¹. Os valores máximos de rendimento de H₂ (1,33 mol H₂.mol⁻¹ lactose) e de rendimento de EtOH (1,22 mol etanol.mol⁻¹ lactose) foram observados no RALF inoculado com lodo suíno e TDH de 4 h. No mesmo RALF foi registrado o valor máximo de PVH (0,51 L H₂.h⁻¹.L⁻¹) no TDH de 1 h. Os principais metabólitos solúveis registrados foram EtOH, metanol, HAc e HBu (1,22; 0,84; 0,21 e 0,41 mol.mol⁻¹ lactose, respectivamente).

A produção H₂ a partir de glicerol bruto em RALF mesofílico (30°C) foi analisada por Nazareth (2015). A operação do RALF ocorreu com partículas de pneus (2,8-3,35 mm) como material suporte, TDH variando de 8 a 0,5 h e concentração de glicerol fixa em 5 g DQO L⁻¹. A autora constatou que não ocorreu produção volumétrica de hidrogênio nos TDH de 8, 6 e 4 h, e que nos demais TDHs (2, 1 e 0,5 h) houve produção desse biogás, cuja máxima produção (13,2 mL.L⁻¹.h⁻¹) ocorreu no TDH de 1 h. Os resultados obtidos mostraram que os principais metabólitos produzidos foram HPr e 1,3-PDO, com rendimentos máximos de 1,77 e 0,82 mol.mol⁻¹ glicerol, respectivamente, no TDH de 8 h.

Ferreira et al. (2018) avaliaram a influência do TDH na produção de H₂ em RALF, sob temperatura mesofílica (30°C) (RALF–M) e termofílica (55°C) (RALF–T). Os reatores foram alimentados com água residuária sintética à base de sacarose (5 g DQO. L⁻¹) com TDH de 8, 6, 4, 2 e 1 h. A taxa de produção de H₂ aumentou de 67,8 para 194,9 mL H₂·h⁻¹ L⁻¹ (RALF-T) e de 72,0 para 344,4 mL H₂·h⁻¹L⁻¹ (RALF-M), quando o TDH diminuiu de 8 para 1 h. Os principais metabólitos foram HAc (31,33% a 41,52%) e HBu (10,24% a 20,73%) no RALF mesofílico e acetato (20,14% a 39,32%) e etanol (14,31% a 29,92%) no RALF termofílico, indicando que, os melhores resultados foram observados no RALF mesofílico, com menor TDH.

A produção de H₂ avaliada por Silva et al. (2019) foi realizada a partir de águas residuárias de laticínios, em RALF. Além disso, os autores analisaram a influência da TCO na produção de H₂. Para isso, foram utilizando três diferentes taxas de carregamento orgânico de 28,7, 53,2 e 101,7 kg DQO.m⁻³.d⁻¹, correspondentes ao TDH de 8, 6 e 4 h, respectivamente. O rendimento de H₂ diminuiu com o acréscimo da TCO de 2,56 mol de H₂.mol de carboidrato⁻¹ para 0,95 mol de H₂.mol⁻¹ carboidrato, uma vez que a TCO aumentou de 28,65 kg DQO.m⁻³.d⁻¹ para 95,76 kg DQO.m⁻³.d⁻¹. O aumento da TCO aplicada também causou aumento na diversidade bacteriana, como evidenciado pelo maior valor do índice Shannon-Wiener (2,811), correspondente a fase operacional de maior TCO (95,8 kg DQO.m⁻³.d⁻¹).

3.5.1 Temperatura

Assim como o inóculo, o pH e a configuração do reator a temperatura é um fator importante na produção de H₂, visto que a mesma interfere nas funções metabólicas e reações químicas e enzimáticas nas células de alguns microrganismos, bem como no desempenho da fermentação. As faixas de temperatura utilizadas nos processos fermentativos podem ser classificadas em mesofílica (25-40°C), termofílica (40-65°C) e hipertermofílica (65-80°C) (SINHA; PANDEY, 2011; KIRTAY, 2011; ELBESHBISHY et al., 2017).

Levando-se em consideração a Lei de Henry (1802), a elevação da temperatura no meio, diminui a solubilidade de compostos gasosos presentes no líquido, o que implica menores concentrações de CH₄, H₂, CO₂ e H₂S dissolvidos no reator, consequentemente, aumenta as suas concentrações no biogás. A composição dos gases presentes no *headspace* pode influenciar as propriedades físico-químicas e hidrodinâmicas do meio, visto que as rotas metabólicas de cultura acidogênica mista são controladas pela composição dos gases (BASTIDAS et al., 2012).

Quando bactérias termofílicas e hipertermofílicas são utilizadas, a produção de H₂ na faixa de temperatura termofílica (40-65°C) e hipertermofílica (65-80°C) apresenta algumas vantagens, dentre elas a viscosidade reduzida, melhor grau de mistura, maiores taxas de reação, baixa solubilidade de H₂ e, consequentemente, facilitação da transferência de massa da fase líquida para a fase gasosa. Além disso, as bactérias termofílicas e hipertermofílicas são capazes de realizar conversão de substratos complexos (PAWAR; NIEL, 2013; ROY; VISHNUVARDHAN; DAS, 2014). Normalmente, esses sistemas apresentam maiores produtividades e rendimentos de H₂ (KARGI; EREN; OZMIHCI, 2012b; RAMOS; SILVA, 2020). Esses fatores são principalmente atribuídos ao maior favorecimento termodinâmico, aumentando a conversão das reações químicas e biológicas, à dominância da via metabólica do

acetato e a maior tolerância a pressão parcial do H₂ (KOTSOPOULOS et al., 2006; O-THONG et al., 2011).

O efeito da temperatura na produção de H_2 pode ser justificado termodinamicamente considerando as mudanças na energia livre de Gibbs e na entalpia padrão da conversão de glicose à acetato (Equação 3) (CAI et al., 2011; SINHA; PANDEY, 2011):

$$Glicose \rightarrow \text{ Acido Acético}$$

$$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2C_2H_4O_2 + 2CO_2 + 4H_2$$
(3)

A reação utilizando NADH na redução de próton para gerar H₂ tem energia livre de Gibbs positiva (21 kJ.mol⁻¹), ou seja, é considerada desfavorável termodinamicamente. Em condições de elevada pressão parcial de H₂ os microrganismos tendem a alterar o seu metabolismo para a produção de compostos mais favoráveis termodinamicamente como EtOH (ΔG^0 -27,5 kJ.mol⁻¹) e HLa (ΔG^0 -25,0 kJ.mol⁻¹) (RAJ; TALLURI; CHRISTOPHER, 2012; PAWAR; NIEL, 2013). A partir da Figura 10 pode-se observar a variação na energia livre de Gibbs, sob diferentes temperaturas e pressões parciais de H₂.



Figura 10 - Efeito da pressão parcial de H_2 na energia livre de Gibbs na reação de redução do próton H^+ para H_2 .

Fonte: Raj, Talluri e Christopher (2012).

A reação para produção de H₂, torna-se termodinamicamente favorável em baixas pressões parciais de H₂ (10^{-4} a 10^{-6} atm), e os limites termodinâmicos para a pressão parcial de H₂ aumentam até 0,114 kPa em temperaturas entre 60°C e 80°C (RAJ; TALLURI; CHRISTOPHER, 2012). Com isso, a fim de manter um elevado fluxo de produção de H₂ pelas células dos microrganismos, a transferência de H₂ da fase líquida para a gasosa é considerada um critério primordial para alcançar altas produções de H₂. Elevadas temperaturas podem auxiliar neste processo (SONNLEITNER et al., 2012; FERREIRA et al., 2018).

A condição mesofílica é preferível à condição termofílica quando considerado o ponto de vista econômico e tecnológico, visto que a energia necessária para cultivar e manter a comunidade termofílica é aproximadamente 2,5 vezes maior que a necessária para manter a comunidade mesofílica (RAJ, TALLURI e CHRISTOPHER, 2012). Entretanto, vale salientar que no tratamento de águas residuárias despejadas em altas temperaturas a necessidade de energia para o sistema diminui consideravelmente. Como é o caso do glicerol bruto, que sai da etapa de destilação com temperatura elevada (70°C) (COSTA, 2017), e da vinhaça de cana-de-

açúcar (85 a 90°C) (FUESS et al., 2016; NOVA CANA, 2017), o que pode diminuir os custos da planta de tratamento e valorizar a cadeia produtiva do biodiesel e etanol.

A fermentação sob condições termofílicas (40-65°C) começou a atrair atenção devido a melhor eliminação de patógenos para resíduos provenientes do processo de fermentação anaeróbia, menor risco de contaminação com arqueias metanogênicas (VAN GROENESTIJN et al., 2002), maior taxa de hidrólise (LU et al., 2008) e maior rendimento de H₂ (KADAR et al., 2004). Alguns estudos foram realizados na investigação do efeito da temperatura na produção fermentativa de H₂, nas condições mesofílica (Tabela 12), termofílica e hipertermofílica (Tabela 13).

Reator	Substrato	Temperatura (°C)	TDH	HY	Referência
Batelada sequenciais	Vinhaça de Tequila	35	-	57,60 mL H ₂ .gDQO ⁻¹	Buitrón e Carvajal (2010)
Batelada	Vinhaça de milho	25	-	579,00 mL H ₂ .gDQO ⁻¹	Fernandes et al. (2010)
CSTR	Caldo de cana	37	4 h	1,00 mol H ₂ .mol de hexose ⁻¹	Pattra et al. (2011)
Batelada	Glicose	37	-	1,80 mol H ₂ .mol glicose ⁻¹	Puhakka, Karadag e Nissila (2012)
CSTR	Glicerol	35	12 h	0,77 mol H ₂ .mol glicerol consumido ⁻¹	Lo et al. (2013)
RALF	Sacarose	35	24 h	2,30 mmol H ₂ .g sacarose ⁻¹	Muñoz-Páez et al. (2013)
UASB	Glicerol	37	12 h	0,41 mol H ₂ . mol glicerol consumido ⁻¹	Reungsang et al. (2013)
Batelada	Glicerol	37	-	2,20 mol H ₂ . mol glicerol consumido ⁻¹	Rodrigues et al. (2016)

Tabela 12- Estudos realizados na faixa mesofílica para produção de H₂.

Fonte: Elaboração própria. Siglas: CSTR = reator anaeróbio continuamente agitado (*continuously stirred-tank reactor*). UASB = reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (*upflow anaerobic sludge blanket reactor*). HY= rendimento de hidrogênio. RALF = reator anaeróbio de leito fluidificado.

Reator	Substrato	Temperatura (°C)	TDH	HY	Referência
Leito fixo	Melaço	60	1,25 h	16,82 mmol.g DQO removida ⁻¹	Roy, Vishnuvardhan e Das (2014)
Quimiostato	Glicose	55	16,8 h	2,2 mol H ₂ .mol glicose ⁻¹	Zhang et al. (2015)
CSTR	Celulose	55	10 d	2,77 mol H ₂ .mol hexose ⁻¹	Jiang et al. (2015)
UASB	Sacarose	55	2 h	1,73 mol H ₂ .mol succínico ⁻¹	Braga et al. (2016)
RALF	Soro de queijo	65	4 h	5,51 mmol H ₂ .gDQO ⁻¹	Ramos e Silva (2017)
ASTBR	Vinhaça da cana-de- açúcar	70	19 h	1,8 mol H ₂ .mol glicose ⁻¹	Niz et al. (2019)
RALF	Caldo de cana-de- açúcar	55	2 h	1,52 mol H ₂ .mol hexose ⁻¹	Ferreira et al. (2019)
RALF	Vinhaça da cana-de- açúcar	55	4 h	0,34 mmol H ₂ .g DQO aplicada ⁻¹	Ramos e Silva (2020)

Tabela 13- Estudos realizados na faixa termofílica e hipertermofílica para produção de H₂.

Fonte: Elaboração própria. Siglas: CSTR = reator anaeróbio continuamente agitado (*continuously stirred-tank reactor*). UASB = reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (*upflow anaerobic sludge blanket reactor*). HY= rendimento de hidrogênio.

Wang e Wan (2008) avaliaram o efeito da temperatura (20 a 55°C) na produção de H₂. Foram utilizados reatores em batelada e glicose (1 g.L⁻¹) como substrato. Os autores relataram que a concentração de HAc aumentou com a elevação da temperatura de 20°C (3,1 mmol.L⁻¹) para 35°C (16,3 mmol.L⁻¹), porém diminuiu nas temperaturas de 35°C (17,7 mmol.L⁻¹) a 55 °C (6,9 mmol.L⁻¹). O maior HY foi registrado na temperatura de 40°C (275 mL H₂.g glicose⁻¹). Além disso, foi observado que a concentração de EtOH aumentou com a elevação da temperatura de 20°C para 35°C (0,7 - 8,1 mmol.L⁻¹), e diminuiu nas temperaturas entre 40°C e 55°C (5,9-0,9 mmol.L⁻¹). De acordo, com os autores, as mudanças nas concentrações resultam de alterações da via metabólica induzida pelas diferentes bactérias dominantes a cada temperatura.

Os efeitos da temperatura (52 a 70°C) na produção de H_2 e na comunidade microbiana podem ser verificados no trabalho realizado por Nissila et al. (2011). Os autores utilizaram celulose (5 g.L⁻¹) e culturas celulolíticas, cultivadas em batelada. Os maiores valores de rendimento de H_2 (1,4 mol H_2 .mol hexose⁻¹) e de degradação de celulose (57%) foram registrados na temperatura de 52°C.

O efeito da temperatura na estrutura e atividade da comunidade microbiana foi avaliado, em testes em batelada (25 e 85°C), por Jiang et al. (2015). Além disso, os autores analisaram a produção de H₂, utilizando 10 g celulose.L⁻¹ e TDH de 10 d, em CSTR. Nos testes em batelada, foi observado conversão de celulose entre as temperaturas de 35 a 65°C, com atividade máxima em 55°C. Contudo, o desempenho da conversão foi afetada negativamente em temperaturas acima de 55°C. No CSTR, a PVH média foi de e HY de 2,77 mol H₂.mol hexose⁻¹. Os principais metabólitos obtidos foram o acetato, butirato e etanol e a estrutura da comunidade microbiana foi dominada por microrganismos responsáveis pela hidrólise da celulose, como *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* e *Clostridium* sp.

Ramos e Silva (2017) investigaram os efeitos do TDH (0,5 a 8 h) e da temperatura (55 a 75°C) em RALFs, utilizando soro de queijo (10 g.L⁻¹) e vinhaça (10 g.L⁻¹), separadamente. A redução do TDH para 0,5 h aumentou a PVH nos dois reatores, com valores máximos de 5,36 L H₂.h⁻¹ L⁻¹ utilizando soro de queijo, e 0,71 L H₂.h⁻¹ L⁻¹ utilizando vinhaça. As condições ótimas para a produção de H₂ foram: TDH de 4 h e temperatura de 65°C, no RALF operado com soro de queijo, com HY de 5,51 mmol H₂.gDQO⁻¹. No reator com vinhaça o HY máximo foi de 1,64 mmol H₂.gDQO⁻¹, com TDH de 4 h e temperatura de 55°C. No entanto, ao aumentar a temperatura para 75°C houve redução na produção de H₂ nos dois reatores, apresentando HY de 1,20 mmol H₂.gDQO⁻¹ no RALF com soro de queijo e 0,04 mmol H₂.gDQO⁻¹ no RALF alimentado com vinhaça.

O efeito da temperatura e do TDH (8 a 1 h) na produção de H₂ foi analisado por Ferreira et al. (2019). Foram utilizados RALFs mesófilos (30°C) e termófilos (55°C) e alimentado com caldo de cana-de-açúcar (5 g DQO.L⁻¹). Os autores relataram que no RALF com temperatura de 30°C, a PVH oscilou entre 60 e 116 mL H₂.L⁻¹.h⁻¹, nos TDHs de 8 e 1 h, respectivamente. Já o HY variou entre 0,60 e 0,10 mol H₂.mol hexose⁻¹, nos TDHs de 8 e 1 h, respectivamente. No RALF termofilico (55°C), a diminuição no TDH de 8 para 1 h elevou a PVH de 191 mL H₂.L⁻¹.h⁻¹ no TDH de 4 h para 501 mL H₂.L⁻¹.h⁻¹ no TDH de 1 h. O HY máximo (1,52 mol H₂.mol hexose⁻¹) foi observado no TDH de 2. Neste estudo, o melhor desempenho na produção de H₂ foi registrado no RALF termofílico, decorrente da fermentação do tipo etanol com a produção de HAc (7,70%), EtOH (7,90%) e HBu (7,20%).

Desta forma, muitos trabalhos são realizados utilizando temperaturas termofílicas visando produzir H₂. Tahti, Kaparaju e Rintala (2013) avaliaram a produção de H₂, sob condições hipertermofílicas (70°C), utilizando UASB e glicose (5 g.L⁻¹) como fonte de carbono. No reator acidogênico, o máximo HY (0,73 mol.mol glicose⁻¹) e PVH de 2,07 L H₂.L⁻¹.d⁻¹ foram obtidos no TDH de 5h. Os autores atribuíram o baixo valor de HY a característica do inóculo utilizado e/ou ao acúmulo de ácidos como produtos finais, acarretando em pH efluente de 3,7. Além disso, a utilização do substrato foi incompleta (67%), o que pode estar relacionado com o curto TDH adotado (5 h). Os principais metabólicos solúveis detectados ao longo do experimento foram HBu (300-540 mg.L⁻¹), HAc (260-400 mg.L⁻¹) e EtOH (50-350 mg.L⁻¹).

A desempenho da produção de H₂ em reator de leito fixo (60°C) e os efeitos da razão de recirculação (entre 0,4 e 1) e TDH (10 a 1 h) foram avaliadas por Roy, Vishnuvardhan e Das (2014). O melaço foi utilizado como substrato e a TCO variou entre 33,6 e 168 kg DQO.m⁻³.d⁻¹. A PVH apresentou perfil crescente com a redução do TDH até 1,25 h e aumento da razão de recirculação para 0,6, com valor máximo de 1,7 L H₂.L⁻¹.h⁻¹ com máximo HY de 16,82 mmol.g DQO removida⁻¹. Ao analisar a degradação do substrato e a transferência de massa externa na produção de H₂, foi inferido que a contribuição do coeficiente de transferência de massa foi maior que a degradação de substrato, mesmo em valores maiores de TDH. Isso indica a vantagem da temperatura termofílica em maior mobilidade cinética das moléculas, contribuindo para a elevação da transferência de massa.

Zhang et al. (2015) caracterizaram a distribuição metabólica da glicose na fermentação termofílica (55°C) de H₂ com cultura mista. Os autores utilizaram quimiostato para avaliar o efeito do pH, pressão parcial de H₂ e concentração afluente de glicose nos metabólitos produzidos. Os experimentos foram conduzidos no TDH de 0,7 d variando o pH (4,0 a 7,0), pressão parcial de H₂ (0,05 a 0,62 atm) e concentrações de glicose (5,0 a 19,5 g.L⁻¹, equivalendo

a 27,5 e 108,5 mmol glicose.L⁻¹.). Com o aumento do pH de 4,0 para 7,0 foi observada mudança da composição dos metabólitos de acetato, butirato e H₂ para acetato, etanol, propionato e formiato. A redução da pressão parcial de H₂ não alterou o HY ou a distribuição dos metabólitos. O máximo HY (2,2 mol H₂.mol glicose⁻¹) foi obtido com 27,5 mmol glicose.L⁻¹, enquanto que a maior produtividade (7,9 L H₂.L⁻¹.d⁻¹) foi observada na concentração de 76,3 mmol glicose.L⁻¹.

Utilizando substrato sintético à base de sacarose, Braga et al. (2016) avaliaram a produção de H₂ em UASB, com variações na TCO aplicada (55°C). Foram estudados três TDHs diferentes 12, 6 e 2 h, correspondente a TCO de 4, 8 e 24 g DQO.L⁻¹.d⁻¹, respectivamente. Os maiores valores médios de PVH (75,33 mL H₂.L⁻¹.h⁻¹) e HY (1,73 mol H₂.mol-succínico⁻¹) foram obtidos no TDH de 2 h. O aumento da TCO de 8 para 24 g DQO.L¹.d⁻¹ ocasionou acréscimo no HY (0,84 para 1,73 mol H₂.mol-suc⁻¹). A via de EtOH mostrou-se favorável à produção de H₂, com concentração máxima de 6,76 mmol.L⁻¹ alcançada no TDH de 2 h.

Koyama et al. (2016), investigaram a cinética da fase acidogênica durante a digestão anaeróbia da vinhaça da cana-de-açúcar (349,2- 5.634,8 mg carboidrato totais.L⁻¹), em reatores com células imobilizadas (55°C). A taxa máxima de conversão de substrato (rmax), a constante de saturação do substrato (Ks) e a constante de inibição pelo excesso de substrato (Kis) foram determinadas usando vinhaça com (pH 6,5) e sem ajuste de pH (pH 4,8). Os valores de rmax obtidos foram semelhantes, com valores de 0,87 e 0,95 mg carboidratos totais. g SV⁻¹.h⁻¹ para sistemas com e sem ajuste de pH, respectivamente. Os Ks obtidos no sistema sem ajuste de pH (4.129,6 mg carboidratos totais.L⁻¹). Nenhuma inibição por excesso de substrato foi detectada no sistema sem ajuste de pH, indicando que a vinhaça da cana-de-açúcar pode ser usada para produzir H₂ sem custos de entrada com ajuste de pH.

A fermentação escura de vinhaça de cana-de-açúcar, em reator anaeróbio de leito estruturado (ASTBR) hipertermofílica (70°C), foi investigada por Niz et al. (2019). Foram avaliados diferentes TDHs (19, 15, 12 e 8 h), correspondente a TCO de 100, 55, 55 e 39 g DQO.L⁻¹.d⁻¹, respectivamente. O TDH mais alto implicou maior PVH (690 mL H₂.d⁻¹L⁻¹), maior HY (1,8 mol H₂.mol glicose⁻¹) e maior estabilidade. A temperatura extrema inibiu a produção de polímeros extracelulares dos microrganismos, resultando em crescimento disperso e impedindo o acúmulo excessivo de biomassa. A principal via de produção de H₂ foi pela via láctica/ácido acético, que são dependentes do pH. Os principais gêneros envolvidos na produção de H₂ a 70°C foram *Clostridium, Pectinatus, Megasphaera* e *Lactobacillus*.

Os autores Ramos e Silva (2020) avaliaram a viabilidade de produção de H₂, sob condição termofílica (55°C), a partir da vinhaça de cana-de-açúcar (10 g DQO.L⁻¹). O experimento foi realizado em RALF, com TDH de 4 h. Foram obtidos resultados de PVH máxima de 1,30 L H₂.L⁻¹.d⁻¹ e HY de 0,34 mmol H₂.g DQO aplicada⁻¹. O baixo valor de HY alcançado foi decorrente da presença excessiva de compostos recalcitrantes e tóxicos presentes na vinhaça de cana-de-açúcar. Os principais metabólitos observados foram HAc (18,8 - 179 mg.L⁻¹), HBu (31,4 - 2144 mg.L⁻¹), HPr (13,2 - 761 mg.L⁻¹), HLa (10,2 - 711 mg.L⁻¹), ácido capróico (HCa) (10,2 - 921 mg.L⁻¹) e ácido isobutírico (HIsBu) (16,2 - 1108 mg.L⁻¹).

3.6 CONSIDERAÇÕES PRELIMINARES

Fundamentado nas informações até aqui discorridas, a aplicação da digestão anaeróbia para a produção de H_2 é uma alternativa promissora para a diversificação da atual matriz energética. Entretanto, um dos principais desafios da aplicação industrial deste processo é a viabilidade econômica, dependendo principalmente da fonte de substrato utilizada. A seleção do substrato baseia-se na disponibilidade, no custo, na pureza e na biodegradabilidade do substrato.

No cenário brasileiro atual, a produção de etanol tende a elevar-se cada vez mais e, consequentemente, gerar maior volume de vinhaça como subproduto. A produção brasileira de biodiesel também tem sido crescente. Tais fatores acarretam acúmulo de vinhaça e glicerol no meio ambiente. Atualmente a principal aplicação de vinhaça é a fertirrigação, tal prática pode causar impactos no solo e nos corpos d'água a longo prazo. Quanto ao glicerol, os processos de purificação do mesmo conferem elevados custos. Nesse contexto, os principais subprodutos da indústria de etanol e biodiesel, a vinhaça e o glicerol, vêm sendo amplamente estudados em processos fermentativos para a obtenção de produtos de interesse nos últimos anos.

Há muitos trabalhos na literatura avaliando a codigestão de vinhaça com diversos substratos, para produção de H₂ e/ou CH₄, como glicerol e esgoto doméstico, melaço, soro de leite, soro de queijo, entre outros. Da mesma forma, existem diversos trabalhos relacionados a codigestão de glicerol com vários substratos para produção de 1,3-PDO, H₂ e/ou CH₄, como material lignocelulósico, água residuária proveniente do processamento de batata, esterco bovino, lactose, estrume suíno, entre outros. Contudo, estudos com a codigestão de vinhaça de cana-de-açúcar e glicerol para produção de H₂ e 1,3-PDO, em RALF, ainda não foram relatados na literatura de referência. Portanto, desenvolver pesquisas avaliando a codigestão de ambos pode render resultados favoráveis em relação a produção de H₂ e 1,3-PDO.

Além disso, estudos na faixa termofílica e hipertermofílica estão em menor quantidade na literatura de referência, quando comparados com os estudos realizados na faixa mesofílica. Os processos termofílicos e hipertermofílicos geralmente apresentam maiores produtividades e rendimentos de H₂ e são interessantes na aplicação industrial, principalmente nos casos em que os subprodutos são lançados sob altas temperaturas, como a vinhaça e o glicerol. Entretanto, deve-se avaliar a condição ótima de operação, pois quanto maior a complexidade do substrato, menor será a temperatura ótima para produção de H₂ devido a diminuição da diversidade microbiana que reduz a capacidade sinergética de degradação do substrato pela comunidade.

O desenvolvimento, a adaptação e a operação dos reatores para produção fermentativa de H₂ e 1,3-PDO ainda representam desafios e requerem pesquisas futuras nas diferentes configurações de reatores, como o RALF. Devido às vantagens operacionais desta configuração como o melhor contato entre o substrato e a comunidade microbiana, alta eficiência em elevadas taxas de carregamento orgânico e transferência de massa aprimorada, optou-se pela utilização desta configuração no presente trabalho. Além da configuração do reator, a proporção de substratos utilizados na codigestão pode exercer influência na produção de H₂ e 1,3-PDO. Estudos avaliando a influência de diferentes proporções de vinhaça e glicerol na codigestão ainda não foram relatados na literatura de referência.

Dado o exposto, pode-se inferir que a digestão anaeróbia sob condições termofílica e hipertermofílica é uma alternativa para minimizar passivos ambientais provenientes da vinhaça de cana-de-açúcar e glicerol e, consequentemente, gerar energia na forma de biogás. A contribuição deste estudo para a literatura será a avaliação da codigestão de vinhaça de cana-de-açúcar e glicerol, em diferentes proporções, para a produção de H₂ e 1,3-PDO em RALF; e o estudo do efeito da temperatura, nas faixas termofílica e hipertermofílica, na produção de H₂ e 1,3-PDO.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo estão apresentadas as metodologias empregadas e equipamentos utilizados para o desenvolvimento deste trabalho. A operação dos reatores e as análises físicoquímicas foram realizadas no Laboratório de Controle Ambiental II (LCA II), do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

4.1 REATOR ANAERÓBIO DE LEITO FLUIDIFICADO

Visando atingir os objetivos propostos, foram utilizados três RALFs com 10 g DQO.L⁻ ¹, fornecidas por diferentes proporções de vinhaça de cana-de-açúcar e glicerol, em cada reator. Os reatores utilizados são construídos em aço inox de 2 mm de espessura, com 148,7 cm de altura, diâmetro interno de 3,6 cm e 1,55 L de capacidade total individual (volume total). Para melhor compreensão e praticidade ao longo da apresentação da metodologia e dos respectivos resultados os reatores foram identificados, conforme apresentado na Figura 11.





Fonte: Elaboração própria (2020).

O controle de temperatura foi efetuado por meio de banho ultratermostatizado, com operação em faixa termofílica e hipertermofílica (55, 60 e $65 \pm 1^{\circ}$ C), promovendo a troca de calor com a circulação da água pela camisa externa dos reatores, por onde circulava a água proveniente do banho, além de serpentina em formato de "U" no interior do reator. Além disso, a recirculação foi realizada por bombas de deslocamento positivo, a fim de homogeneizar o meio fermentativo e fluidizar o leito dos reatores.

O modelo de instalação dos RALF utilizados no presente estudo está ilustrado nas Figuras 12 e 13. Na Figura 12, é possível identificar: (1) tanque de água residuária (afluente), (2) bomba de alimentação do afluente, (3) reator de leito fluidificado, (4) banho ultratermostatizado, (5) compartimento de separação gás-líquido, (6) saída para medição e análise de gases, (7) saída do efluente e (8) bomba de recirculação. A configuração do sistema é idêntica para os três reatores. A Figura 12 exibe a instalação experimental do RALF, representando os três reatores com configurações idênticas.





Fonte: Elaboração própria (2020).



Figura 13- Instalação experimental do Reator Anaeróbio de Leito Fluidificado (RALF).

Fonte: Elaboração própria (2020).

4.2 SUBSTRATOS E MEIO NUTRICIONAL

A vinhaça utilizada na alimentação dos RALFs foi proveniente da Usina São Martinho, que realiza o processamento de cana-de-açúcar e produção de álcool e açúcar, localizada em Pradópolis (SP). Após a coleta, a água residuária foi armazenada em reservatórios plásticos de polipropileno (15 L), mantidos em freezer (-20°C) antes do uso, a fim de preservar as características físico-químicas da água residuária. Os aspectos físico-químicos da vinhaça coletada estão descritos na Tabela 14.

Parâmetro	Concentração	
рН	4,6 ± 0,1	
DQO (mg. L^{-1})	29.464,5 ± 1201,0	
Carboidrato (mg.L ⁻¹)	$7.543,9 \pm 1.814,1$	
Glicerol (mg.L ⁻¹)	$849,6 \pm 33,9$	
Sulfato (mg.L ⁻¹)	$1.966,7 \pm 471,4$	
Sólidos suspensos totais (mg.L ⁻¹)	$3.900,0 \pm 300,0$	
Sólidos suspensos voláteis (mg.L ⁻¹)	$2.720,5 \pm 520,5$	

Fonte: Elaboração própria

O glicerol utilizado neste trabalho foi proveniente da indústria Biobrotas Oleoquímica, localizada na cidade de Brotas (SP), sendo também denominado de glicerina bi-destilada, com composição de 99,50% de glicerol. Na Tabela 15 estão apresentadas algumas especificações técnicas do glicerol utilizado neste trabalho.

Tabela 15- Especificações técnicas do glicerol. Especificações do glicerol				
Teor de glicerol	Mínimo. 99,50%			
Teor de água	Máximo. 0,50%			
Gravidade específica a 20°C	1,260			
Cinzas	Máximo 0,01%			
Teor de cloreto de sódio	Máximo 0,001%			
pH solução a 10% em água destilada	7,0-7,5			

Fonte: Biobrotas Oleoquímica.

Ademais, a fim de assegurar o desenvolvimento dos microrganismos foram adicionados suplementos inorgânicos à alimentação, como fonte de macro e micronutrientes (Tabela 16),

conforme descrito por Del Nery (1987) e utilizado por Santos et al. (2014c), Costa (2017) e Ramos e Silva (2020).

Composto	Concentração (mg.L ⁻¹)
KH ₂ PO ₄	85,00
K ₂ HPO ₄	21,70
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	33,40
NiSO ₄	1,00
FeSO ₄ .7H ₂ O	5,00
(NH ₂) ₂ CO	125,00
CaCl ₂	47,00
CoCl ₂	0,08
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,50
SeO ₂	0,07

Tabela 16- Soluções de nutrientes adicionada à alimentação.

Fonte: Del Nery (1987).

4.3 INÓCULO E MATERIAL SUPORTE

O inóculo utilizado para codigestão de vinhaça de cana-de-açúcar e glicerol no presente trabalho foi proveniente de lodo metanogênico termofílico, oriundo de reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*, UASB) utilizado para o processamento de vinhaça, localizado na Usina São Martinho (Pradópolis – SP).

Objetivando-se a seleção das bactérias produtoras de H₂, o lodo termofílico foi tratado termicamente de acordo com a metodologia proposta por Kim, Han e Shin (2006). O método consistiu em aquecer o lodo a temperatura de 90 °C por 10 minutos, sob constante homogeneização. Em seguida, o lodo foi submetido a um choque térmico em banho de gelo até atingir a temperatura de 25 °C (MAINTINGUER et al., 2008).

O material suporte utilizado para imobilização e adesão da biomassa foi a argila expandida (cinasita) (Figura 14). Este material suporte foi escolhido como material suporte devido aos trabalhos realizados pelo grupo de pesquisa do LCAII/DEQ/UFSCar (BARROS et al., 2010 e BARROS et al., 2012), os quais relataram elevado rendimento de H₂ e maior quantidade de

biomassa aderida quando comparado à outros materiais suporte, como poliestireno, polietileno e pneu triturado.

A granulometria das partículas não uniformes de cinasita foi obtida através de peneiramento. Após essa seleção, a cinasita foi imersa em água e as partículas com densidade superior a densidade da água foram selecionadas e secas em estufa a 55°C. As condições fluidodinâmicas dos reatores, tais como velocidade mínima de fluidização e vazão de recirculação para os materiais suporte, foram calculadas a partir de dados experimentais de velocidade superficial e perda de carga, descritas por Amorim (2009) para a cinasita. As características físicas da cinasita estão apresentadas na Tabela 17.

Figura 14 - Partículas de cinasita utilizadas nos reatores.



Fonte: Elaboração própria (2020).

Partícula	Diâmetro(mm)	Densidade(g.cm ⁻³)	% Porosidade	Vmf (cm.s ⁻¹)
Argila expandida	2,8-3,35	1,5	23	1,24

Tabela 17- Características físicas do material suporte.

Fonte: Amorim et al. (2009). Siglas: Vmf – Velocidade de mínima fluidização.

4.4 PROCEDIMENTO DE PARTIDA DOS REATORES

Foram realizados os ajustes das vazões das bombas de alimentação e de recirculação dos reatores. A vazão de recirculação foi mantida entre 58,8 L.h⁻¹, calibrada de modo a alcançar expansão de 30% do leito e velocidade superficial 1,3 vezes maior que a velocidade mínima de fluidização. A partida ocorreu de maneira semelhante para o RALF 1, RALF 2 e RALF 3,

realizada em modo batelada (recirculação), a fim de promover a acomodação da biomassa no material suporte e adaptá-la ao substrato.

Os afluentes preparados para a fase de inoculação foram constituídos de vinhaça de canade-açúcar e glicerol. Devido a ausência de trabalhos na literatura de referência avaliando a codigestão destes substratos, diferentes proporções foram investigadas neste estudo (RALF 1: 75% DQO vinhaça + 25% DQO glicerol; RALF 2: 50% DQO vinhaça + 50% DQO glicerol; RALF 3: 25% DQO vinhaça + 75% DQO glicerol). No afluente também continha meio nutritivo, descrito por Del Nery (1987), e inóculo pré-tratado termicamente na concentração de 10% do volume total do barrilete utilizado na inoculação, conforme realizado por Santos et al., (2014c), Costa (2017) e Ramos e Silva (2020).

A concentração inicial de substratos utilizados na inoculação foi de 5 g.L⁻¹, com diferentes proporções de substratos em cada reator (RALF 1: 75% DQO vinhaça + 25% DQO glicerol; RALF 2: 50% DQO vinhaça + 50% DQO glicerol; RALF 3: 25% DQO vinhaça + 75% DQO glicerol). Após o consumo de 80% dos carboidratos e glicerol adicionados anteriormente, a concentração do barrilete foi elevada para 10 g.L⁻¹, concentração estabelecida para operação dos reatores de acordo com o trabalho de Ramos e Silva (2020). O pH foi ajustado entre 4,0 e 5,0, mediante a adição de ácido clorídrico (30% v.v⁻¹), com a finalidade de inibir o desenvolvimento de arqueias metanogênicas e manter o pH em faixa favorável à produção de H₂. A fim de estabelecer a condição anaeróbia nos sistemas, gás nitrogênio foi injetado nos barriletes e no topo dos reatores, durante 10 minutos. Neste modo de operação o pH, os carboidratos e o glicerol foram medidos diariamente, a fim de avaliar a adaptação ao substrato e manter o pH em faixa inibidora ao desenvolvimento de arqueias metanogênicas. Esta etapa garantiu a adaptação dos microrganismos aos substratos e adesão do biofilme formado no material suporte. O procedimento de partida dos reatores durou 7 dias.

Ao constatar a adaptação da biomassa aos substratos, pela elevada conversão de carboidratos e consumo de glicerol (> 80%), os sistemas e passaram a ser operados em modo contínuo, com renovação diária da alimentação. A Figura 15 expõe, resumidamente, a estratégia de operação adotada para partida dos reatores (RALF 1: 75% DQO vinhaça + 25% DQO glicerol; RALF 2: 50% DQO vinhaça + 50% DQO glicerol; RALF 3: 25% DQO vinhaça + 75% DQO glicerol).

Figura 15 - Estratégia de operação adotada para partida dos reatores.

Modo batelada (recirculação)

Fluxo contínuo



Fonte: Elaboração própria (2020).

4.5 CONDIÇÕES OPERACIONAIS

Para o início da operação em modo contínuo, as bombas dosadoras foram conectadas aos barriletes e entradas dos reatores. Os barriletes afluente passaram a ser renovados diariamente, com meio nutricional, vinhaça e glicerol nas devidas proporções para cada reator: RALF 1 (75% DQO vinhaça + 25% DQO glicerol); RALF 2 (50% DQO vinhaça + 50% DQO glicerol); e RALF 3 (25% DQO vinhaça + 75% DQO glicerol). As diferentes proporções de substratos foram aplicadas com o propósito de verificar a influência das mesmas na produção fermentativa de H₂ e 1-3-PDO. O TDH e a concentração de substrato nos reatores foram fixados, em todas as fases, em 4 h e 10 g DQO.L⁻¹, respectivamente, tendo como base o trabalho realizado por Ramos e Silva (2020). A distinção entre os três reatores se deu nas proporções de vinhaça e glicerol aplicadas.

As fases de operação dos reatores foram estabelecidas em função do aumento da temperatura na faixa termofilica e hipertermofílica (55, 60 e 65°C). A mudança de fase foi realizada ao observar estabilidade nos parâmetros de produção de H₂ (composição do biogás, HY e PVH), conversão de carboidratos e consumo de glicerol. Nas fases em que não houve produção de H₂, a mudança de fase ocorreu pela constatação de estabilização do sistema em relação à produção de 1,3-PDO, conversão de carboidratos e consumo de glicerol. A operação dos reatores foi realizada durante 120 dias. A Figura 16 sintetiza a estratégia de operação dos RALFs 1, 2 e 3.

Figura 16 - Representação esquemática da estratégia de operação dos reatores.



Fonte: Elaboração própria (2020).

4.6 MÉTODOS ANALÍTICOS

O desempenho dos reatores foi avaliado a partir de análises físico-químicas, medidas de produção volumétrica de biogás e determinação de sua composição, além da determinação das concentrações de ácidos orgânicos, álcoois, sólidos suspensos totais (SST) e sólidos suspensos voláteis (SSV). Amostras afluentes e efluentes foram coletadas, diariamente, para análises físico-químicas e metabólicas em todo o período operacional dos reatores. As análises foram feitas em triplicata, utilizando como resultados os valores médios obtidos, exceto os valores discrepantes (*outliers*), os quais foram desconsiderados. Além das análises efetuadas, foram realizadas medidas diárias de vazão, pH e altura do leito.

4.6.1 Análises Físico-Químicas

As medidas de pH, demanda química de oxigênio (DQO), sólidos suspensos voláteis (SSV) e totais (SST), foram realizadas com base no *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2012).

4.6.2 Determinação de Carboidratos

A determinação de carboidratos total afluente e efluente foi realizada em triplicata por método colorimétrico segundo Dubois et al. (1956).

4.6.3 Determinação da Concentração de Glicerol

A quantificação de glicerol no afluente e efluente dos reatores foi determinada por meio de metodologia adaptada pela técnica espectrofotométrica proposta por Bondioli e Della Bella (2005).

4.6.4 Determinação da Produção e Composição do Biogás

A medição da produção volumétrica do biogás gerado foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Walker et al. (2009), em que o volume do biogás é mensurado baseado no deslocamento da coluna contendo uma solução salina e acidificada. As condições das soluções salinas acidificadas foram determinadas com base nas mudanças das características do biogás. Desta forma, a acidificação e salinização das soluções tinham como intuito barrar a dissolução do biogás no meio líquido.

A análise para determinação dos componentes presentes no biogás produzido foi realizada por Cromatografia Gasosa de acordo com a metodologia exposta por Santos et al. (2014). Para tanto, 1,0 mL de amostra do biogás foi coletada no dos reatores utilizando-se uma seringa gás tight. O teor de H₂ (% H₂) foi determinado pela quantidade de H₂, em moles, dividida pela quantidade total de todos os constituintes (H₂ e CO₂), expresso em moles. Os limites de detecção para a análise da composição do biogás por cromatografia foram 0,902 µmol para H₂ e 0,474 µmol para o CO₂. O gás coletado foi analisado em cromatógrafo gasoso da marca Shimadzu modelo GC-2010, Japan, equipado com detector de condutividade térmica (TCD) e coluna capilar Carboxen 1010 PLOT (30 m x 0,53 mm) Sigma-Aldrich, sendo o argônio utilizado como gás de arraste.

As condições cromatográficas utilizadas são descritas a seguir:

- Temperatura do injetor: 30°C;
- Temperatura do detector: 200°C;
- Temperatura da coluna: 230°C;
- Vazão do gás de arraste (Ar): 5,66 mL min⁻¹.

4.6.5 Análise de Metabólitos Solúveis

Para a determinação e quantificação dos ácidos orgânicos voláteis e álcoois, foi aplicada cromatografia gasosa, em que o gás coletado no headspace foi analisado em cromatógrafo da marca Shimadzu, modelo GC-17A, equipado com detector de ionização de chama (*FID, Flame Ionization Detector*) e coluna capilar DB-WAX, de 30m x 0,25mm x 0,25µm, sendo o H₂ o gás de arraste. As condições cromatográficas utilizadas são descritas a seguir:

- Rampa de Temperatura: 35°C (0') 2°C/min 42°C (0') 20°C/min 75°C (0') 35°C/min 120°C
- (1') 10°C/min 170°C (2')
- Temperatura do injetor: 250°C
- Temperatura do detector: 280°C
- Razão de Split: 10
- Fluxo do gás de arraste (H₂): 50 mL.min⁻¹
- Fluxo do make-up ou gás auxiliar (N₂): 35 mL.min⁻¹
- Fluxo do gás de chama (ar sintético): 500 mL.min⁻¹
- Fluxo da coluna: 1,56 mL.min⁻¹
- Velocidade linear: 34,3 cm.s⁻¹

4.6.6 Frequência das Análises

A Tabela 18 apresenta a frequência de realização das análises mencionadas ao longo do capítulo, bem como as metodologias utilizadas.

Análise	Frequência	Metodologia
рН	Diária	APHA et al. (2012)
DQO	Diária	APHA et al. (2012)
SST e SSV	Diária*	APHA et al. (2012)
Vazão	Diária	-
Carboidratos	Diária	Dubois et al. (1956)
Produção volumétrica	Diária	Walker et al. (2009)
Glicerol	Diária	Bondioli e Della Bella (2005)
Ácidos voláteis	Diária*	Penteado et al. (2013)
Álcoois	Diária*	Paranhos e Silva (2018)
Composição do biogás	Diária	Santos et al. (2014)

Tabela 18- Análises realizadas em amostras afluentes e efluentes dos RALFs.

Fonte: Elaboração própria (2020).

*As análises foram realizadas diariamente após observar o estado estacionário dos RALFs.

4.7 Cálculo dos Principais Indicadores de Desempenho

Este item apresenta as principais fórmulas utilizadas para a análise desse estudo, os quais abrangem a PVH (Equação 10), o HY (Equação 11), o rendimento de 1,3-PDO (Equação 12), e a produção volumétrica de 1,3-PDO (Equação 13). A PVH relaciona a produção de H₂ por unidade de tempo com o volume de leito do reator, baseado nos fundamentos de reatores de leito fluidificado. A PVH é calculada da seguinte forma:

$$PVH = \frac{V_{H2}}{V_{leito}} \tag{10}$$

sendo VH₂ a taxa de produção volumétrica de hidrogênio (L H₂.d⁻¹) e V_{leito} o volume do leito de partículas fluidificado (L), vale salientar que esse indicador considera apenas o volume reacional onde está localizada a comunidade microbiana imobilizada. A PVH é a produtividade volumétrica de hidrogênio (L H₂.d⁻¹.L⁻¹).

O rendimento por carga aplicada é de interesse para determinar a capacidade de produção em função de quanto for alimentado.

$$HY = \frac{n_{H2}}{TCO_{AplicadaReal}} \tag{11}$$

Onde HY é o rendimento molar de hidrogênio produzido por carga aplicada (mmol $H_{2.g} DQO_{aplicada}$ ⁻¹) e n_{H2} é a taxa de produção molar de hidrogênio (mmol $H_{2.dia}$ ⁻¹).

O rendimento e a produtividade volumétrica de 1,3-PDO foram calculados e analisados em termos de mol de produto gerado por mol de glicerol consumido, conforme descrito nas equações abaixo:

$$1,3 - PDOY = \frac{Concentração de 1,3 PDO produzido}{Glicerol_{inicial} - Glicerol_{final}}$$
(12)

$$1,3 - PDOY' = \frac{Concentração de 1,3 PDO produzido}{TDH_{teórico}}$$
(13)

Sendo 1,3-PDOY o rendimento (mol. mol glicerol⁻¹) a relação entre a concentração de 1,3-PDO produzido (mol. d⁻¹) e o consumo de glicerol (mol. d⁻¹). Já 1,3-PDOY' a produção volumétrica de 1,3PDO (g L⁻¹h⁻¹), representa a relação entre a concentração de 1,3 PDO produzido (g L⁻¹), e o TDH teórico (h).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente capítulo são discutidos os resultados obtidos a partir da avaliação do efeito da temperatura na faixa termofílica e hipertermofílca (55, 60 e 65°C) em três RALFs com diferentes proporções de vinhaça de cana-de-açúcar e glicerol. (RALF 1: 75% da DQO da vinhaça + 25% da DQO do glicerol; RALF 2: 50% da DQO da vinhaça + 50% da DQO do glicerol; e RALF 3: 25% da DQO da vinhaça + 75% da DQO do glicerol).

5.1 CONVERSÃO DE CARBOIDRATOS

As conversões médias de carboidratos em cada fase operacional dos reatores estão apresentadas na Tabela 19.

100010		e conversoes mea	au de cursorarue	nos reatores.
Fases	Temperatura °C	Cab _{aflu} (g.L ⁻¹)	Cab _{eflu} (g L ⁻¹)	Conversão (%)
RALF 1	-	-	<u>.</u>	
1	55	$1,46 \pm 0,13$	$0,\!68 \pm 0,\!12$	$50,6 \pm 11,5$
2	60	$1,\!41\pm0,\!17$	$0,\!73\pm0,\!12$	$44,3 \pm 8,5$
3	65	$1,\!67\pm0,\!37$	$1,\!21 \pm 0,\!26$	$27,8\pm3,0$
RALF 2				
1	55	$0,60 \pm 0,12$	$0,36 \pm 0,11$	$40,2 \pm 13,9$
2	60	$0,\!93\pm0,\!16$	$0{,}59\pm0{,}08$	$36,6 \pm 3,9$
3	65	$1{,}29\pm0{,}04$	$0,\!75\pm0,\!14$	$25{,}3\pm9{,}7$
RALF 3				
1	55	$0{,}38\pm0{,}07$	$0,\!17\pm0,\!09$	39,6 ± 1,4
2	60	$0,\!70\pm0,\!13$	$0{,}29\pm0{,}06$	$49,0\pm8,6$
3	65	$0,\!43\pm0,\!09$	$0,\!35\pm0,\!05$	$19,7\pm5,8$

Tabela 19- Concentrações e conversões médias de carboidrato nos reatores.

Fonte: Elaboração própria (2020). Cab_{afl}: carboidrato afluente; Cab_{efl}: carboidrato efluente. RALF 1 (75% DQO vinhaça + 25% DQO glicerol); RALF 2 (50% DQO vinhaça + 50% DQO glicerol); e RALF 3 (25% DQO vinhaça + 75% DQO glicerol).

No RALF 1, o aumento da temperatura ocasionou um decréscimo na conversão média de carboidratos, entre as fases 1 (55°C) e 3 (65°C), tendo em vista que a maior conversão

ocorreu quando a temperatura estava em 55°C (50,64 \pm 11,47%), e a menor foi obtida quando a temperatura estava em 65°C (27,81 \pm 3,05%). Na Figura 17 é possível visualizar que houve maior dispersão dos dados de conversão de carboidratos na 1° fase (55°C). Além disso, é possível observar que, em todas as fases, a mediana apresentou assimetria, indicando que a média aritmética foi influenciada por valores extremos de conversão de carboidratos.





Fonte: Elaboração própria (2020).

O comportamento observado no RALF 2 foi similar ao RALF 1, visto que a maior conversão de carboidratos ocorreu na temperatura de $55^{\circ}C$ ($40,20 \pm 13,92\%$) e a menor ocorreu na temperatura de $65^{\circ}C$ ($25,34 \pm 9,70\%$) (Tabela 19). Com isso, pode-se inferir que, a conversão de carboidratos foi afetada com o aumento da temperatura. A Figura 18 apresenta maior dispersão dos dados na fase 1 ($55^{\circ}C$), enquanto que, nas fases 2 e 3 ($60 e 65^{\circ}C$), houve maior constância nos dados de remoção de carboidratos, pois a mediana encontra-se próxima ao centro do boxplot.

No RALF 3 o comportamento foi levemente distinto, tendo em vista que, houve um aumento na conversão de carboidratos com o aumento da temperatura, entre as fases 1 e 2 (55 e 60°C). A maior conversão de carboidratos ocorreu quando a temperatura estava em 60°C (49,02 \pm 8,60%). O aumento da temperatura de 60 para 65°C ocasionou um decréscimo na conversão de carboidratos, apresentando o menor valor de conversão (19,16 \pm 5,80%), evidenciando, assim, a temperatura de 60°C como ponto ótimo, dentre as analisadas, para conversão de carboidratos (Figura 19).



Figura 18 - Boxplot das conversões de carboidratos no RALF 2.

Fonte: Elaboração própria (2020).



Figura 19- Boxplot das conversões de carboidratos no RALF 3.

Na Figura 20, pode-se observar que, nos três reatores, os valores de conversão de carboidratos se mantiveram relativamente próximos, apesar das diferentes proporções de substratos utilizadas. Pode-se sugerir que os carboidratos afluentes foram convertidos em energia intrínseca para o crescimento da biomassa ativa nos reatores, ácidos orgânicos e, em

Fonte: Elaboração própria (2020).

algumas fases, em H₂ e dióxido de carbono (BERNAL, 2018). Neste estudo, verificou-se que, embora constatada a produção de hidrogênio, em algumas fases (item 5.4), não houve consumo completo de substrato. A faixa de incerteza mostrada na Figura 20 é baseada em um desvio padrão (\pm) dos valores medidos durante a operação dos reatores.



Figura 20 - Eficiências de conversões de carboidratos nos reatores.

Também operando RALF, em temperatura termofílica (55°C), Santos et al. (2014a) registraram consumos de carboidratos entre 27,1 e 52,6%, utilizando uma mistura de 33% DQO de glicose e 67% DQO de vinhaça (5 g DQO.L⁻¹). As eficiências de remoção de carboidratos, durante a operação do reator, indicaram que não ocorreu um consumo completo dos substratos, assim como foi observado no presente trabalho. Além disso, os valores de conversão de carboidratos obtidos pelos autores foram similares aos valores observados nos RALFs do presente estudo (19,7 – 50,6%).

Os mesmos autores, Santos et al. (2014b), operaram RALFs termofílicos (55°C), utilizando vinhaça bruta (30 g DQO.L⁻¹) e diluída (10 g DQO.L⁻¹) como substratos. No reator operado com vinhaça bruta obtiveram valores de conversões de carboidratos entre 36,6 e 52,2%, enquanto que no reator alimentado com vinhaça diluída as conversões variaram entre 47,0 e 49,9%. Os valores observados neste trabalho (19,7 – 50,6%) são condizentes com os valores relatados pelos autores. Além disso, apesar das diferentes concentrações afluentes utilizadas pelos autores (10 e 30 g DQO.L⁻¹), foram atingidas conversões semelhantes nos dois reatores.

Fonte: Elaboração própria (2020).

O que indica que a configuração do RALF foi capaz de suportar cargas orgânicas elevadas, mesmo com a utilização de um substrato complexo como a vinhaça de cana-de-açúcar.

Também utilizando vinhaça de cana-de-açúcar (36,2 g DQO.L⁻¹), Ferraz Júnior et al. (2014), operaram quatro reatores de leito fixo empacotado, sob temperatura termofílica (55°C). Os autores registraram eficiências de conversão de carboidratos entre 67,3 e 79,4%. Utilizando as mesmas condições de Ferraz Jr et al. (2014), Fuess et al. (2016) obtiveram conversão média de carboidratos de 63,6%. Os valores de conversão de carboidratos registrados por Ferraz Júnior et al. (2014) e Fuess et al. (2016) em reatores de leito fixo foram relativamente maiores que os valores registrados nos trabalhos de Santos et al. (2014a) e Santos et al. (2014b), e no presente trabalho (19,7 – 50,6%).

A conversão de carboidratos observada por Ramos e Silva (2020) foi de 61,2%, utilizando RALF termofílico (55°C), operado com vinhaça de cana-de-açúcar (10 g.L⁻¹) e TDH de 4 h. No presente estudo a eficiência de conversão de carboidratos obtida no RALF 1 foi de 50,64 \pm 11,47%, nas mesmas condições de Ramos e Silva (2020), exceto pela presença de glicerol (2,5 g.L⁻¹ - 25% DQO), o que pode justificar a diferença nos valores de conversão de carboidratos nos dois trabalhos.

5.2 CONSUMO DE GLICEROL

As conversões médias de glicerol em cada fase operacional dos reatores estão apresentadas na Tabela 20. No RALF 1 a conversão de glicerol manteve-se acima de 90% nas duas primeiras fases de operação (55 e 60°C), o que pode ser atribuído a utilização de lodo termofílico adaptado à vinhaça (REGO et al., 2020), e o RALF 1 conter menos glicerol. Entretanto, com o aumento da temperatura de 60 para 65°C o consumo de glicerol diminuiu. De acordo com a Figura 21 é possível observar que houve estabilidade no consumo de glicerol na 1° e 2° fase (50 e 55°C) (90,60 \pm 2,84 e 91,28 \pm 1,30%, respectivamente), seguido por um declínio (68,62 \pm 4,27%) na 3° fase (65°C).

Fases	Temperatura (°C)	Gliaflu (g L ⁻¹)	Glieflu (g L-1)	Conversão (%)
RALF 1				
1	55	$2,\!42\pm0,\!16$	$0{,}22\pm0{,}08$	$90,6 \pm 2,8$
2	60	$2,\!07\pm0,\!43$	$0{,}18\pm0{,}04$	$91,3 \pm 1,3$
3	65	$2,\!35\pm0,\!15$	$0,\!77\pm0,\!04$	$68,6 \pm 4,3$
RALF 2				
1	55	$5{,}70\pm0{,}63$	$2,\!06\pm0,\!57$	$58,1\pm6,8$
2	60	$5{,}45 \pm 0{,}48$	$3,\!74\pm0,\!40$	$31,7 \pm 3,9$
3	65	$6{,}05\pm0{,}38$	$4{,}70\pm0{,}42$	$24,0\pm5,\!9$
RALF 3				
1	55	$7{,}50\pm0{,}33$	$6{,}80 \pm 0{,}97$	$5,4 \pm 1,5$
2	60	$7{,}44 \pm 0{,}47$	$5{,}68 \pm 0{,}80$	$22,2 \pm 6,5$
3	65	$7,73 \pm 0,21$	$7,\!42 \pm 0,\!16$	$4,5 \pm 0,9$

Tabela 20- Concentrações e conversões médias de glicerol nos reatores.

Fonte: Elaboração própria (2020). Gli_{afl}: glicerol afluente; Gli_{efl}: glicerol efluente. Fonte: Elaboração própria (2020). Cab_{afl}: carboidrato afluente; Cab_{efl}: carboidrato efluente. RALF 1 (75% DQO vinhaça + 25% DQO glicerol); RALF 2 (50% DQO vinhaça + 50% DQO glicerol); e RALF 3 (25% DQO vinhaça + 75% DQO glicerol).

No RALF 2 o consumo de glicerol foi decrescente ao longo das fases. Em suma, pode-se afirmar que a elevação da temperatura acarretou a diminuição do consumo de glicerol. Na Figura 22 pode-se observar assimetria da mediana nas fases 1 e 2 (55 e 60°C), enquanto que na 3° fase (65°C), houve maior estabilidade nos dados de remoção de glicerol.

Assim como ocorreu na conversão de carboidratos, abordada anteriormente (item 5.1), o consumo de glicerol no RALF 3 apresentou um comportamento levemente distinto dos outros reatores, visto que, houve um aumento no consumo de glicerol $(5,4 \pm 1,5 \text{ para } 22,2 \pm 6,5\%)$ com o aumento da temperatura, entre as fases 1 e 2 (55 e 60°C). A elevação da temperatura de 60 para 65°C (3° fase) ocasionou um decréscimo no consumo de glicerol (4,5 ± 0,9%), evidenciando assim, a temperatura de 60°C como ponto ótimo do RALF 3, dentre as temperaturas analisadas neste estudo, para o consumo de glicerol e carboidratos. Na Figura 23, é possível observar uma estabilidade nos dados de consumo de glicerol, nas três fases.



Figura 21- Boxplot do consumo de glicerol no RALF 1.

Fonte: Elaboração própria (2020).



Figura 22- Boxplot do consumo de glicerol no RALF 2.

Fonte: Elaboração própria (2020).

Apesar da necessidade de uma análise de biologia molecular para comprovar a hipótese, o comportamento observado nos reatores pode estar relacionado ao efeito da temperatura, com a seleção de microrganismos termofílicos capazes de converter o glicerol em determinado produto. Segundo Costa (2017) a taxa de crescimento dos microrganismos termofílicos é considerada baixa e pode variar dentro da própria faixa termofílica, o que explica a diminuição no consumo de glicerol em algumas fases deste trabalho. Amani et al. (2015) associam dois fatores ao menor crescimento da biomassa termofílica, incluindo uma maior taxa de decaimento (≅ duas vezes superior à observada para populações mesofílicas) e um maior requerimento energético para manutenção celular. A maior taxa de decaimento constitui consequência direta da maior tendência das células a sofrer lise quando submetidas a maiores temperaturas.



Figura 23- Boxplot do consumo de glicerol no RALF 3.

Fonte: Elaboração própria (2020).

Outro fator a ser abordado é a concentração afluente do substrato, que também desempenha um papel importante no crescimento dos microrganismos e no rendimento dos produtos (KUMAR et al. 2001). Uma possível explicação para a tendência observada nos reatores é o efeito denominado inibição pelo substrato e, como consequência, inibição por retroalimentação do produto.

Segundo Edwards (1970), uma quantidade excessiva de substrato, neste caso o glicerol, pode desequilibrar o metabolismo da célula, ocasionando uma produção excedente de um determinado produto, resultante de uma via metabólica, e bloqueando uma segunda via relacionada. Em contrapartida, quando a concentração deste produto aumenta, a tendência é que este metabólito atue como um inibidor alostérico, diminuindo a velocidade da via e a sua própria produção. Esse mecanismo é nomeado inibição por retroalimentação.

Comparando os três reatores (Figura 24), pode-se notar uma tendência de decréscimo no consumo em relação ao aumento da concentração de glicerol nos reatores. Vale salientar que o consumo não é diretamente limitado pela concentração de glicerol no meio, mas, supostamente, à medida que o glicerol é consumido ocorre geração de produtos e metabólitos que, quando acumulados no meio, podem inibir o crescimento dos microrganismos envolvidos no processo, interferindo, assim, no consumo de glicerol. O RALF 1 contém 2,5 g.L⁻¹ de glicerol, (correspondente a 25% DQO), o RALF 2 contém 5 g.L⁻¹ de glicerol (correspondente a 50% DQO) e o RALF 3 contém 7,5 g.L⁻¹ de glicerol (correspondente a 75% DQO).



Figura 24- Eficiências de consumo de glicerol nos reatores.

O experimento realizado por Ito et al. (2005), em temperatura mesofílica (37°C), teve como objetivo avaliar a produção de H₂ e etanol a partir do glicerol puro, em reator de leito compactado, utilizando células auto imobilizadas. O consumo de glicerol foi completo ao operar o reator com uma concentração de 5 g.L⁻¹ e TDH de 4 h. O valor obtido pelos autores difere dos valores obtidos no presente trabalho (58,12 ± 6,84%), apesar de utilizar a mesma concentração de glicerol (5 g.L⁻¹ - RALF 2) e o mesmo TDH (4 h), a temperatura, a codigestão e o tipo de reator podem ter sido determinantes nos resultados atingidos.

Fonte: Elaboração própria (2020).

Phukingngam et al. (2011) avaliaram o desempenho de reatores ABR mesofilicos (27°C) para a remoção de glicerol. Para isso, foram aplicadas seis TCOs diferentes (0,5; 0,7; 1,0; 1,5; 2,1 e 3,0 kg.m⁻³ d⁻¹ de TCO). Os reatores operados com TCO de 0,5-1,5 kg. m⁻³ d⁻¹ foram mais eficazes no consumo de glicerol (98 a 100%). O aumento da TCO para 2,1- 3,0 kg.m⁻³ d⁻¹ de DQO ocasionou uma redução na eficiência de remoção de glicerol (70 – 80%). Além disso, foi observado que, elevadas concentrações de glicerol podem inibir a sua conversão. O consumo de glicerol obtido pelos autores foi semelhante ao registrado no RALF 1 do presente trabalho (90,60 ± 2,84%).

Assim como no presente trabalho, conversões incompletas de glicerol foram observadas por Maru et al. (2013), que avaliaram o efeito da concentração de glicerol (2,5 a 40,0 g.L⁻¹) na produção de H₂. Para isso, utilizaram reatores em batelada (80° C) e dois tipos bactérias hipertermofílicas. As conversões de glicerol variaram entre 10,3 e 82,9% e 14,2 e 91,6%, utilizando *T. maritima* e *T. neapolitana*, respectivamente. Neste estudo, os autores observaram que, as conversões diminuíram com o aumento da concentração inicial de glicerol, tendência também observada nos reatores do presente trabalho.

No estudo realizado por Rodrigues et al. (2016) foi avaliada a produção H₂ a partir do glicerol bruto (20 g DQO.L⁻¹), em batelada, sob condições mesofílicas (37°C). Os inóculos testados foram: (I) lodo granular de UASB termofílico, utilizado no tratamento de vinhaça e (II) lodo granular de UASB, usado no tratamento do lodo sanitário. Os consumos de glicerol não foram completos durante os dois ensaios. Observou-se conversões de 26,9% e 31,7% para os ensaios (I) e (II), respectivamente. As baixas conversões podem estar relacionadas com a elevada concentração inicial de glicerol. Visto que, no presente trabalho, foi utilizado o mesmo lodo que os autores (lodo granular de UASB termofílico, utilizado no tratamento de vinhaça), porém foi observado alta conversão de carboidratos (90,60 \pm 2,84%).

García e Cammarota (2019) utilizaram água residuária da produção de biodiesel, contendo principalmente metanol (128 g.L⁻¹) e glicerol (4 g.L⁻¹), como substrato para a produção de H₂, através da fermentação escura. Os autores utilizaram delineamento fatorial fracionário para avaliar o efeito de seis variáveis (entre elas, o teor de glicerol, 25 e 75% DQO e a concentração de DQO, 4 e 50 g.L⁻¹). A melhor conversão de glicerol (94,5 ± 5,3%) ocorreu com o teor de glicerol de 25% da DQO de 4 g.L⁻¹. Semelhante ao valor de conversão registrado no RALF 1 (90,60 ± 2,84%), com 25% da DQO de glicerol (2,5 g.L⁻¹), sugerindo que a proporção de 25% da DQO do glicerol é favorável ao consumo de glicerol, tendo em vista os elevados valores obtidos no trabalho de García e Cammarota (2019) e no RALF 1 do presente estudo.
5.3 PARÂMETROS DE CONTROLE DOS SISTEMAS ACIDOGÊNICOS

5.3.1 Demanda Química de Oxigênio

As concentrações de demanda química de oxigênio (DQO) afluente, efluente e eficiência de remoção nos reatores, estão apresentadas na Tabela 21.

Tabela 21- Concentrações afluente e efluente e remoções médias de DQO nos reatores.						
Fases	Temperatura (°C)	DQOaflu (g DQO.L ⁻¹)	DQOeflu (g DQO.L ⁻¹)	Remoção (%)		
RALF 1						
1	55	$10{,}9\pm0{,}7$	$10,5 \pm 0,7$	$13,8 \pm 2,9$		
2	60	$9{,}6\pm0{,}7$	$8{,}9\pm0{,}8$	$11,3 \pm 1,1$		
3	65	11,3 ± 2,0	$11,2 \pm 1,5$	3,1 ± 1,9		
RALF 2						
1	55	$10,4 \pm 1,1$	$10,4 \pm 1,$	$5,0\pm0,5$		
2	60	$11,\!8\pm0,\!8$	$10{,}8\pm0{,}9$	$17,2 \pm 1,6$		
3	65	$13,1 \pm 0,4$	$12,3 \pm 0,4$	$7,6 \pm 1,2$		
RALF 3						
1	55	$11,5 \pm 0,6$	$11,3 \pm 0,4$	2,1 ± 1,6		
2	60	$12,5 \pm 1,1$	$11,9 \pm 1,1$	$8,\!4\pm0,\!7$		
3	65	$12{,}5\pm0{,}9$	12,6 ± 1,2	$3,8\pm0,2$		

Fonte: Elaboração própria (2020). RALF 1 (75% DQO vinhaça + 25% DQO glicerol); RALF 2 (50% DQO vinhaça + 50% DQO glicerol); e RALF 3 (25% DQO vinhaça + 75% DQO glicerol).

No RALF 1 as maiores remoções de DQO ocorreram na temperatura de 55 e 60°C com $13.8 \pm 2.9\%$ e $11.3 \pm 1.1\%$, respectivamente, sofrendo redução na temperatura de 65°C, em que foi obtido o menor valor de remoção de DQO ($3.1 \pm 1.9\%$). No RALF 2 foi observada remoção de $5.0 \pm 0.5\%$ na temperatura de 55°C. Contudo, elevou-se na temperatura de 60°C, atingindo

17,2 ± 1,6 %, maior valor de remoção de DQO registrado no presente estudo. Em seguida, com a elevação da temperatura para 65°C a remoção foi de 7,6 ± 1,2%. Um padrão similar foi observado no RALF 3, em que houve acréscimo da remoção com o aumento da temperatura de 55 para 65°C (2,1 ± 1,6 para 8,4 ± 0,7%) com diminuição para 3,8 ± 0,2% na temperatura de 65°C.

Foram observados baixos valores de eficiência de remoção de DQO, nos três reatores acidogênicos operados neste trabalho. Esse comportamento é esperando, tendo em vista que com a interrupção dos compostos na etapa de acidogênese, os metabólitos não são completamente oxidados, conferindo assim, DQO ao sistema. Dessa forma, a eficiência de remoção de DQO em processos acidogênicos é consideravelmente menor do que a eficiência de remoção em processos anaeróbios tradicionais (HAN et al., 2012b).

Utilizando vinhaça da cana-de-açúcar e RALFs termofílicos (55°C) em concentrações de 10 e 30 g DQO.L⁻¹, Santos et al. (2014b) relataram remoções de DQO semelhantes aos valores observados no presente estudo, entre 8,5% e 13,6% no RALF com 10 g DQO.L⁻¹ e 10,0% e 11,5% no RALF com 30 g DQO.L⁻¹. A maior remoção de DQO, nos dois reatores, ocorreu no TDH de 4 h, o mesmo TDH empregado no presente trabalho. Ferraz Junior et al. (2015), também utilizando vinhaça da cana-de-açúcar (36,2 g DQO.L⁻¹), registraram maior eficiência de remoção de DQO (31,3%), quando comparado com o presente trabalho e os citados acima, empregando reator de leito fixo empacotado termofílico (55°C).

Empregando o glicerol bruto (5 g DQO.L⁻¹) na produção de H₂ em RALF termofílico (55°C), Ferreira (2014) obtiveram valores médios de remoção de DQO entre 13,6 e 17,7%. Lovato et al. (2015) utilizaram reatores sequenciais, alimentados com águas residuarias à base de glicerina para produção de H₂, variando as concentrações afluente (3, 4 e 5 g DQO.L⁻¹). Em relação à remoção de matéria orgânica na forma de DQO, observou-se que, embora exista uma diferença nas concentrações de matéria orgânica afluente, devido às diferentes cargas orgânicas aplicadas, não houve grandes variações nas eficiências de remoção entre os ensaios (17 e 38%).

Em virtude da elevada concentração de matéria orgânica presente nos efluentes dos reatores acidogênicos, uma possibilidade para melhorar o aproveitamento da vinhaça acidificada é a produção contínua de bioenergia em reatores em série (reator acidogênico seguido por reator metanogênico). A realização de um processo de dois estágios, com a produção de ácidos orgânicos voláteis em fase acidogênica, possibilita a oportunidade de produzir compostos com valor agregado, além de potencializar a recuperação de energia a partir de substratos complexos (CAVINATO et al., 2017).

5.3.2 Influência do pH

Os valores médios de pH afluente e efluente dos reatores utilizados neste estudo, estão apresentados na Tabela 22. Observa-se que os valores de pH efluente foram menores que os valores de pH afluente, comportamento já esperado em reatores acidogênicos, evidenciando a acidificação do sistema. O pH do meio fermentativo, equivalente ao pH efluente, variou entre 4,55 e 5,07. A manutenção do pH foi controlada pela adição de solução NaOH 6M no afluente, em função do pH efluente observado. Nota-se que o pH, por ser controlado, não influenciou nos principais parâmetros que apontam a produção de H₂: rendimento de H₂, quantidade de H₂ no biogás e conversão de substrato.

O pH ótimo para produção de H₂ pode variar de acordo com as comunidades microbianas envolvidas no processo e com as condições de operação do reator, como TCO, TDH, temperatura, entre outros. Neste estudo, a produção de H₂ ocorreu em pH médio de 4,69 \pm 0,44.

As formas em que os intermediários químicos estão presentes no meio são influenciadas pelo pH, visto que em pH inferior a 4,5, a maioria dos ácidos estão presentes na sua forma não dissociada, o que pode causar efeitos de toxicidade, quando presentes em concentrações elevadas. As formas não dissociadas dos ácidos podem ultrapassar a membrana celular, colapsando o gradiente de pH da membrana e causando a morte da célula (DURRE, 2005).

Estudos empregando RALF termofílico, a partir da vinhaça de cana-de-açúcar, mantiveram o pH inferior a 5,5. No trabalho realizado por Santos et al. (2014c), controlaram o pH efluente entre 4,2 e 4,6. Já o experimento realizado por Ramos (2016) definiu a faixa ideal entre 4,55 e 4,95, similares com os valores de pH efluente obtidos no presente trabalho. Também utilizando vinhaça da cana-de-açúcar, mas em reator anaeróbio de leito estruturado, Fuess, Zaiat e Nascimento (2019) controlaram o pH da fermentação entre 5,0 e 5,5.

Estudos avaliando a produção de biogás, a partir do glicerol, utilizaram diferentes valores de pH. Vasconcelos et al. (2019) operaram reator UASB em pH 5,2. Também utilizando glicerol, Illanes et al. (2017) investigaram o efeito do pH na produção de H₂, em reator anaeróbio continuamente agitado, e concluíram que, para esse trabalho, o melhor valor de pH foi de 5,5. No trabalho realizado por Aguilar et al. (2019), a partir de glicerol bruto e esterco suíno, empregando a metodologia de superfície de resposta, os valores de pH efluente mantiveram-se entre 4,0 e 6,0. Já o trabalho realizado por Lovato et al. (2015), utilizando reator

112

Tabela 22- Valores médios de pH afluente e efluente dos reatores.					
Fases	Temperatura (°C)	pH_{aflu}	pH_{eflu}		
RALF 1					
1	55	$5{,}28\pm0{,}18$	$5{,}07\pm0{,}19$		
2	60	$4,\!73\pm0,\!06$	$4{,}68 \pm 0{,}04$		
3	65	$5,63 \pm 0,11$	$4,\!84\pm0,\!08$		
RALF 2					
1	55	$5,12 \pm 0,42$	$4{,}59\pm0{,}07$		
2	60	$5{,}08 \pm 0{,}78$	$4,\!58\pm0,\!13$		
3	65	$4,\!89\pm0,\!03$	$4,61 \pm 0,15$		
RALF 3					
1	55	$5{,}30\pm0{,}04$	$4{,}61\pm0{,}06$		
2	60	$5,\!84\pm0,\!06$	$4,55 \pm 0,04$		
3	65	$5{,}20\pm0{,}01$	$4{,}77\pm0{,}07$		

em batelada sequenciais, tratando águas residuárias à base de glicerina pura, o pH foi mantido em 4,5.

Fonte: Elaboração própria (2020). RALF 1 (75% DQO vinhaça + 25% DQO glicerol); RALF 2 (50% DQO vinhaça + 50% DQO glicerol); e RALF 3 (25% DQO vinhaça + 75% DQO glicerol).

5.3.3 Sólidos Suspensos

Os valores médios de sólidos suspensos totais (SST), sólidos suspensos voláteis (SSV) e sólidos suspensos fixos (SSF) medidos são apresentados na Tabela 23. O RALF 1, com maior concentração de vinhaça da cana-de-açúcar, apresentou a maior concentração de SST. Pode-se observar que, com o aumento da concentração de glicerol, os valores de SST foram decrescentes. A maior parte dos sólidos suspensos contidos no efluente foi representada por sólidos suspensos voláteis, em todos os reatores.

Fases	Temperatura °C	SST (mg L ^{.1})	SSV (mg L ⁻¹)	SSF (mg L ⁻¹)
1 4505		551 (iiig.ii)	55 ((iig.L)	551 (mg.L)
RALF 1				
1	55	757 ± 87	650 ± 85	264 ± 105
2	60	766 ± 72	641 ± 55	158 ± 39
3	65	455 ± 43	410 ± 58	32 ± 4
RALF 2				
1	55	339 ± 29	326 ± 38	15 ± 3
2	60	332 ± 25	317 ± 35	12 ± 7
3	65	337 ± 34	322 ± 43	18 ± 6
RALF 3				
1	55	278 ± 47	265 ± 56	13 ± 3
2	60	180 ± 51	170 ± 37	12 ± 6
3	65	152 ± 34	135 ± 35	17 ± 9

Tabela 23- Valores médios de SST, SSV e SSF no efluente dos reatores.

Fonte: Elaboração própria (2020). RALF 1 (75% DQO vinhaça + 25% DQO glicerol); RALF 2 (50% DQO vinhaça + 50% DQO glicerol); e RALF 3 (25% DQO vinhaça + 75% DQO glicerol).

Com o aumento de temperatura de 60° para 65°C, as concentrações de SST, SSF e SSV no RALF 1 diminuíram. No RALF 2 as concentrações mantiveram-se constantes durante todas as fases. E no RALF 3 as concentrações de sólidos suspensos diminuíram gradualmente com o aumento da temperatura.

Os percentuais de SSV em relação aos SST medidos nos três reatores podem indicar a ocorrência de lavagem da biomassa, tendo em vista que o SSV é utilizado na determinação do fluxo de biomassa microbiana no reator. Vale salientar que, na composição da vinhaça de canade-açúcar já apresenta elevado teor de SSV.

5.4 DESEMPENHO DOS RALFS NA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO

Este tópico aborda os aspectos relativos à produção de H_2 nos RALFs. Os dados de percentual de H_2 no biogás, HY e PVH estão discutidos nos subitens 5.4.1, 5.4.2 e 5.4.3.

5.4.1 Percentual de Hidrogênio

A composição do biogás obtida nos três reatores, em função da temperatura, limitou-se à produção de H₂ e CO₂. A ausência de CH₄ na composição evidencia a efetividade do tratamento térmico aplicado ao inóculo e a manutenção do pH (4,55 e 5,07).

A partir dos dados ilustrados na Figura 25, pode-se notar estabilidade no percentual de H₂ no RALF 1 (75% DQO vinhaça + 25% DQO glicerol), com 30,6 \pm 3,0% a 55°C e 28,8 \pm 5,6% a 60°C. Contudo, o biogás detectado na temperatura de 65°C restringiu-se apenas a CO₂. No RALF 2 (50% DQO vinhaça + 50% DQO glicerol) as rotas produtoras de H₂ nas temperaturas de 60 e 65°C, não foram favorecidas, sendo detectado H₂ somente durante a 1° fase experimental (55°C) (29,2 \pm 5,65%) (Figura 26).

No RALF 3 (25% DQO vinhaça + 75% DQO glicerol) foi detectado H₂ no biogás nas duas primeiras fases (55 e 60°C). A partir da Figura 27 é possível notar que o aumento da temperatura de 55°C para 60°C ocasionou decréscimo no percentual de H₂ (45,9 ± 2,5% para $32,0 \pm 3,8\%$). Durante a 3° fase operacional (65°C) não foi detectado H₂ no biogás. Dado o exposto, é pertinente sugerir que durante a 3° fase (65°C) dos RALFs 1, 2 e 3 ocorreu síntese de células, visto que em maiores temperaturas o crescimento celular líquido é menor e a produção celular necessita compensar essa perda (AMANI et al., 2015). O mesmo foi observado na 2° fase (60°C) do RALF 2. A elevada temperatura pode ter causado alterações no metabolismo dos microrganismos, implicando prejuízo a produção de H₂.



Figura 25 - Percentual de H₂ no biogás produzido no RALF 1.

Fonte: Elaboração própria (2020).



Figura 26 - Percentual de H2 no biogás produzido no RALF 2.

Fonte: Elaboração própria (2020).



Figura 27 - Percentual de H₂ no biogás produzido no RALF 3.

Fonte: Elaboração própria (2020).

Azbar et al. (2009) registraram um valor médio de 45% de H₂ na composição do biogás, utilizando CSTR (55°C) alimentado com soro de queijo, TDH 3,5d e TCO de 3,2 g DQO.L¹.d⁻¹. Também sob condições termofílicas (55°C), Intanoo et al. (2012) obtiveram 43% de H₂ no biogás, utilizando reatores em batelada sequencial e água residuária de álcool, com TCO de 68 kg.m⁻³d⁻¹ e TDH de 21,3 h. Apesar das diferentes condições adotadas, como configuração de reator e substrato, os resultados relatados pelos autores são semelhantes ao percentual de H₂ observado no RALF 3 do presente trabalho, na temperatura de 55°C (45,9 ± 2,5%).

Utilizando RALF alimentado com vinhaça de cana-de-açúcar (10 g DQO.L⁻¹) e TDH 4 h, Ramos e Silva (2017) relataram que os valores de fração molar de H₂ nas temperaturas de 55°C e 65°C foram similares (aproximadamente 46%). Entretanto, com o aumento da temperatura para 75°C, a fração molar foi reduzida para 23,3%. A diminuição %H₂ no biogás com o aumento da temperatura também foi observado no presente estudo, visto que, no RALF 3, com a elevação da temperatura de 55°C para 60°C a fração molar de H₂ diminuiu de 45,9 \pm 2,5% para 32,0 \pm 3,8%. Os RALF 1 e 2 também apresentaram a mesma tendência, uma vez que as rotas produtoras de H₂ nas temperaturas de 65°C não foram favorecidas.

Há poucos trabalhos na literatura de referência sobre produção de H_2 a partir do glicerol sob condições termofílicas. Wu et al. (2011) analisaram diferentes concentrações de glicerol (10, 30, 50 e 70 g.L⁻¹) na produção de H_2 , em reatores em batelada (40°C), com tempo de

fermentação de 11,3 h. O maior percentual (42,2%) registrado pelos autores foi obtido na concentração de 50 g.L⁻¹. Sob condições mesofílicas (35 °C), Dounavis et al. (2015) analisaram a influência do TDH (24 e 36 h) e da concentração de glicerol bruto (10 e 25 g.L⁻¹) na produção de biogás, em batelada. Os autores observaram que a composição de H₂ no biogás variou sutilmente (40,2 a 45,2%), apesar das mudanças operacionais. Em geral, os resultados registrados pelos autores, utilizando glicerol, foram próximos ao valor máximo de %H₂ observado no presente trabalho (45,9 \pm 2,5%).

5.4.2 Produção Volumétrica de Hidrogênio

No RALF 1 (75% DQO vinhaça + 25% DQO glicerol), a PVH máxima de 2,9 \pm 0,4 L.d⁻¹.L⁻¹ foi registrada na 1° fase (55°C). Com a elevação de temperatura para 60°C (2° fase), a PVH diminuiu para 2,0 \pm 0,5 L.d⁻¹.L⁻¹, e durante a 3° fase experimental (65°C) não foi detectado H₂ no biogás (Figura 28). Já no RALF 2 (50% DQO vinhaça + 50% DQO glicerol), o aumento da temperatura condicionou a PVH (0,6 \pm 0,06 L.d⁻¹.L⁻¹) apenas na 1° fase (55°C). Na 2° e 3° fase (60 e 65°C) as rotas produtoras de H₂ não foram favorecidas (Figura 29). No RALF 3 (25% DQO vinhaça + 75% DQO glicerol) observou-se estabilidade durantes as duas primeiras fases, visto que na temperatura de 55°C (1° fase) foi obtida a PVH máxima de 1,4 \pm 0,4 L.d⁻¹.L⁻¹ e na temperatura de 60°C foi registrado PVH máxima de 1,6 \pm 0,4 L.d⁻¹.L⁻¹. Contudo, durante a 3° fase de operação (65°C) não foi detectado H₂ no biogás (Figura 30).



Figura 28- Produção volumétrica de H₂ no RALF 1.











Figura 30 - Produção volumétrica de H₂ no RALF 3.

Fonte: Elaboração própria (2020).

Pode-se afirmar que houve um expressivo decréscimo da PVH relacionada ao aumento da temperatura. A fim de uma melhor visualização, na Figura 31 estão apresentados os dados de PVH dos três RALFs. Ao comparar os reatores, nota-se que o RALF 1 apresentou os melhores resultados de PVH $(2.9 \pm 0.4 \text{ L.d}^{-1}.\text{L}^{-1})$ na temperatura de 55°C, seguido pelo RALF 3 com PVH máxima de 1,6 \pm 0,4 L.d⁻¹.L⁻¹, na temperatura de 60°C. Os resultados de PVH obtidos no RALF 2 foram inferiores aos valores obtidos nos RALFs 1 e 3, visto que a PVH máxima registrada na temperatura de 55°C foi de $0.6 \pm 0.06 \text{ L.d}^{-1}$.L⁻¹, além disso, não foi detectado H₂ neste reator nas temperaturas de 60 e 65° C.

Em geral, as comunidades microbianas apresentam menor diversidade com o aumento da temperatura, caracterizando o cultivo seletivo de algumas espécies (COSTA, 2017). Neste trabalho, a performance insatisfatória da produção de H2, em condições hipertermofílica, pode estar relacionada com a não formação de uma comunidade eficiente, o que foi evidente devido à baixa eficiência de consumo de substratos em maiores temperaturas (5.1 e 5.2).



Figura 31- Produção volumétrica de hidrogênio nos RALFs.

Ao avaliar o efeito da temperatura, Chookaew et al. (2012) observaram que a produção de H₂ em reatores batelada, a partir do glicerol (10 g.L⁻¹), aumentou com a elevação da temperatura de 30°C (8 mmol H₂.L⁻¹) para 40°C (22,5 mmol H₂.L⁻¹). Contudo, não foi detectado H₂ nas temperaturas de 50 e 60°C, devido à influência da temperatura na atividade de algumas enzimas essenciais, como a hidrogenase, e no metabolismo dos microrganismos. Assim como no presente trabalho, em que o aumento da temperatura para 65°C exerceu influência negativa na produção de H₂ nos três RALFs.

Altos valores de PVH foram registrados nos trabalhos de Ferreira (2014) e Costa (2017). Ambos utilizaram RALF e temperatura termofílica (55°C). Os autores relataram que, quanto menor o TDH adotado, maior foi a PVH. Ferreira (2014) fixou a concentração de glicerol bruto em 5 g.L⁻¹ e obteve PVH máxima de 36,24 L.d⁻¹ L⁻¹ com TDH de 1 h, enquanto que Costa (2017) registrou PVH máxima de 35,04 L.d⁻¹ L⁻¹, utilizando 10 g.L⁻¹ de glicerol bruto e TDH de 0,5 h. A partir das informações relatadas pelos autores, pode-se inferir que o TDH adotado neste trabalho (4 h) foi elevado, o que pode justificar os baixos valores de produção de H₂ (2,9 \pm 0,4 L.d⁻¹.L⁻¹), quando comparado com os trabalhos de Ferreira (2014) (36,24 L.d⁻¹ L⁻¹) e Costa (2017) (35,04 L.d⁻¹ L⁻¹), com TDH de 1 h e 0,5 h, respectivamente.

Uma tendência semelhante foi observada em trabalhos com vinhaça de cana-de-açúcar. Utilizando RALF e temperatura termofílica (55°C) Santos et al. (2014b) e Ferreira (2016) observaram aumento da PVH com a redução do TDH. A partir de vinhaça de cana-de açúcar

Fonte: Elaboração própria (2020).

diluída (10 g DQO.L⁻¹) e *in natura* (30 g DQO.L⁻¹) Santos et al. (2014b) obteve PVH máxima (47,0 e 19,2 L.d⁻¹ L⁻¹, respectivamente) no TDH de 1 h. Da mesma forma, Ferreira (2016) utilizou vinhaça de cana-de-açúcar, com concentração afluente de 5 g DQO.L⁻¹ e TDH entre 8 e 1 h, e verificou aumento da PVH com a diminuição do TDH, elevação de 0,0 para 12,9 L.d⁻¹ L⁻¹, com redução do TDH de 8 para 1 h. Também utilizando RALF (55°C) e vinhaça de cana-de-açúcar (10 g DQO.L⁻¹), Ramos (2016) observou aumento da PVH ao longo da operação, variando entre 1,68 e 17,04 L.d⁻¹ L⁻¹, com a redução do TDH de 8 para 0,5 h. Corroborando assim com a tese de que o TDH utilizado neste estudo foi elevado para obter maiores produções de H₂.

É importante mencionar o trabalho realizado por Ramos e Silva (2020), visto que o TDH (4 h) e a concentração utilizada no presente estudo (10 g DQO.L⁻¹) foram fundamentados no trabalho desenvolvido pelos autores. Utilizando RALF (55°C) alimentado com vinhaça de cana-de-açúcar, foi obtido PVH máxima de 1,30 \pm 0,16 L.d⁻¹ L⁻¹. Valor este inferior ao observado no RALF 1 do presente trabalho (2,9 \pm 0,4 L.d⁻¹.L⁻¹), reforçando a hipótese de que a codigestão de vinhaça de cana-de-açúcar e glicerol, aplicada no presente trabalho, exerceram influência positiva na PVH.

5.4.3 Rendimento de Hidrogênio

O HY máximo obtido no RALF 1 (75% DQO vinhaça + 25% DQO glicerol) foi de 0,74 \pm 0,12 mmol H₂.g DQO adicionada⁻¹, registrado durante a 1° fase (55°C), mantendo-se estável durante a 2° fase de operação (60°C) com HY de 0,60 \pm 0,16 mmol H₂.g DQOadicionada⁻¹. Porém, assim como relatado anteriormente nos subitens de composição do biogás e PVH, não foi obtido H₂ na temperatura de 65°C (3° fase) (Figura 32). No RALF 2 (50% DQO vinhaça + 50% DQO glicerol), o maior valor de rendimento também foi registrado na 1 °fase (0,16 \pm 0,03 mmol H₂.g DQO adicionada⁻¹), valor este considerado baixo de acordo com o trabalho de Paranhos e Silva (2020). Durante a 2° e 3° fase experimental (60 e 65°C) não foi detectado H₂ (Figura 33). Já no RALF 3 (25% DQO vinhaça + 75% DQO glicerol) foi observado uma estabilidade nos valores de rendimento nas duas primeiras fases (55 e 60°C) (0,35 \pm 0,09 e 0,31 \pm 0,07 mmol H₂.g DQO adicionada⁻¹, respectivamente). Contudo, na 3° fase (65°C) não foi obtido H₂ (Figura 34).



Figura 32- Rendimento de H₂ no RALF 1.

Fonte: Elaboração própria (2020).

Na Figura 34 pode ser visualizado e comparado o HY nos três RALFs. Durante a 3° fase experimental (65°C) não foi detectado H₂ nos três reatores. Logo, neste trabalho, o aumento da temperatura para a faixa hipertermofílica 65°C exerceu efeito negativo no HY. O RALF 1 apresentou os maiores valores de HY no presente trabalho, com HY máximo de 0,74 \pm 0,12 mmol H₂.g DQO adicionada⁻¹. Em contraste, o RALF 2 não apresentou valores de HY satisfatórios.



Figura 33- Rendimento de H_2 no RALF 2.





Figura 34- Rendimento de H_2 no RALF 3.

Fonte: Elaboração própria (2020).



Figura 35- Rendimentos de hidrogênio nos RALFs.

Os valores de HY descritos em alguns trabalhos da literatura de referência, utilizando vinhaça de cana-de-açúcar, são próximos ao HY máximo obtido neste estudo (0,74 \pm 0,12 mmol H₂.g DQOadicionada⁻¹). A partir de vinhaça de cana-de-açúcar, Ramos (2016) registou HY máximo de 1,64 \pm 0,22 mmol H₂.g DQO⁻¹, utilizando RALF termofílico (55°C) e TDH de 4 h. O valor obtido na temperatura de 65°C (1,29 \pm 0,39 mmol H₂ g DQO⁻¹) foi similar ao encontrado na temperatura de 55°C. Entretanto, o aumento da temperatura para 75°C ocasionou a redução do HY para 0,04 \pm 0,02 mmol H₂.g DQO⁻¹. Com isso, o autor inferiu que o aumento da temperatura foi negativo ao HY, assim como observado no presente trabalho. Ferraz Júnior et al. (2014) obtiveram valor máximo de HY de 0,70 mmol H₂.g DQO⁻¹, com temperatura de 55°C, TDH de 12 h e 36,2 g DQO.L⁻¹. Valor similar (0,79 mmol H₂.g DQO⁻¹) foi registrado por Santos et al. (2014b), também com temperatura de 55°C, 30 g.L⁻¹ de vinhaça de cana-de-açúcar e TDH de 6 h.

Os valores de HY reportados em trabalhos da literatura de referência, utilizando glicerol, foram superiores aos HY registrados nos trabalhos utilizando vinhaça de cana-de-açúcar (RAMOS, 2016; FERRAZ JÚNIOR et al., 2014; SANTOS et al., 2014b). Costa (2017) obteve HY máximo de 2,79 mmol H₂.g DQO adicionada⁻¹, utilizando RALF (55°C) alimentado com 10 g.L⁻¹ de glicerol e TDH de 4 h. Enquanto que, Sittijunda e Reungsang (2020) relataram HY máximo de 9,86 mmol H₂.g DQO adicionada⁻¹, utilizando UASB, alimentado com 25 g.L⁻¹ de glicerol, também em temperatura termofílica (55°C). O RALF 3 do presente estudo, com maior concentração de glicerol (75% DQO glicerol - 7,5 g.L⁻¹), apresentou HY máximo de 0,35 mmol

Fonte: Elaboração própria (2020).

 $H_{2.g}$ DQO adicionada⁻¹, inferior aos valores registrados nos trabalhos de Costa (2017) e Sittijunda e Reungsang (2020). A diferença nos valores de HY pode estar relacionada com a geração de diferentes metabólitos solúveis durante a fermentação, uma vez que o H_2 pode ser cogerado ou consumido durante o processo. Na prática, a fermentação anaeróbia de glicerol, por consórcios microbianos mistos, gera uma maior diversidade de metabólitos, implicando variabilidade do HY (PARANHOS e SILVA, 2020).

Na Tabela 24 estão sintetizados os principais trabalhos da literatura relacionados à produção de H_2 a partir de vinhaça de cana-de-açúcar e glicerol, sob temperatura termofílica e hipertermofílica. Em suma, os valores de HY obtidos no presente estudo foram inferiores aos observados em outros trabalhos. Contudo, vale salientar a inviabilidade de comparação direta entre os estudos pois, apesar de objetivarem a produção de H_2 , cada estudo possui suas particularidades como configurações de reatores, inóculos, concentrações de substrato, temperatura, uso adicional de suplementos no meio nutritivo, entre outros, exercendo influência sobre os valores de HY.

termofilicas e nipertermofilicas, visando a produção de H_2 .					
Reator	Substrato (g DQO.L ⁻¹)	Temperatura (°C)	TDH (h)	HY	Referência
Batelada	Glicerol (2,5)	80	-	7,36 mmol H ₂ .g DQO adicionada ⁻¹	Maru et al. (2012)
RALF	Caldo + melaço (cana-de-açúcar) (5,0)	55	2	3,53 mmol H ₂ .g DQO adicionada ⁻¹	Santos et al. (2014a)
RALF	Vinhaça de cana-de-açúcar (10)	55	6	2,86 mmol H ₂ .g DQO adicionada ⁻¹	- Santos et al. (2014b)
	Vinhaça de cana-de-açúcar (30)	55	6	0,79 mmol H ₂ .g DQO adicionada ⁻¹	
RALF	Vinhaça de cana-de-açúcar (15)	55	6	2,23 mmol H ₂ .g DQO adicionada ⁻¹	- Santos et al. (2014c)
	Vinhaça de cana-de-açúcar (20)	55	6	1,85 mmol H ₂ .g DQO adicionada ⁻¹	
APBR	Caldo + melaço (cana-de-açúcar) (35,2)	55	10,2	1,6 mol H ₂ .mol carboidratos totais ⁻¹	Ferraz Júnior et al. (2015a)

Tabela 24- Comparação do desempenho do RALF 1, 2 e 3, em relação a trabalhos reportados na literatura, a partir da vinhaça e glicerol, sob condições termofílicas e hipertermofílicas, visando a produção de H₂.

Reator	Substrato (g DQO.L ⁻¹)	Temperatura (°C)	TDH (h)	НҮ	Referência
APBR	Vinhaça de cana-de-açúcar (28,3)	55	7,5	3,4 mol H ₂ .mol carboidratos totais ⁻¹	Fuess et al. (2016)
V	Vinhaça de cana-de-açúcar	55	4	1,64 mmol H ₂ .g DQO adicionada ⁻¹	Ramos e Silva
KALF	(10,0)	75	75 4 0,04 mmol H ₂ .g DQO	0,04 mmol H ₂ .g DQO adicionada ⁻¹	(2017)
	Glicerol	55	1	1,85 mmol H ₂ .g DQO adicionada ⁻¹	0 (2017)
KALF	(10,0)	55	4	2,79 mmol H ₂ .g DQO adicionada ⁻¹	Costa (2017)
ASTBR	Vinhaça da cana-de-açúcar (5,0)	70	19	1,8 mol H ₂ .mol glicose ⁻¹	Niz et al. (2019)
RALF	Caldo de cana-de-açúcar (5,0)	55	2	1,52 mol H ₂ .mol hexose ⁻¹	Ferreira et al. (2019)

Tabela 24 - Comparação do desempenho do RALF 1, 2 e 3, em relação a trabalhos reportados na literatura, a partir da vinhaça e glicerol, sob condições termofílicas e hipertermofílicas, visando a produção de H₂ (continuação).

Tabela 24 - Comparação do desempenho do RALF 1, 2 e 3, em relação a trabalhos reportados na literatura, a partir da vinhaça e glicerol, sob condições termofílicas e hipertermofílicas, visando a produção de H₂ (continuação).

Reator	Substrato (g DQO.L ⁻¹)	Temperatura (°C)	TDH (h)	НҮ	Referência
RALF	Vinhaça da cana-de-açúcar (10,0)	55	4	0,34 mmol H ₂ .g DQO adicionada ⁻¹	Ramos e Silva (2020)
UASB	Glicerol (25,0)	55		9,86 mmol H ₂ .g DQO adicionada ⁻¹	Sittijunda e Reungsang (2020)
RALF 1	75% DQO vinhaça + 25% DQO glicerol (10,0)	55	4	0,74 mmol H ₂ .g DQO adicionada ⁻¹	
RALF 2	50% DQO vinhaça + 50% DQO glicerol (10,0)	55	4	0,16 mmol H _{2.} g DQO adicionada ⁻¹	Este estudo
RALF 3	25% DQO vinhaça + 75% DQO glicerol (10,0)	60	4	0,35 mmol H _{2.} g DQO adicionada ⁻¹	_

ASBR: Anaerobic Sequencing Batch Reator (Reator Anaeróbio em Batelada Sequencial), APBR: Anaerobic Packed Bed Reactor (Reator Anaeróbio de Leito Empacotado), RALF: Reator Anaeróbio de Leito Fluidificado. ASTBR: Structured Bed Anaerobic Reactor (Reator Anaeróbio de Leito Estruturado). UASB: Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor (Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente e Manta de Lodo). Fonte: Elaborado própria (2020).

5.5 AVALIAÇÃO DOS PRODUTOS INTERMEDIÁRIOS DA FERMENTAÇÃO

A quantificação dos metabólitos solúveis produzidos nos reatores indica as possíveis rotas metabólicas da comunidade microbiana, assim como a predominância de determinados microrganismos. Quando acumulados, alguns metabólitos podem ter papel tóxico ou inibitório, para as populações de microrganismos produtores de H₂. Na tabela 25 estão apresentados os valores de concentrações médias e as frações molares de cada componente detectado durante as fases experimentais, em cada um dos reatores.

			Temperatura (°C)	
	Metadolitos	55	60	65
RALF 1				
g.L ⁻¹ (%)	Hbu	$0,5 \pm 0,1$ 15,4	$0,2 \pm 0,5$ 8,3	$0,8 \pm 0,1$ 44,9
g.L ⁻¹ (%)	HPr	$0,4 \pm 0,1$ 14,1	$\begin{array}{c} 0,14\pm0,03\\ 6,4\end{array}$	$\begin{array}{c}0,2\pm0,0\\14,9\end{array}$
g.L ⁻¹ (%)	Hac	$\begin{array}{c} 0,7\pm0,9\\ 29,3 \end{array}$	$\begin{array}{c} 0,7\pm0,3\\ 40,8\end{array}$	$0,4 \pm 0,1$ 37,4
g.L ⁻¹ (%)	1,3-PDO	$1,2 \pm 0,4$ 41,2	$\begin{array}{c} 0,9\pm0,2\\ 44,6\end{array}$	$0,04 \pm 0,01$ 2,7
RALF 2				
g.L ⁻¹ (%)	Hbu	$\begin{array}{c} 0,5\pm0,04\\ 14,4 \end{array}$	$0,1 \pm 0,02$ 6,2	ND
g.L ⁻¹ (%)	HPr	$\begin{array}{c}0,2\pm0,1\\9,4\end{array}$	$\begin{array}{c} 0,1\pm0,05\\ 8,2\end{array}$	ND
g.L ⁻¹ (%)	Нас	$\begin{array}{c} 0,3\pm0,02\\17,4\end{array}$	$\begin{array}{c}0,3\pm0,1\\22,1\end{array}$	$\begin{array}{c} 0,3\pm0,05\\22,4\end{array}$
g.L ⁻¹ (%)	1,3-PDO	$\begin{array}{c} 1,3\pm0,4\\ 49,5\end{array}$	$\begin{array}{c} 1,2\pm0,2\\ 63,5\end{array}$	$1,1 \pm 0,3$ 77,5
g.L ⁻¹	EtOH	$0,1 \pm 0,1$	ND	ND

Tabela 25- Concentrações (g.L⁻¹) e frações molares (%) dos metabólitos detectados durante a operação dos RALFs.

130

n		\mathbf{r}
ч		٦.
/	,	\sim

Tabela 25 - Concentrações (g.L ⁻¹) e frações molares (%) dos metabólitos detectados
durante a operação dos RALFs (continuação).

	Metabólitos		Temperatura (°C)	
		55	60	65
RALF 3				
g.L ⁻¹ (%)	HBu	$\begin{array}{c} 0,3\pm0,1\\ 16,1\end{array}$	ND	$\begin{array}{c} 0,4\pm0,03\\ 46,2\end{array}$
g.L ⁻¹ (%)	HPr	$\begin{array}{c} 0,2\pm0,1\\ 15,3\end{array}$	ND	$\begin{array}{c} 0.1\pm0.03\\ 19.4\end{array}$
g.L ⁻¹ (%)	HAc	$\begin{array}{c} 0.7\pm0.1\\ 57.7\end{array}$	$0,1 \pm 0,02$ 55,3	$0,1 \pm 0,01$ 19,1
g.L ⁻¹ (%)	1,3-PDO	$\begin{array}{c} 0,2\pm0,02\\ 10,8 \end{array}$	$0,1\pm0,0\\44,7$	$0,1 \pm 0,03$ 15,3

Fonte: Elaboração própria (2020). RALF 1: (75% DQO vinhaça + 25 DQO glicerol); RALF 2: (50% DQO vinhaça + 50 DQO glicerol); RALF 3: (25% DQO vinhaça + 75 DQO glicerol).

5.5.1 Metabólitos solúveis detectados durante a operação do RALF 1

As concentrações e frações molares dos metabólitos produzidos em função da temperatura, no RALF 1, estão apresentadas na Tabela 25 e ilustrados na Figura 36 e 37. Os principais metabólitos produzidos, na 1° e 2° fase (55 e 60°C), foram 1,3-PDO (1,2 ± 0,4 e 0,9 ± 0,2) e ácido acético (HAc) (0,7 ± 0,9 e 0,7 ± 0,3 g.L⁻¹). Na 3° fase (65°C), predominaram os ácidos butírico (HBu) (0,8 ± 0,1 g.L⁻¹) e HAc (0,4 ± 0,1 g.L⁻¹).

Foram observadas variações nas concentrações dos metabólitos produzidos durante o experimento. Com o aumento da temperatura de 60 para 65°C (3° fase) a concentração de HBu aumentou de $0,2 \pm 0,5$ para $0,8 \pm 0,1$ g.L⁻¹, e a de 1,3-PDO diminui de $0,9 \pm 0,2$ para $0,04 \pm 0,01$ g.L⁻¹. Vale salientar que o HBu foi produzido em elevado percentual molar (44,9%) apenas na 3° fase operacional (65°C). Além disso, ocorreram oscilações no percentual molar do HAc e ácido propiônico (HPr) ao longo da operação, permanecendo entre 29,3 e 40,8% e 6,4 e 14,9%, respectivamente.



Figura 36 - Concentrações de metabólitos solúveis produzidos no RALF 1 em função da temperatura.

Fonte: Elaboração própria (2020).



Figura 37 - Fração molar dos principais metabólitos produzidos no RALF 1.

Fonte: Elaboração própria (2020).

Diante o exposto, pode-se inferir que ocorreram simultaneamente diferentes rotas fermentativas na codigestão de glicerol e vinhaça, haja vista a produção concomitante de H_2 e 1,3-PDO. Esta ocorrência pode ser fundamentada na utilização de cultura mista, como inóculo, e na codigestão de dois substratos.

As vias metabólicas de assimilação do glicerol por microrganismos anaeróbios e seus possíveis produtos foram citadas (item 3.3.2) e expostas anteriormente (Figura 9). Na formação de alguns metabólitos, há consumo de H₂, como é o caso do 1,3 PDO, que foi predominante nas duas primeiras fases (55 e 60°C). A formação de 1 mol de 1,3-PDO resulta no consumo de 1 mol de H₂ por mol de glicerol (Reação 9). Em contrapartida, a formação de alguns metabólitos produz H₂, dentre eles o HAc, em que, a cada mol formado, 3 mols de H₂ por mol de glicerol são gerados (Reação 6). Assim como o HBu, que apesar de estar em menor quantidade, nas duas primeiras fases (55 e 60°C) (15,4 e 8,3%, respectivamente), também contribuiu com a presença de H₂, tendo em vista que, 1 mol de HBu gera 2 mols de H₂ por mol de glicerol (Reação 7) (ZENG et al., 1996).

Glicerol
$$(C_3H_8O_3) \rightarrow \text{Acido Acético (CH_3COOH)}$$

 $C_3H_8O_3 + H_2O \rightarrow CH_3COOH + 3H_2 + CO_2$
(6)

Glicerol (C₃H₈O₃)
$$\rightarrow$$
 Ácido Butírico (C₄H₈O₂) (7)
2C₃H₈O₃ \rightarrow C₄H₈O₂ + 4H₂ + 2CO₂

Glicerol
$$(C_3H_8O_3) \rightarrow 1,3$$
-Propanodiol $(C_3H_8O_2)$
 $C_3H_8O_3 + H_2 \rightarrow C_3H_8O_2 + H_2O$
(9)

Levando em consideração os carboidratos presentes na vinhaça e a fermentação destes (item 3.3.1), a formação de 1 mol de HBu, gera 4 mols de H_2 por mol de sacarose (Reação 4). Já na formação de 1 mol de HAc, 8 mols de H_2 são formados por mol de sacarose (Reação 3) (CAI et al., 2011).

Glicose
$$\rightarrow$$
 Ácido Acético
 $C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2C_2H_4O_2 + 2CO_2 + 4H_2$
(3)

Glicose
$$\rightarrow$$
 Ácido Butírico (4)
C₆H₁₂O₆ \rightarrow C₄H₈O₄ + 2CO₂ + 2H₂

O H₂ detectado, nas duas primeiras fases (55 e 60°C) pode ser justificado pelo favorecimento da rota de produção de HBu e HAc, tendo em vista que as frações molares destes ácidos somaram 44,7% e 49,0% do total de metabólitos nas temperaturas de 55 e 60°C, respectivamente. Desse modo, a presença de H₂ pode estar relacionada à geração destes ácidos (FONTES LIMA; MOREIRA; ZAIAT, 2013).

A partir dos dados obtidos, pode-se sugerir que ocorreu atividade hidrogenogênica, através da via oxidativa, e o H_2 produzido foi utilizado, simultaneamente, na via redutora, consumindo H^+ na oxidação do NAD (PARANHOS; SILVA, 2020). Contudo, apesar da ocorrência da via redutora, nem todo H_2 produzido, por meio da rota de produção de HBu e HAc, foi consumido pela via redutora, o que elucida a produção concomitante de H_2 e 1,3-PDO.

Uma hipótese que pode ser levantada é que, à medida em que ocorreu a fermentação dos substratos, a pressão parcial de H_2 no meio aumentou, tendo em vista o TDH de 4 h e a concentração de matéria orgânica presente no meio (10 g.L⁻¹). Por este motivo, tende a ocorrer o consumo de H_2 por microrganismos consumidores de H_2 que crescem devido à disponibilidade excessiva de H_2 no meio líquido. Em geral, nesta situação, ocorre a produção de HPr, atuando como mecanismo de controle da pressão parcial de H_2 (FUESS, 2017), porém em um meio contendo glicerol, a fermentação inclina-se para a rota de 1,3-PDO, que ao ser formado, diminui a concentração de H_2 no meio líquido (PARANHOS; SILVA, 2020).

A partir da Figura 36, é possível observar que a produção de 1,3 PDO decresceu ligeiramente com a elevação da temperatura (60 para 65° C) (0,9 ± 0,2 para 0,04 ± 0,01 g.L⁻¹). Esta redução acompanhou o cessar da produção de H₂, discorrido anteriormente no item 5.3. Em maiores temperaturas, a produção de H₂ pode ter sido prejudicada, o que, consequentemente, afetou a produção de 1,3-PDO, tendo em vista que a sua produção ocorre a partir do consumo de H₂.

Além disso, na 3° fase (65°C), houve um aumento na concentração de HBu (0,2 ± 0,5 para 0,8 ± 0,1 g.L⁻¹). Vale salientar que a predominância deste ácido em sistemas acidogênicos destinados à produção de H₂ resulta da obtenção de maiores quantidades de energia metabólica ($\Delta G^{0^{\circ}} = -257,1 \text{ kJ.mol}^{-1}$), quando comparada com a via do ácido acético ($\Delta G^{0^{\circ}} = -184,2 \text{ kJ.mol}^{-1}$). Apesar da rota butírica fermentativa ser comumente observada em sistemas acidogênicos (HWANG et al., 2009a), a geração de metabólitos mais reduzidos, como o HBu, implica

prejuízos à produção de hidrogênio, tendo em vista a retenção deste nas moléculas mais reduzidas (FERNANDES et al., 2010; FUESS, 2017).

O acréscimo na concentração de HBu $(0,2 \pm 0,5$ para $0,8 \pm 0,1$ g.L⁻¹) e a diminuição na concentração de HAc $(0,7 \pm 0,3$ para $0,4 \pm 0,1$ g.L⁻¹), durante a 3° fase experimental (65°C), sugere que a formação de H₂, possivelmente, ocorreu a partir da rota de ácido lático (HLa) (Reação 14), visto que o HLa está presente na vinhaça de cana de açúcar (MATSUMOTO; NISHIMURA, 2007). Entretanto, essa rota gera menos H₂ do que as vias de HAc e HBu (AGLER et al., 2011).

$CH_{3}COOH + 2CH_{3}CHOHCOOH \rightarrow H_{2} + 3/2CH_{3}CH_{2}COOH + 2CO_{2} + H_{2}O (14)$

Em geral, sob condições de escassez de substrato, as bactérias utilizam HLa, juntamente com outra fonte de carbono, como HAc, com finalidade de produzir H₂ e HBu (CABROL et al., 2017). Porém, o aumento da concentração de HBu ocorreu apesar da disponibilidade de substrato no meio, visto que a conversão de carboidratos foi de 27,8%, com concentração de carboidratos no efluente de $1,21 \pm 0,26$ g.L⁻¹, durante a 3° fase operacional (65°C). Além disso, foi observado que, possivelmente, o aumento da temperatura (60 para 65°C) pode ter favorecido a ocorrência da rota de HLa, uma vez que na temperatura de 65°C houve o aumento da concentração de HBu no RALF 1 ($0,2 \pm 0,5$ para $0,8 \pm 0,1$ g.L⁻¹).

Outro ponto a ser abordado corresponde a fermentação na rota do HPr (Reações 3 e 9). A formação deste ácido a partir da sacarose leva ao consumo do H₂ disponível no meio reacional, ocasionando declínios na produção de H₂ (LI et al., 2009). No entanto, neste estudo, não foi observado acúmulo significativo nas concentrações de HPr, nos três reatores, durante todo experimento. Este comportamento indica baixa interferência do mecanismo de controle sobre a pressão parcial de H₂ a partir do HPr. Dessa forma, a razão entre as concentrações de HBu/HAc proporciona uma melhor compreensão acerca do desempenho do RALF 1, quanto à produção de H₂.

Na Figura 38 é exibida a razão HBu/HAc e o HY ao longo da operação. Ao analisar a figura pode-se relacionar as fases em que houve maior produção de H₂ aos menores valores da razão HBu/HAc (<2,0). Em geral, as maiores produções de H₂ ocorrem, a partir de águas residuárias ricas em carboidratos, sob baixos valores da razão HBu/HAc (0,3-0,9) (KHANAL et al., 2004; FERRAZ JÚNIOR. et al., 2014b). A partir dos valores apresentados na Figura 38, pode-se inferir que a principal rota fermentativa associada à produção de H₂ neste trabalho compreendeu a via acética.



Figura 38- Razão HBu/HAc e o HY ao longo da operação do RALF 1.

Akutsu et al. (2005) utilizando reatores em batelada (30°C), e glicerol (5 g DQO.L⁻¹) como substrato, obtiveram majoritariamente 1,3-PDO (50,0-70,0%) e HAc (15,0-20,0%), semelhante ao observado no presente trabalho, tendo em vista que, 1,3-PDO (41,2 e 44,6%) foi predominante nas duas primeiras fases (55 e 60°C) e HAc (29,3–40,8%) em todas as fases de operação do RALF 1. Além disso, os autores destacaram a relevância de investigar a produção simultânea de 1,3-PDO e H₂, a partir de glicerol, utilizando cultura mista, visto que ainda é um tópico pouco explorado. Dessa forma, apesar de analisar a codigestão de dois substratos, as observações feitas neste trabalho podem contribuir com a discussão acerca do tema.

Diferentes substratos (esgoto doméstico, glicerol, água residuária de arroz parboilizado e vinhaça) foram avaliados por Peixoto et al. (2012), a fim de analisar o potencial destes na produção simultânea de H₂ e CH₄, em batelada (25°C). Os autores relataram que o melhor rendimento de H₂, a partir de águas residuárias ricas em carboidratos, foi alcançado com altas taxas de HAc/HBu, ou seja, predomínio da rota acética, assim como indicaram os resultados do RALF 1. Dentre os substratos analisados a vinhaça apresentou melhores resultados em termos de recuperação de energia, remoção de matéria orgânica e produção de hidrogênio. O segundo melhor substrato foi o glicerol, no que se refere a recuperação de energia e remoção de matéria

Fonte: Elaboração própria (2020).

orgânica. Vale salientar que os melhores substratos para a produção de biogás apontados pelos autores foram utilizados no presente trabalho.

Utilizando RALF (55°C) alimentado com glicerol (5 g DQO.L⁻¹) e TDH de 3 h Ferreira (2014) registrou predominância de HAc e 1,3-PDO, com concentrações de 0,2 e 1,1 g.L⁻¹, respectivamente. Os valores registrados no RALF 1 foram ligeiramente superiores aos relatados por Ferreira (2014), visto que foram alcançadas concentrações de 0,7 \pm 0,3 g.L⁻¹ de HAc e 1,2 \pm 0,4 de 1,3-PDO. Ambos os experimentos foram conduzidos na temperatura de 55°C e na mesma configuração de reator (RALF), porém a concentração dos substratos adotada no presente trabalho (10 g DQO.L⁻¹) foi distinta da concentração empregada no trabalho de Ferreira (2014) (5 g DQO.L⁻¹), além da codigestão adotada no RALF 1 (75% DQO vinhaça + 25% DQO glicerol), o que pode justificar a diferença nos valores obtidos.

Os principais metabólitos solúveis observados nos experimentos de Ramos e Silva (2020) foram HAc ($18,8 \pm 1,6\%$, 876 ± 179 mg.L⁻¹), HBu ($31,4 \pm 3,5\%$, 2144 ± 316 mg.L⁻¹), HPr ($13,2 \pm 2,0\%$, 761 ± 81 mg.L⁻¹), HLa ($10,2 \pm 0,4\%$, 711 ± 54 mg.L⁻¹), ácido capróico (HCa) ($10,2 \pm 1,1\%$, 921 ± 18 mg.L⁻¹) e ácido isobutírico (HIsBu) ($16,2 \pm 1,3\%$, 1108 ± 334 mg.L⁻¹). No RALF 1 do presente estudo a concentração de HAc ($0,7 \pm 0,3$ g.L⁻¹) foi similar a concentração obtida pelos autores ($0,9 \pm 0,2$ g.L⁻¹). Contudo, diferente dos autores, no presente estudo não foram detectados os ácidos lático, capróico e isobutírico.

5.5.2 Metabólitos solúveis detectados durante a operação do RALF 2

Durante a 1° fase de operação (55°C) do RALF 2 o 1,3-PDO foi predominou entre as demais ($1,2 \pm 0,4 \text{ g.L}^{-1}$) com fração molar de 49,5%, seguido do HAc ($0,3 \pm 0,02 \text{ g.L}^{-1}$) com fração molar de 17,4%. O EtOH foi detectado somente durante a 1° fase de operação e aparentemente não está relacionado às alterações observadas na produção de H₂. Pode-se sugerir que a presença deste é decorrente do processo de destilação que permanece na vinhaça, considerado etanol residual. Além destes, foram detectados o HBu (14,4%) e HPr (9,4%) (Tabela 22).

A produção de HBu diminuiu durante a 2° fase de operação (60°C), de 14,4% para 6,2% da fração molar e, ao longo da 3° fase, este metabólito não foi detectado no efluente. O mesmo foi observado na fração molar de HPr, que se manteve estável nas duas primeiras fases (55 e 60 °C) (9,4 e 8,2%), porém ao elevar a temperatura para 65°C, não foi detectado. Além disso, o HAc (0,3 \pm 0,1 g.L⁻¹) e 1,3-PDO (1,2 \pm 0,2 g.L⁻¹) se mantiveram com valores constantes e frações molares de 22,1% e 63,5%, respectivamente.

Os metabólitos solúveis detectados durante a 3° fase de operação (65°C) se restringiram ao HAc $(0,3 \pm 0,05 \text{ g.L}^{-1})$ e 1,3-PDO $(1,1 \pm 0,3 \text{ g.L}^{-1})$, apresentando frações molares de 22,4% e 77,5%, respectivamente. As concentrações destes foram constantes ao longo do experimento. As Figuras 39 e 40 apresentam graficamente as concentrações e as distribuições molares dos metabólitos detectados durante a operação do RALF 2.



Figura 39- Concentrações de metabólitos solúveis produzidos no RALF 2 em função da temperatura.

Fonte: Elaboração própria (2020).

O RALF 2 apresentou maiores concentrações de 1,3-PDO durante todas as fases de operação, em relação aos dados obtidos do RALF 1. Vale salientar que, a principal diferença entre os dois reatores está na proporção dos substratos utilizados na codigestão. Em que, o RALF 2 contém uma maior concentração de glicerol (5 g.L⁻¹), correspondente a 50% DQO. Enquanto que o RALF 1 contém 2,5 g.L⁻¹ de glicerol, correspondente a 25% DQO. Com isso, pode-se inferir que o aumento na concentração de glicerol acarretou no aumento da produção de 1,3-PDO.



Figura 40- Fração molar dos principais metabólitos produzidos no RALF 2.

Assim como observado no presente trabalho, Wu et al. (2011), Moscovi, Trably e Bernet (2016), Veras et al. (2019) e Sittijunda e Reungsang (2020) verificaram que o excesso na concentração de glicerol ocasionou aumento na concentração de 1,3-PDO e, consequentemente, a diminuição de H₂. Os autores sugerem que a clivagem do piruvato em acetil-CoA, sob limitação de glicerol, produz mais H₂, porém quando o glicerol encontra-se em excesso no meio, mais NADH₂ é utilizado para produção 1,3-PDO.

Liu et al. (2011) relatam que os equivalentes de redução gerados na conversão de piruvato em acetil-CoA são utilizados para reduzir a ferredoxina, que é reoxidada pela produção de H_2 por meio da enzima hidrogenase. Porém, quando pouco H_2 é formado, os equivalentes de redução são disponibilizados para a produção de outros compostos reduzidos, como 1,3-PDO (Equação 9).

Glicerol
$$(C_3H_8O_3) \rightarrow 1,3$$
-Propanodiol $(C_3H_8O_2)$
 $C_3H_8O_3 + H_2 \rightarrow C_3H_8O_2 + H_2O$
(9)

A via redutora de fermentação do glicerol ocorre devido ao estado altamente reduzido de carbono no glicerol, cuja incorporação na massa celular gera equivalentes de redução. Desse modo, a geração de nova biomassa, a partir de glicerol, resulta em maior quantidade de NADH₂

Fonte: Elaboração própria (2020).

utilizado na transformação de glicerol em 1,3-PDO. Devido a esta transformação resultar no consumo líquido de equivalentes de redução, essa via fornece um meio para alcançar o equilíbrio redox na ausência de aceptores de elétrons (YAZDANI; GONZALES, 2007).

Segundo Andaloussi, Amine e Petitdemange (1998), na fermentação de glicerol e glicose, o metabolismo da glicose fornece equivalentes de redução para a formação de 1,3- PDO e ATP para o crescimento celular. Além disso, o efeito da sacarose como cossubstrato, em reator em batelada, sob condições microaeróbias, foi explorado por Yang e Tian (2007) e, como resultado, a presença de sacarose otimizou significativamente a produção de 1,3-PDO. Os autores sugerem que a codigestão é uma alternativa para otimizar a produção de 1,3 PDO a partir do glicerol.

Como citado anteriormente, a razão HBu/HAc é imprescindível para um melhor entendimento da produção de H₂. As mudanças nessa razão sugerem alterações no metabolismo, originadas de diversas condições do meio, ou devido ao acúmulo de produtos (KHANAL et al., 2004). No RALF 2 as razões HBu/HAc observadas foram de 1,22 e 0,41 para as temperaturas de 55 e 60°C, respectivamente. Na temperatura de 65°C não foi detectada a presença de HBu no efluente. Além disso, apesar de ter sido registrada menor razão HBu/HAc (0,41), na 2° fase operacional (60°C), não houve produção de H₂ (Figura 41). Os resultados indicam que ocorreram mudanças no metabolismo microbiano, favorecendo a degradação de glicerol em outros subprodutos. A conversão de glicerol em 1,3-PDO através da via redutiva, consume NADH da produção de biomassa, ocasionando decréscimo na produção de H₂. A diminuição ou ausência de H₂ concomitante a produção de 1,3-PDO também foi relatada nos trabalhos de Moscovi, Trably e Bernet (2016), Sittijunda e Reungsang (2017), Veras et al. (2019) e Sittijunda e Reungsang (2020).



Figura 41- Razão HBu/HAc e o HY ao longo da operação do RALF 2.

Fonte: Elaboração própria (2020).

Alguns trabalhos da literatura de referência reportam tendências semelhantes as observadas no presente estudo. Entre eles está o trabalho desenvolvido por Temudo et al. (2008), o qual avaliou a codigestão de glicose e glicerol, em reatores quimiostáticos (30°C). A concentração de substrato utilizada foi de 4 g DQO.L⁻¹, sendo 50% da DQO da glicose e 50% da DQO do glicerol. Inicialmente, o reator foi alimentado apenas com glicose e, em seguida, o glicerol foi adicionado, a fim de verificar o efeito da codigestão. Foi observado que a adição de glicerol (2 g DQO.L⁻¹), no reator alimentado com glicose, causou um aumento imediato de NADH dentro da célula, induzindo a produção de 1,3-PDO e diminuindo o fluxo de glicólise. O rendimento máximo atingido de 1,3-PDO foi de 0,14 ± 0,02 mol.C₃ mol⁻¹. Uma tendência similar foi observada no presente estudo, porém relacionado ao aumento da concentração de glicerol, entre os RALFs 1 e 2 (RALF 1= 2,5 g.L⁻¹ e RALF 2= 5 g.L⁻¹ de glicerol). A qual acarretou o aumento da concentração de 1,3-PDO, nas temperaturas de 60 e 65°C.

Chookaew et al. (2014) operando UASB (40°C) com diferentes concentrações de glicerol (10, 20 e 30 g.L⁻¹) verificaram que, nas três concentrações de glicerol testadas, houve predominância de 1,3-PDO. A maior concentração foi registrada (9,0 g.L⁻¹) com 20 g.L⁻¹ de glicerol e TDH de 12 h. No RALF 2, do presente trabalho, a concentração máxima de 1,3-PDO (1,3 g.L⁻¹) foi atingida na temperatura de 55°C e TDH de 4 h. Os autores sugerem que o registro de altas concentrações de 1,3-PDO implica o domínio de *Klebsiella sp.* TR17, que foi

imobilizada em grânulos de lodo anaeróbio com sucesso. Além disso, foi observado que quando o glicerol estava em excesso no meio (>20 g.L⁻¹), mais NADH₂ foi utilizado para a formação de 1,3-PDO do que para a produção de H₂.

A mesma tendência foi observada no estudo realizado por Sittijunda e Reungsang (2020). No qual os autores analisaram a produção de 1,3-PDO em UASB (55°C) alimentado com glicerol. O efeito da TCO também foi investigado (25, 37,5 50 62,5 e 75 g.L⁻¹.d⁻¹). Ao utilizar glicerol puro, a produção de 1,3-PDO foi de 58,06, 73,75, 88,28, 83,72 e 98,27 mmol.L⁻¹, obtidas em TCOs de 25, 380 37,5, 50, 62,5 e 75 g.L⁻¹.d⁻¹, respectivamente. A produção máxima de 1,3-PDO, 98,27 mmol.L⁻¹, foi obtida na TCO de 75 g.L⁻¹.d⁻¹. Foi observado acréscimo na produção de 1,3-PDO com o aumento da TCO de 25 para 75 g.L⁻¹.d⁻¹, sugerindo que o aumento na concentração de substrato, favoreceu a conversão de glicerol em 1,3-PDO. As informações relatadas pelos autores reforçam que as mudanças nas proporções de substratos, utilizadas no presente trabalho, alteraram o metabolismo microbiano.

5.5.3 Metabólitos solúveis detectados durante a operação do RALF 3

No RALF 3, o principal metabólito produzido durante a 1° fase operacional (55°C) foi o HAc (0,7 ± 0,1 g.L⁻¹) com fração molar de 57,7%. Enquanto que o HPr, HBu e 1,3-PDO foram produzidos em menores concentrações (0,2 ± 0,1 g.L⁻¹, 0,3 ± 0,1 g.L⁻¹ e 0,2 ± 0,02 g.L⁻¹, respectivamente). Durante a 2° fase operacional (60°C) os metabólitos solúveis detectados se restringiram a HAc (0,1 ± 0,02 g.L⁻¹) e 1,3-PDO (0,1 ± 0,001 g.L⁻¹). Já na 3° fase foi observado predominância de HBu (0,4 ± 0,03 g.L⁻¹) com fração molar de 46,2%. Além deste, foram detectados HPr, HAc e 1,3-PDO com concentrações similares de 0,1 ± 0,03 g.L⁻¹, 0,1 ± 0,01 g.L⁻¹ e 0,1 ± 0,03 g.L⁻¹, respectivamente.

Apesar de ter se mantido estável em relação a fração molar nas temperaturas de 55 e 60°C (57,7 e 55,3%), a concentração de HAc diminuiu na temperatura de 60°C (2° fase), de 0,7 \pm 0,1 para 0,1 \pm 0,02 g.L⁻¹. Vale salientar que, apesar das oscilações no percentual molar de 1,3-PDO (10,8 e 44,7%), nas duas primeiras fases (55 e 60°C), as concentrações se mantiveram estáveis durante todo o experimento (0,2 \pm 0,02 g.L¹ - 0,1 \pm 0,03 g.L¹) (Tabela 25) (Figuras 42 e 43). Em suma, isto ocorreu devido as mudanças no metabolismo dos microrganismos durante a 2° fase (60°C), na qual apenas os HAc e 1,3-PDO foram detectados.

A partir da Figura 42, pode-se notar expressivo decréscimo na concentração de HAc e incremento na concentração de HBu na corrente efluente ao reator, justificando a redução na produção de H₂ previamente apresentada (item 5.4) (Figura 34).



Figura 42 - Concentrações de metabólitos solúveis produzidos no RALF 3 em função da temperatura.

Quando comparado com os outros reatores (RALF 1 e 2), o RALF 3 apresentou baixas concentrações de 1,3-PDO durante todo o experimento $(0,2 \pm 0,02 \text{ g.L}^1)$. Em contrapartida, houve produção fermentativa de H₂ (PVH máxima de 1,6 ± 0,4 L.d⁻¹.L⁻¹ e HY de 0,35 ± 0,09 mmol H₂.g DQO adicionada⁻¹), que pode ter acontecido em decorrência do equilíbrio entre a concentração de matéria orgânica alimentada e o tempo de retenção do substrato no reator. Com isso, a conversão microbiana do substrato ocorre antes de atingir o nível crítico de pressão parcial de H₂ (PARANHOS; SILVA, 2020). Devido ao fato de o RALF 3 conter menos vinhaça (75% DQO glicerol e 25% DQO vinhaça), os ácidos produzidos via rota oxidativa a partir da vinhaça não foram suficientes para atingir o nível crítico de pressão parcial de H₂ com isso, o consumo de H₂ por microrganismos através da via redutiva de fermentação de glicerol não foi favorecido, o que justifica as baixas concentrações de 1,3-PDO observadas durante a operação do RALF 3.

Fonte: Elaboração própria (2020).

Além disso, alguns fatores podem contribuir para que a pressão parcial de H₂ se mantivesse baixa (10^{-4} a 10^{-6} atm). Um dos fatores confere-se a configuração do reator utilizado, visto que o RALF possui alta velocidade ascensional, a fim de garantir a fluidização do leito, o que favorece o desprendimento de H₂ do meio líquido (LIN et al., 2006; ZHANG et al., 2007). A temperatura, na faixa termofílica, também pode ter contribuído, uma vez que, em elevadas temperaturas, a solubilidade de compostos gasosos presentes no meio líquido diminui e, consequentemente, menores concentrações de biogás estarão dissolvidas no reator (LETTINGA; REBACZEEMAN, 2001). Como já foi abordado previamente (item 3.3), a retirada de H₂ do meio força a reação a ocorrer no sentido de formar mais H₂.



Figura 43- Porcentagem molar dos principais metabólitos produzidos no RALF 3.

Fonte: Elaboração própria (2020).

Durante a 3° fase operacional do RALF 3, foi observado um comportamento similar ao relatado anteriormente no RALF 1. Com o aumento da temperatura (60 para 65°C), o HBu foi detectado no efluente ($0,4 \pm 0,03$ g.L⁻¹), sugerindo que a temperatura de 65°C favoreceu a rota de HLa (Reação 14) (MATSUMOTO; NISHIMURA, 2007). Além disso, embora esta rota seja favorecida sob condições de deficiência de substrato, o aumento da concentração de HBu ocorreu, apesar da disponibilidade de substrato no meio.

CH₃COOH + 2CH₃CHOHCOOH → H₂ + 3/2CH₃CH₂CH₂COOH + 2CO₂ + H₂O (14)

Assim como avaliada nos outros reatores, a razão HBu/HAc durante as três fases experimentais (55, 60 e 65°C) do RALF 3 estão expostas na Figura 44. Na temperatura de 55°C a razão foi de 0,41, e na temperatura de 60°C o HBu não foi detectado, contudo houve produção de H₂ (PVH máxima de 1,6 ± 0,4 L.d⁻¹.L⁻¹ e HY de 0,31 ± 0,07 mmol H₂.g DQO adicionada⁻¹), indicando que a principal rota fermentativa associada à produção de H₂ compreendeu a via acética. Durante a temperatura de 65°C, a razão obtida foi de 3,55, valor considerado alto para a produção de H₂, o que pode ser elucidado pela rota de baixo rendimento do HLa, observada durante a 3° fase de operação (65°C).

Figura 44 - Razão HBu/HAc e o HY ao longo da operação do RALF 3.



Fonte: Elaboração própria (2020).

É pertinente mencionar alguns trabalhos da literatura de referência que reportam a influência da glicose no processo de fermentação com altas concentrações de glicerol. Conforme discutido por Tokumoto e Tanaka (2012), altas concentrações de glicerol (75,7 g.L⁻¹) não são facilmente degradadas por cultura mista, porém, foi constatado que, ao adicionar glicose (3 ppm), no reator em batelada (30°C) a fermentação de H₂ e a degradação de glicerol foram estimuladas com PVH de 9,85 mL e HY de 0,11 mol.mol glicerol⁻¹, após 7 dias de incubação. Este cenário ocorreu devido ao crescimento específico de *C. pasteurianum, B.*
licheniformis, B. vietnamiensis e B. phenoliruptrix, os quais utilizam o glicerol e glicose como substratos. A glicose promoveu o crescimento de bactérias degradadoras e altamente resistentes ao glicerol, possibilitando o processo contínuo de bioconversão. Dado o exposto, pode-se inferir que a utilização de vinhaça na codigestão com o glicerol, no presente trabalho, auxiliou o processo de fermentação.

Tokumoto e Kashiwagi (2012) avaliaram o efeito de alguns cossubstratos, dentre eles a glicose, na produção de metano. O experimento foi realizado em batelada (30°C) com 0,4 mL de solução de glicerol a 75% (v.v⁻¹) (concentração do reator 6% (v.v⁻¹) e 3 ou 30 ppm de glicose (ajustado a concentração desejada no reator). No 5° dia de incubação, quando a produção de CH₄ estabilizou, 100 μ L de solução de glicose a 750 ppm foram introduzidos no meio reacional. A produção de H₂ foi detectada após cinco dias da adição da glicose e a produção de metano foi deslocada para o 12° dia, visto que antes de adicionar 750 ppm a produção de CH₄ ocorria no 5° dia. Os resultados sugerem que a glicose catalisou a degradação de altas concentrações de glicerol e modificou a população bacteriana dominante no meio, resultando na produção de H₂. Assim como no trabalho descrito no parágrafo anterior, pode-se considerar que a glicose atuou como promotor de fermentação.

No estudo desenvolvido por Costa (2017), foi avaliado a produção contínua de H₂, utilizando glicerol bruto (10 g.L⁻¹) e cultura mista, em RALF termofílico (55°C), operado sob variação de TDH (8 – 0,5 h). No TDH de 6 h, foi observado a maior concentração de 1,3-PDO no efluente (1,62 ± 0,25 g.L⁻¹). Contudo, no TDH de 4 h, foi registrada a menor concentração deste metabólito (0,3 ± 0,1 g.L⁻¹). O experimento do autor foi realizado em condições semelhantes as utilizadas no RALF 3, exceto pela concentração de glicerol utilizada no presente trabalho (7,5 g.L⁻¹) e a codigestão de dois substratos (vinhaça de cana-de-açúcar e glicerol). Neste estudo as concentrações de 1,3-PDO obtidas nas temperaturas de 55, 60 e 65°C, estiveram entre 0,1 ± 0,03 e 0,1 ± 0,02 g.L⁻¹, valores inferiores aos registrados por Costa (2017).

A produção de 1,3-PDO em RALF, a partir de glicerol bruto, cultura mista e meio nutricional otimizado foi investigada, em reatores em batelada (37°C), por Paranhos e Silva (2018). Além disso, foi analisada a influência do TDH aplicado (36, 28, 20 e 12 h). As maiores concentrações de 1,3-PDO foram obtidas nos TDHs de 20 e 28 h (1,3 g.L⁻¹) com concentração de glicerol de 26 g.L⁻¹. No TDH de 12 h foi registrada a menor concentração de 1,3-PDO (0,1 g.L⁻¹). Os dados apresentados no estudo sugerem que para produzir 1,3-PDO, a partir de

maiores concentrações de glicerol, é necessário adotar maior TDH, o que inviabilizou maior produção de 1,3-PDO no RALF 3, visto que o TDH adotado foi de 4 h.

A partir destes trabalhos, foi observado a relevância da codigestão de vinhaça de canade-açúcar e glicerol para a produção fermentativa de H₂. Além disso, diante dos resultados apresentados ao longo deste tópico fica evidente a predominância da rota de formação de 1,3-PDO na maioria das condições avaliadas. Isto posto, o tópico subsequente foi direcionado para discussão dos rendimentos e produtividades de 1,3-PDO.

5.5.4 Produção Volumétrica e Rendimento de 1,3-Propanodiol

Na Tabela 26 estão apresentados os valores de produção volumétrica (PV 1,3-PDO) e de rendimento (1,3-PDOY) de 1,3-PDO obtidos neste estudo. No RALF 1 foi observado estabilidade nos valores de 1,3-PDOY durante as duas primeiras fases (55 e 60°C) com valores médios de 0,67 \pm 0,13 e 0,71 \pm 0,10 mol 1,3-PDO.mol⁻¹ glicerol_{consumido}. Porém, na 3° fase experimental (65°C) o 1,3-PDOY diminuiu para 0,03 \pm 0,01 mol 1,3-PDO.mol⁻¹ glicerol_{consumido}. A mesma tendência foi observada nos valores de PV 1,3-PDO, em que durante as duas primeiras fases (55 e 60°C), foram registrados valores semelhantes de 0,39 \pm 0,07 e 0,32 \pm 0,04 g.L⁻¹ h⁻¹, contudo, com a elevação da temperatura para 65°C a PV 1,3-PDO atingida foi de 0,01 \pm 0,09 g.L⁻¹ h⁻¹.

No RALF 2 foi observado um padrão distinto, visto que com a elevação da temperatura de 55 para 60°C o 1,3-PDOY aumentou de 0,46 \pm 0,12 para 0,89 \pm 0,26 mol 1,3-PDO.mol⁻¹ glicerol_{consumido}. Na 3° fase experimental (65°C) o valor de 1,3-PDOY se manteve estável com 0,85 \pm 0,21 mol 1,3-PDO.mol⁻¹ glicerol_{consumido}. Em relação a PV 1,3-PDO o RALF 2 apresentou o mesmo padrão observado no 1,3-PDOY. Na temperatura de 55°C foi registrado valor médio de 0,41 \pm 0,11 g.L⁻¹ h⁻¹. Nas temperaturas de 60 e 65°C os valores médios se mantiveram estáveis com 0,38 \pm 0,06 e 0,37 \pm 0,08, respectivamente.

Na temperatura de 55°C, o RALF 3 apresentou 1,3-PDOY de 0,46 \pm 0,15 mol 1,3-PDO.mol⁻¹ glicerol_{consumido}. Durante a 2° fase experimental (60°C), foi atingido valor médio de 0,82 \pm 0,19 mol 1,3-PDO.mol⁻¹ glicerol_{consumido} e com o aumento da temperatura para 65°C, o 1,3-PDOY diminuiu para 0,39 \pm 0,13 mol 1,3-PDO.mol⁻¹ glicerol_{consumido}. Enquanto que o valores médios de PV 1,3-PDO permaneceram próximos com 0,05 \pm 0,01, 0,04 \pm 0,01 e 0,03 \pm 0,02 g.L⁻¹ h⁻¹, nas temperaturas de 55, 60 e 65°C, respectivamente.

Dentre os resultados de 1,3-PDOY mencionados, vale destacar os valores registrados no RALF 2, nas temperaturas de 60 e 65°C, com valores de 0,89 \pm 0,26 e 0,85 \pm 0,21

mol 1,3-PDO.mol⁻¹ glicerol_{consumido}, respectivamente, e o valor de 0,82 \pm 0,19 mol 1,3-PDO.mol⁻¹ glicerol_{consumido} observado no RALF 3, na temperatura de 60°C, visto que estes valores foram próximos ao rendimento teórico de 1,3-PDO (1 mol 1,3-PDO.mol glicerol⁻¹), indicando que a via de formação de 1,3-PDO (Reação 9) foi favorecida nestas temperaturas e proporções adotadas.

Glicerol (C₃H₈O₃)
$$\rightarrow$$
 1,3-Propanodiol (C₃H₈O₂)
C₃H₈O₃ + H₂ \rightarrow C₃H₈O₂ + H₂O (9)

A partir da figura 45 é possível observar a relação entre o 1,3 PDOY e HY no RALF 1. O HY e 1,3-PDOY foram similares, durante a 1° fase experimental (55°C), enquanto que na 2° fase (60°C) o 1,3-PDOY foi superior ao HY. Durante a 3° fase (65°C), foi observado redução nos valores, indicando que, a temperatura de 65°C não favoreceu a produção de H₂ e 1,3-PDOY.



Fonte: Elaboração própria.

Já no RALF 2 (Figura 46), foi observado que o 1,3-PDOY se sobressaiu em relação ao HY, durante todas as fases experimentais (55, 60, 65°C), sugerindo que ocorreu atividade hidrogenogênica, através da via oxidativa, e o H₂ produzido foi utilizado na via redutora, consumindo H⁺ na oxidação do NAD (PARANHOS; SILVA, 2020). Além disso, pode-se

observar que o aumento da temperatura para 65°C não ocasionou prejuízos significativos ao 1,3-PDOY. Assim como observado no RALF 2, no RALF 3 (Figura 47) o HY foi superior ao 1,3-PDOY durante todas as fases experimentais (55, 60 e 65°C).



Fonte: Elaboração própria.

Figura 47- Relação entre HY e 1,3-PDOY no RALF 3.



Fonte: Elaboração própria.

Para realizar uma melhor comparação dos dados relatados na literatura mencionada neste tópico, foram agrupados dados de desempenho de produção volumétrica e rendimento de 1,3-PDO, a partir do glicerol (Tabela 27). Alguns valores relatados nos trabalhos estão próximos aos valores observados no presente estudo. Vale salientar que alguns fatores como tipo de inóculo, concentração de substrato, configuração do reator, meios nutricionais utilizados, entre outros, podem interferir na produção-PDO.

Fases	Temperatura (°C)	PV 1,3-PDO (g.L ⁻¹ h ⁻¹)	1,3-PDOY' (g 1,3-PDO.g ⁻¹ glicerol _{consumido})	1,3-PDOY (mol 1,3-PDO.mol ⁻¹ glicerol _{consumido})		
RALF 1						
1	55	$0,\!39\pm0,\!07$	$0{,}55\pm0{,}08$	0,67 ± 0,13		
2	60	$0,\!32\pm0,\!04$	$0,\!59 \pm 0,\!12$	$0,71 \pm 0,10$		
3	65	$0{,}01\pm0{,}09$	$0,\!02\pm0,\!01$	$0{,}03\pm0{,}01$		
RALF 2						
1	55	$0,\!41 \pm 0,\!11$	$0,37 \pm 0,13$	$0,46 \pm 0,12$		
2	60	$0,\!38\pm0,\!06$	$0,73 \pm 0,14$	$0,89 \pm 0,26$		
3	65	$0,\!37\pm0,\!08$	$0,\!70\pm0,\!09$	$0,85 \pm 0,21$		
RALF 3						
1	55	$0,\!05\pm0,\!01$	$0,\!38\pm0,\!06$	$0,\!46 \pm 0,\!15$		
2	60	$0,\!04\pm0,\!01$	$0,\!08\pm0,\!03$	$0,\!82\pm0,\!19$		
3	65	$0{,}03\pm0{,}02$	$0{,}32\pm0{,}05$	$0,\!39 \pm 0,\!13$		

Tabela 26 - Produção volumétrica e rendimento de 1,3-PDO obtidos nos RALFs, nas diferentes temperaturas.

Fonte: Elaboração própria (2020). PV1,3-PD: Produção volumétrica de 1,3-PDO; 1,3-PDY: Rendimento de 1,3-PDO em mol; 1,3-PDY': Rendimento de 1,3-PDO em grama. RALF 1: (75% DQO vinhaça + 25 DQO glicerol); RALF 2: (50% DQO vinhaça + 50 DQO glicerol); RALF 3: (25% DQO vinhaça + 75 DQO glicerol).

Reator	ReatorTemperatura (°C)Glicerol (g.L ⁻¹)		Inóculo	PV 1,3-PDO (g.L ⁻¹ h ⁻¹)	1,3-PDOY (mol 1,3-PDO.mol ⁻¹ glicerol _{consumido})	Referência
Fermentador três estágios (5000 L)	37	P: 15-40	K. pneumoniae M5al	0,92	0,53	Cheng et al. (2007)
Batelada	40			1,53	0,75	\mathbf{Z} has a stal (2007)
Batelada alimentada	40	P: 20	K. pneumoniae	0,79	0,70	Znang et al. (2007)
RALF	55	B: 10	Misto	0,27	0,80	Costa (2017)
Batelada	37	P: 30	Misto	-	0,57*	Paranhos e Silva
RALF	30	P: 26	WIISto	-	0,31*	(2018)
RALF	30	B: 2,9-17,1	Misto	1,04 (15 g.L ⁻¹)	1,05 (10 g.L ⁻¹)	Paranhos e Silva (2020)
		B: 2,5		0,32	0,31	
RALF	60	B: 5,0	Misto	0,38	0,89	Este estudo
		B: 7,5		0,04	0,82	

Tabela 27- Comparação do desempenho na produção de 1,3 PDO entre os trabalhos reportados na literatura e o presente estudo.

Fonte: Elaboração própria (2020). P- Glicerol puro; B- Glicerol bruto. *Rendimento de 1,3PDO em g 1,3-PDO.g⁻¹ glicerol_{consumido}. RALF 1: (75% DQO vinhaça + 25 DQO glicerol); RALF 2: (50% DQO vinhaça + 50 DQO glicerol); RALF 3: (25% DQO vinhaça + 75 DQO glicerol).

Cheng et al. (2007) utilizaram fermentador de três estágios, sob temperatura mesofílica (37°C), com volumes de 5, 50 e 5000 L, a fim de avaliar a produção de 1,3-PDO. Para o ensaio com volume de 5 L foi utilizada uma concentração inicial de glicerol de 50 g.L⁻¹. O rendimento obtido neste experimento foi de 0,36 g 1,3-PDO.mol⁻¹glicerol_{consumido}. Para os ensaios com volume de 50 e 5000 L, a concentração inicial de glicerol utilizada variou entre 15 e 40 g.L⁻¹. No fermentador de 50 L foi registrado rendimento de 0,52 g 1,3-PDO.mol⁻¹ glicerol_{consumido}. Os melhores resultados foram observados no reator com 5000 L de volume, com um rendimento de 0,53 mol 1,3-PDO.g⁻¹ glicerol_{consumido} e produção volumétrica de 0,92 g.L⁻¹h⁻¹. O valor máximo de rendimento obtido no presente estudo (0,89 mol 1,3-PDO.g⁻¹ glicerol_{consumido}) foi superior ao valor observado pelos autores, contudo o valor de PV 13-PDO (0,38 ± 0,06 g.L⁻¹h⁻¹) foi inferior.

Os valores de rendimento relatados por Zhang et al. (2007) foram próximos aos observados no presente estudo. Os autores utilizaram *Klebsiella pneumoniae*, glicerol puro (20 g.L⁻¹) e 6 g (NH₄)₂ SO₄.L⁻¹, como fonte de nitrogênio, para avaliar a produção de 1,3-PDO. Durante a fermentação em batelada (40°C) foi registrado concentração de 12,2 g.L⁻¹ de 1,3-PDO, rendimento máximo de 0,75 mol 1,3-PDO.mol⁻¹ glicerol_{consumido} e produção volumétrica de 1,53 g.h⁻¹ L⁻¹. Para as fermentações em batelada alimentada, apesar da concentração de 1,3-PDO ter aumentado (38,1 g.L⁻¹), os valores de rendimento e produção volumétrica diminuíram (0,70 mol 1,3-PDO.mol⁻¹ glicerol_{consumido} e 0,79 g.h⁻¹L⁻¹, respectivamente).

.Ao variar o TDH (0,5-8 h), Costa (2017) observou os maiores valores de produção volumétrica (0,27 \pm 0,04 g.L⁻¹h⁻¹) e rendimento (0,80 \pm 0,15 mol 1,3-PDO.mol⁻¹ glicerol_{consumido}) no TDH de 6 h. Para uma melhor comparação, a condição do presente trabalho que mais se assemelha ao trabalho desenvolvido por Costa é a 1° fase do RALF 3, visto que foi utilizado a mesma temperatura 55°C e TDH (4 h). Além disso, a concentração de glicerol utilizada (7,5 g L⁻¹) foi a mais próxima da concentração adotada pelo autor (10 g.L⁻¹). Nestas condições, o valor de rendimento obtido no presente trabalho (0,46 mol 1,3-PDO.mol⁻¹ glicerol_{consumido}), foi superior ao valor registrado pelo autor (0,14 \pm 0,06 mol 1,3-PDO.mol⁻¹ glicerol_{consumido}). Contudo, em relação a produção volumétrica os valores foram levemente semelhantes, dado que a produção volumétrica no presente estudo foi de 0,05 g.L⁻¹ h⁻¹ e o valor obtido pelo autor foi de 0,08 g L⁻¹ h⁻¹.

Paranhos e Silva (2018) avaliaram a produção de 1,3-PDO a partir do glicerol em reatores em batelada e contínuo, utilizando meio nutricional otimizado. No reator em batelada as concentrações de glicerol (22-30 g.L⁻¹), KH₂PO₄ (1,5-2,0 g.L⁻¹) e vitamina B12 (7-8 mg.L⁻¹) variaram dentro da faixa determinada. Sob essas condições o maior rendimento registrado foi

de 0,57 g 1,3-PDO.g⁻¹ glicerol_{consumido}. No RALF contínuo, foi utilizado 26 g.L⁻¹ de glicerol, 1,5 g.L⁻¹ de KH₂PO₄ e 7,8 mg.L⁻¹ de vitamina B12. O valor máximo de rendimento observado (0,31 g 1,3-PDO.g⁻¹ glicerol_{consumido}) foi inferior ao obtido em reator em batelada. Ambos os resultados obtidos pelos autores foram inferiores aos observados no presente estudo, muitos fatores podem ter sido determinantes para a diferença entre os valores obtidos, entre eles a concentração de glicerol e temperatura.

Os autores Paranhos e Silva (2020) registraram taxa máxima de produção volumétrica de 1,3-PDO (1,04 g.h⁻¹ L⁻¹) utilizando 15 g.L⁻¹ de glicerol e TDH de 2 h. O rendimento máximo de 1,3-PDO registrado foi de 1,05 mol 1,3-PDO.mol⁻¹ glicerol_{consumido}, utilizando 10 g.L⁻¹ de glicerol e TDH de 9,24 h. Os valores obtidos pelos autores foram superiores ao observados no presente trabalho, visto que a maior produção volumétrica de 1,3-PDO foi de 0,41 g.h⁻¹ L⁻¹. Apesar de ambos os trabalhos utilizarem RALF, a temperatura adotada pelos autores foi de 30°C, além do TDH de 9,24 h, o que pode ter contribuído com a diferença nos dados obtidos.

5.6 BALANÇO DE MASSA

O balanço de massa foi realizado com base nos dados da DQO total dos metabólitos solúveis presentes no efluente, do glicerol e carboidratos remanescentes e dos sólidos suspensos voláteis, considerando as medições em DQO equivalente (Tabela 28). A diferença entre a DQO total e a DQO medida nos RALFs 1, 2 e 3 estão apresentados nas Tabelas 29, 30 e 31. Pode-se notar que em todas as fases operacionais dos reatores, houve diferença percentual significativa, apresentando diferença negativa, o que pode ser atribuído a metabólitos no efluente que não foram detectados.

Componente	DQO equivalente [g componente. g ⁻¹ DQO]
HPr	1,51
HAc	1,06
EtOH	2,09
HBu	1,82
1,3- PDO	1,68
Glicerol	1,22
Sacarose	1,12
SSV	1,34

Tabela 28- DQO equivalentes utilizadas nos cálculos dos balanços de massa.

Fonte: Bernal (2018).

	RALF 1											
			Metabo	ólitos		Glic _{eflu}	Ceflu	SO 4 ²⁻	SSV	DQO	DQOmedida	Diferença
Fase	HPr	HAc	EtOH	HBu	1,3-PDO	(g.L ⁻¹)	(g.L ⁻¹)	(g.L ⁻¹)	(g.L ⁻¹)	(g.L ⁻¹)	(g.L ⁻¹)	≠ `
1	0.61	0.72	0.00	0.95	2.02	2.95	0.76	0.00	0.87	8.87	10.48	-15.3%
2	0.21	0.76	0.00	0.39	1.67	2.52	0.82	0.00	0.86	7.23	8.87	-18.5%
3	0.34	0.48	0.00	1.45	0.71	2.86	1.36	0.00	0.55	7.74	11.22	-31.0%

Tabela 29- Balanço de massa da fração solúvel em relação à DQO total efluente do RALF 1.

Fonte: Elaboração própria (2021).

	RALF 2											
$\frac{1}{10000000000000000000000000000000000$											DQOmedida	Diferença
Fase	Fase HPr	HAc	EtOH	HBu	1,3-PDO	(g.L ⁻¹)	(g.L ⁻¹)	(g.L ⁻¹)	(g.L ⁻¹)	(g. L ⁻¹)	(g.L ⁻¹)	≠ Î
1	0.35	0.37	0.30	0.78	2.14	2.51	0.40	0.00	0.42	7.28	10.36	-29.7%
2	0.22	0.35	0.00	0.24	1.98	3.74	0.66	0.00	0.43	7.63	10.77	-29.2%
3	0.00	0.28	0.00	0.00	1.93	5.72	0.84	0.00	0.43	9.21	12.27	-25.0%

Tabela 30- Balanco de massa da fração solúvel em relação à DQO total efluente do RALF 2

Fonte: Elaboração própria (2021).

	RALF 3											
			Metabo	ólitos		Gliceflu	Ceflu	SO 4 ²⁻	SSV	DQOΣ	DQOmedida	Diferença
Fase	HPr	HAc	EtOH	HBu	1,3-PDO	(g.L ⁻¹)	(g.L ⁻¹)	(g.L ⁻¹)	(g.L ⁻¹)	(g.L ⁻¹)	(g.L ⁻¹)	≠ ∫
1	0.34	0.74	0.00	0.52	0.28	8.28	0.19	0.00	0.36	10.71	11.34	-5.6%
2	0.00	0.14	0.00	0.00	0.23	6.91	0.33	0.00	0.21	7.83	11.94	-34.5%
3	0.21	0.12	0.00	0.72	0.19	9.03	0.39	0.00	0.17	10.83	12.56	-13.8%

Tabela 31- Balanço de massa da fração solúvel em relação à DQO total efluente do RALF 3.

Fonte: Elaboração própria (2021).

6 CONCLUSÕES

Com suporte nos resultados obtidos durante a operação dos RALFs para a produção de H₂ e 1,3-PDO, a partir da codigestão de vinhaça de cana-de-açúcar e glicerol, conclui-se que:

- Os maiores valores de produção de H₂ registrados no presente trabalho foram obtidos no RALF 1 (75% DQO vinhaça + 25% DQO glicerol), com PVH máxima de 2,92 ± 0,45 L.h⁻¹ L⁻¹ e HY de 0,74 mmol H₂ g DQO_{adicionada}⁻¹. Os valores máximos registrados no RALF 2 (50% DQO vinhaça + 50% DQO glicerol) e RALF 3 (25% DQO vinhaça + 75% DQO glicerol) foram menores. No RALF 2 a PVH máxima foi de 0,6 ± 0,06 L.d⁻¹ L⁻¹ e o HY de 0,16 mmol H₂.g DQO adicionada⁻¹. Já no RALF 3, a PVH máxima foi de 1,6 ± 0,4 L.d⁻¹.L⁻¹ e o HY foi de 0,35 mmol H₂.g DQO adicionada⁻¹. Quanto a produção de 1,3-PDO, os maiores valores foram observados no RALF 2 (50% DQO vinhaça + 50% DQO glicerol), com PV 1,3-PDO de 0,41 ± 0,11 g.L⁻¹ h⁻¹ e 1,3-PDOY de 0,89 ± 0,26 mol 1,3 PDO.mol⁻¹ glicerol_{consumido}. E os menores valores de PV 1,3-PDO (0,01 ± 0,09) e 1,3-PDOY (0,03 ± 0,01) foram observados no RALF 1.
- Os valores máximos relacionados a produção de H₂ foram obtidos nas temperaturas de ٠ 55°C para os RALFs 1 e 2. No RALF 3 a PVH máxima e o HY foram registrados na temperatura de 60°C. É pertinente sugerir que durante a 3° fase (65°C) dos RALFs 1, 2 e 3 ocorreu síntese de células, visto que em maiores temperaturas o crescimento celular líquido é menor e a produção celular necessita compensar essa perda. O mesmo foi observado na 2° fase (60°C) do RALF 2. A elevada temperatura pode ter causado alterações no metabolismo dos microrganismos, implicando prejuízo a produção de H₂. O valor máximo de PV 1,3-PDO foi obtido na temperatura de 55°C, enquanto que o 1,3-PDOY máximo foi obtido na temperatura de 60°C, ambos no RALF 2. Além disso, notou-se que a temperatura de 65 °C não implicou prejuízo na produção de 1,3-PDO, no RALF 2, visto que os valores de PV 1,3-PDO e 1,3-PDOY mantiveram-se estáveis. Contudo, foi observado decréscimo nos valores de PV 1,3-PDO e 1,3-PDOY nos RALFs 1 e 3, durante a 3° fase experimental (65 °C), indicando que, assim como na produção de H₂, o aumento da temperatura exerceu influência negativa na produção de 1,3-PDO.

 Os principais metabólitos obtidos foram: 1,3-PDO, HAc e HBu. Verificou-se um predomínio da rota de formação de 1,3-PDO na maioria das condições avaliadas. A influência das proporções de substratos sobre as produções de álcoois e ácidos variaram de acordo com a temperatura utilizada.

REFERÊNCIAS

- ACAR, C.; DINCER, I. Comparative assessment of hydrogen production methods from renewable and non-renewable sources. International Journal of Hydrogen Energy, v. 39, n.1, p.1-12. Jan. 2014. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2013.10.060.
- ACAR, C.; DINCER, I. Comparative environmental impact valuation of hydrogen production methods from renewable and renewable sources. Causes, impacts and solutions to global warming, p. 493–514. Set. 2014. DOI: 10.1007/978-1-4614-7588-0_28.
- AGLER, M. T.; WRENN, B. A.; ZINDER, S. H.; ANGENENT, L. T. Waste to bioproduct conversion with undefined mixed cultures: the carboxylate platform. Trends in Biotechnology, v. 29, n. 2, p.70–78. Fev. 2011. DOI: 10.1016/j.tibtech.2010.11.006.
- AGUILAR-AGUILAR, F. A.; LONGORIA, A.; JUANTORENA, A. U.; SANTOS, A. S.; PANTOJA, L. A.; SEBASTIAN, P. J. Optimization of Hydrogen Yield from the Anaerobic Digestion of Crude Glycerol and Swine Manure. Catalysts, v. 9, n. 316. Mar. 2019. DOI: 10.3390/catal9040316.
- AKUTSU, Y.; LEE, D.-Y.; LI, Y.-Y.; NOIKE, T. Hydrogen production potentials and fermentative characteristics of various substrates with different heat-pretreated natural microflora. International Journal of Hydrogen Energy, v. 34, p. 5365–5372. Jul. 2009. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2009.04.052.
- AL-ZAREER, M.; DINCER, I.; ROSEN, M. A. Production of hydrogen-rich syngas from novel processes for gasification of petroleum cokes and coals. International Journal of Hydrogen Energy, v. 45, n. 20, p. 11577-11592. Abr. 2020. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2019.10.108.
- ALBANEZ, R.; LOVATO, G.; RATUSZNEI, S. M.; ZAIAT, M.; RODRIGUES, J. A. D. Feasibility of biohydrogen production by co-digestion of vinasse (sugarcane stillage) and molasses in an AnSBBR. Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. 35, p. 27-41. Mar. 2018. DOI: 10.1590/0104-6632.20180351s20150807.
- ALBANEZ, R.; LOVATO, G.; ZAIAT, M.; RATUSZNEI, S. M.; RODRIGUES, J. A.D. Optimization, metabolic pathways modeling and scale-up estimative of an AnSBBR applied to biohydrogen production by co-digestion of vinasse and molasses.

International Journal of Hydrogen Energy, v. 41, n. 45, p. 20473–20484. Dez. 2016. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2016.08.145.

- ÁLVAREZ, J. A.; OTERO, L.; LEMA J. M. A methodology for optimising feed composition for anaerobic co-digestion of agro-industrial wastes. **Bioresource Technology**, v. 101, n.4, p. 1153-1158. Fev. 2010. DOI: <u>10.1016/j.biortech.2009.09.061</u>.
- ALVES, M. E.; LAVORENTI A. Sulfate adsorption and its relationships with properties of representative soils of the São Paulo State, Brazil. Geoderma, v. 118, p. 89–99. Jan. 2004. DOI: 10.1016/S0016-7061(03)00186-1.
- AMON, T.; AMON, B.; KRYVORUCHKO, V.; BODIROZA, V.; PÖTSCH, E.; ZOLLITSCH,
 W. Optimising methane yield from anaerobic digestion of manure: Effects of dairy systems and of glycerine supplementation. International Congress Series, v. 1293, p. 217–220. Jul. 2006. DOI: 10.1016/j.ics.2006.03.007.
- AMORIM, E. L. C.; BARROS, A. R.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z.; SILVA, E. L. Anaerobic fluidized bed reactor with expanded clay as support for hydrogen production through dark fermentation of glucose. International Journal of Hydrogen Energy, v. 34, p. 783–790. Jan. 2009. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2008.11.007.
- AMORIM, E. L. C.; SADER, L. T.; SILVA, E. L. Effect of Substrate Concentration on Dark Fermentation Hydrogen Production Using an Anaerobic Fluidized Bed Reactor.
 Applied Biochemistry Biotechnology, v. 166, p. 1248-1263. Jan. 2012. DOI: 10.1007/s12010-011-9511-9.
- ANA AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS. Manual de conservação e reúso de água na agroindústria sucroenergética. Ministério do Meio Ambiente. Brasília. 2009.
- ANDALOUSSI, A. J. AMINE, P. GERARD, H. P. Effect of glucose on glycerol metabolism by Clostridium butyricum DSM 5431. Journal of Applied Microbiology, v. 84, p. 515– 522. Abr. 1998. DOI: 10.1046/j.1365-2672.1998.00374.x.
- ANDRADE, M. V. F.; SAKAMOTO, I. K.; CORBI, J. J.; SILVA, E. L.; VARESCHE, M. B. A. Effects of hydraulic retention time, co-substrate and nitrogen source on laundry

wastewater anionic surfactant degradation in fluidized bed reactors. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 246–254. Jan. 2017. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.11.001.

- ANJUM, M.; KHALID, A.; QADEER, S.; MIANDAD, R. Synergistic effect of co-digestion to enhance anaerobic degradation of catering waste and orange peel for biogas production. Waste Management & Research, v. 35, n. 9, p. 967–977. Set. 2017. DOI: 10.1177/0734242X17715904.
- ANP Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (Brasil). Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás Natural e biocombustíveis. 2010.
- ANP (Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis). Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis: 2018.
- APHA American Public Health Association. Standard methods for examination of water and wastewater. 22 ed., Washington DC, USA, 2012.
- ASSAD, L. Aproveitamento de resíduos do setor sucroalcooleiro desafia empresas e pesquisadores. Ciência e Cultura, v. 69, n. 4. Dez. 2017. DOI: 10.21800/2317-66602017000400005.
- AZBAR, N.; DOKGOZ, F. T. C.; KESKIN, T. Continuous fermentative hydrogen production from cheese whey wastewater under thermophilic anaerobic conditions. International Journal of Hydrogen Energy, v. 34, p. 7441-7447. Set. 2019. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2009.04.032.
- BALAT, M. Potential importance of hydrogen as a future solution to environmental and transportation problems. International Journal of Hydrogen Energy, v. 33, p. 4013-4029. Ago. 2008. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2008.05.047.
- BARCA, C.; SORIC, A.; RANAVA, D.; GIUDICI-ORTICONI, M.; FERRASSE, J. Anaerobic Biofilm Reactors for Dark Fermentative Hydrogen Production from Wastewater: A Review. Bioresource Technology. v. 185, p. 386-398. Jun 2015. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.02.063.

- BARRETO, L.; MAKIHIRA, A.; RIAHI, K. The hydrogen economy in the 21st century: a sustainable development scenario. International Journal Hydrogen Energy, v. 28, p. 267–284. Mar. 2003. DOI: 10.1016/S0360-3199(02)00074-5.
- BARROS, A. R. Influência de diferentes materiais suporte na produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidizado. 101 p. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.
- BARROS, A. R.; ADORNO, M. A. T; SAKAMOTO, I. K.; MAINTINGUER, S. I.; VARESCHE, M. B. A.; SILVA, E. L. Performance evaluation and phylogenetic characterization of anaerobic fluidized bed reactors using ground tire and pet as support materials for biohydrogen production. Bioresource Technology, v. 102, p. 3840-3847. Fev. 2011. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.12.014.
- BARROS, A. R.; AMORIM, E. L. C. de; REIS, C. M.; SHIDA, G. M.; SILVA, E. L. Biohydrogen production in anaerobic fluidized bed reactors: Effect of support material and hydraulic retention time. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, p. 3379–3388. Abr. 2010. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2010.01.108.
- BARROS, A. R.; SILVA, E. L. Hydrogen and ethanol production in anaerobic fluidized bed reactors: Performance evaluation for three support materials under different operating conditions. Biochemical Engineering Journal, v. 61, p. 59–65. Fev. 2012. DOI: 10.1016/j.bej.2011.12.002.
- BARROS, R. P. Diversidade de fungos em um vertissolo com adição de vinhaça na cultura de cana de açúcar (Saccharum officinarum 1.). Revista Uniabeu, v.5, n.10, p.181-196. 2012.
- BARTELS, J. R.; PATE, M. B.; OLSON, N. K. An economic survey of hydrogen production from conventional and alternative energy sources. International Journal of Hydrogen Energy, v. 35, p. 8371–8384. Ago. 2010. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2010.04.035.
- BASTIDAS-OYANEDEL, J.-R.; MOHD-ZAKI, Z.; ZENG, R. J; BERNET, N.; PRATT, S.; STEYER, J.; BATSTONE, D. J. Gas controlled hydrogen fermentation. Bioresource Technology, v. 110, p. 503-509. Abr. 2012. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.01.122.

- BERNAL, A. P. Bioprodução de hidrogênio e metabólitos solúveis em reatores anaeróbios de leito granular expandido mesofílicos e cultura mista utilizando vinhaça de cana-deaçúcar como substrato orgânico. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 151 p. 2018.
- BIEBL, H.; MENZEL, K.; ZENG, A. P.; DECKWER, W. D. Microbial production of 1,3propanediol. Applied microbiology and biotechnology, v. 52, p. 289–297. Set. 1999. DOI: 10.1007/s002530051523.
- BONDIOLI, P.; BELLA, L. D. An alternative spectrophotometric method for the determination of free glycerol in biodiesel. European Journal of Lipid Science and Technology, v. 107, p. 153–157. Mar. 2005. DOI: 10.1002/ejlt.200401054.
- BRAGA, A. F. M.; FERRAZ, J.; ANTÔNIO, D.; ZAIAT, M. Thermophilic biohydrogen production using a UASB reactor: performance during long-term operation. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v. 91, p. 967-976. Fev. 2016. DOI: 10.1002/jctb.4665.
- BRASIL. Lei no 11.097, de 13 de janeiro de 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil], Brasília, DF, 14 jan. 2005. Seção I, p. 8.
- BRASIL. Lei no 13.576, de 26 de dezembro de 2017. Dispõe sobre a Política Nacional de Biocombustíveis (RenovaBio) e dá outras providências. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil], Brasília, DF, 27 dez. 2017. Seção I, p. 4-5.
- BRAZ, L. M.; AGUIAR, A. B. S.; RODRIGUEZ, R. P.; SANCINETTI, G. P. Potential for anaerobic treatment of wastewater from pet bottle washing in a fluidized bed reactor. Journal of Water Process Engineering, v. 31, p. 100817. Out. 2019. DOI: 10.1016/j.jwpe.2019.100817.
- CABROL, L.; MARONE, A.; TAPIA-VENEGAS, E.; STEYER, J.-P.; RUIZ-FILIPPI, G.; TRABLY, E. Microbial ecology of fermentative hydrogen producing bioprocesses: useful insights for driving the ecosystem function. FEMS Microbiology Reviews, v. 41, p. 158–181. Fev. 2017. DOI: 10.1093/femsre/fuw043.

- CAI, G.; JIN, B.; MONIS, P.; SAINT, C. Metabolic flux network and analysis of fermentative hydrogen production. Biotechnology Advances, v. 29, n. 4, p. 375–387. Ago. 2011. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.02.001.
- CAO, X.; ZHAO, Y. The influence of sodium on biohydrogen production from food waste by anaerobic fermentation. Journal of Material Cycles and Waste Management, v. 11, p. 244–250. Set. 2009. DOI: 10.1007/s10163-009-0237-5.
- CHATZIFRAGKOU, A.; PAPANIKOLAOU, S. Effect of impurities in biodiesel derived waste glycerol on the performance and feasibility of biotechnological processes. Applied microbiology and biotechnology, v. 95, p. 13–27. Jul. 2012. DOI: 10.1007/s00253-012-4111-3.
- CHEN, H.; PENG, B.; WANG, A.; WANG, J. Biodiesel production by the transesterification of cottonseed oil by solid acid catalyst. Frontiers of Chemical Engineering in China, v. 1, p. 11-15. Fev. 2007. DOI: 10.1007/s11705-007-0003-y.
- CHENG, K. K.; ZHANG, J. A.; LIU, D. H.; SUN, Y.; LIU, H. J.; YANG, M. D.; MING, J. X. Pilot-scale production of 1,3-propanediol using Klebsiella pneumoniae. Process Biochemistry, v. 42, p. 740–744. Abr. 2007. DOI: 10.1016/j.procbio.2007.01.001.
- CHERNICHARO, C. A. L. Reatores Anaeróbios. 2. ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental UFMG, 1997.
- CHOI, W. J.; HARTONO, M. R.; CHAN, W. H.; YEO, S. S. Ethanol production from biodiesel-derived crude glycerol by newly isolated Kluyvera cryocrescens. Applied microbiology and biotechnology, v. 89, n. 4, p. 1255–1264. Fev. 2011. DOI: 10.1007/s00253-010-3076-3.
- CHOOKAEW, T, O-THONG S, PRASERTSAN, P. Fermentative production of hydrogen and soluble metabolites from crude glycerol of biodiesel plant by the newly isolated thermotolerant Klebsiella pneumoniae TR17. International Journal of Hydrogen Energy, v. 37, p. 13314–13322. Set. 2012. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2012.06.022.

- CHOOKAEW, T.; SOMPONG, O.-T.; PRASERTSAN, P. Biohydrogen production from crude glycerol by immobilized by Klebsiella sp. TR17 in a UASB reactor and bacterial quantification under non-sterile conditions. International Journal of Hydrogen Energy, v. 39, p. 9580–9587. Jun. 2014. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2014.04.083.
- CHRISTOFOLETTI, C. A.; ESCHER, J. P.; CORREIA, E. J.; MARINHO, J. F. U.; FONTANETTI, C. S. Sugarcane Vinasse: Environmental Implications of its use. Waste Management, v. 33, p. 2752-2761, Dez. 2013. DOI: 10.1016/j.wasman.2013.09.005
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). Acompanhamento da Safra Brasileira – Cana-de-açúcar, safra 2019/2020. Terceiro levantamento. Dezembro/2019. Disponível em: https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/3202-producao-de-etanoldeve-chegar-a-35-5-bilhoes-de-litros-e-consumira-65-da-cana-moida Acesso em: 17 jan. 2020.
- CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da Safra Brasileira Cana-de-açúcar Safra 2008/ Terceiro levantamento, dezembro/2008. Brasília. Disponível em: Acesso em 18 de dez. 2008.
- DABROCK, B.; BAHL, H.; GOTTSCHALK, G. Parameters affecting solvent production by Clostridium pasteurianum. Applied and Environmental Microbiology, v. 58, p. 1233– 1239, 1992. DOI: 10.1128/AEM.58.4.1233-1239.1992.
- DAS, D.; VEZIROGLU, T. N. Advances in Biological Hydrogen Production Processes. International Journal of Hydrogen Energy. v. 33, p. 6046-6057. Nov. 2008. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2008.07.098.
- 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, p. 225-231, 2005. DOI: 10.1016/j.apcata.2004.11.033.
- DAUN, L. G.; MESQUITA, R. A. C.; KIMURA, R. K.; GONÇALVES, A. C.; RAMOS, R. A. V. Alternativa para o uso do glicerol obtido da produção de Biodiesel em biodigestores anaeróbios como otimizador da produção de biogás. In: The Latinamerican Congress on Electricity Generation and Transmission Clagtee, 8, 2009, Ubatuba, Brazil. Anais. Ubatuba, 2009, p.1-5.

- DEL NERY, V. Utilização de lodo anaeróbio imobilizado em gel no estudo da partida de reatores de fluxo ascendente com manta de lodo. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos, Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1987.
- DIAS, M. O. S.; MACIEL, R.; MANTELATTO, P. E.; CAVALETT, O.; ROSSELL, C. E. V.;
 BONOMI, A.; LEAL, M. R. L.V. Sugarcane processing for ethanol and sugar in Brazil.
 Environmental Development, v. 15, p. 35–51. Jul. 2015. DOI: 10.1016/j.envdev.2015.03.004.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry, v. 28, p. 350-356. Mar. 1956. DOI: 10.1021/ac60111a017.
- DUPONT V. Steam reforming of sunflower oil for hydrogen gas production/oxidación catalítica del aceite de girasol en la producción del gas hidrógeno/reformage à la vapeur del'huile de tournesol dans la production de gaz hydrogène. Helia, v. 30, p. 103–32. Mai. 2007. DOI: 10.2298/hel0746103d.
- DUTTA, S. A review on production, storage of hydrogen and its utilization as an energy resource. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, v. 20, n. 4, p. 1148–1156. Jul. 2014. DOI: 10.1016/j.jiec.2013.07.037.
- DYNIA J. F.; CAMARGO O. A. Adsorption and movement sulfate in cerrado Oxisol subjected to liming and phosphorus. **Rev Bras Cienc Solo**. v. 19, p. 249–253. 1995.
- EDWARDS, V. H. The influence of high substrate concentrations on microbial kinetics. Biotechnology and Bioengineering, v. 12, p. 679–712. Set. 1970. DOI: 10.1002/bit.260120504.
- EIA Monthly energy review, December 2015. DOE/EIA-0035(2015/12). Washington. 2015. DC, US Energy Information Administration. Disponível em: http://www.eia.gov/totalenergy/data/monthly/pdf/mer.pdf>. Acesso: 11 jan. 2016.

- ELBESHBISHY, E.; DHAR, B. R.; NAKHLA, G.; LEE, H.-S. A critical review on inhibition of dark biohydrogen fermentation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 79, p.656-668. Nov. 2017. DOI: 10.1016/j.rser.2017.05.075.
- ELIA NETO, A., Biogás a partir de Vinhaça. 2a. Conferência Biogás e Bioeletricidade. São Paulo. 2014.
- EPE (EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA); 2014. Energy Demand in 2050. Energy Research Company. Rio de Janeiro. Technical note DEA 13/14.
- ETENE (Escritório Técnico de Estudos Econômicos do Nordeste). PRODUÇÃO E USO DE BIOCOMBUSTÍVEIS NO BRASIL MARIA DE FATIMA VIDAL Engenheira Agrônoma. Mestre em Economia Rural. ETENE/BNB <u>fatimavidal@bnb.gov.br</u>. n. 79, maio. 2019.
- ESPAÑA-GAMBOA, E.; MIJANGOS-CORTÉS, J.; HERNÁNDEZ-ZÁRATE, G.; MALDONADO, J. A. D.; ALZATE-GAVIRIA, L. Methane production by treating vinasses from hydrous ethanol using a modified UASB reactor. Biotechnology for Biofuels, v.5, n. 82. Nov. 2012. DOI: 10.1186/1754-6834-5-82.
- FARINA, E. M. M. Q. Competitividade Do Sistema agroindustrial Da Cana-de-açúcar. v.5. São Paulo: IPEA, 1998.
- FERNANDES, B. S.; PEIXOTO, G.; ALBRECHT, F. R.; AGUILA, N. K. S.; ZAIAT, M. Potential to produce biohydrogen from various wastewaters. Energy for Sustainable Development, v. 14, n. 2, p. 143–148. Jun. 2010. DOI: 10.1016/j.esd.2010.03.004.
- FERRAZ JR., A. D. N. Digestão anaeróbia da vinhaça da cana de açúcar em reator acidogênico de leito fixo seguido de reator metanogênico de manta de lodo. Tese (doutorado). Universidade de São Paulo. Escola de Engenharia de São Carlos, 2013.
- FERRAZ JR., A. D. N.; KOYAMA, M. H.; ARAÚJO JR., M. M.; ZAIAT, M. Thermophilic anaerobic digestion of raw sugarcane vinasse. **Renewable Energy**, v. 89, p. 245–252. 2016. DOI: 10.1016/j.renene.2015.11.064.
- FERRAZ JR. A. D. N., WENZEL J., ETCHEBEHERE C., ZAIAT, M. Effect of organic loading rate on hydrogen production from sugarcane vinasse in thermophilic acidogenic

packed bed reactors. International Journal of Hydrogen Energy, v. 39, p. 16852–16862. Out. 2014b. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2014.08.017.

- FERREIRA, J. S. Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidizado a partir de glicerol bruto sob condições termofílicas. 107 p. Dissertação (Mestrado). Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2014.
- FERREIRA, L. F. R.; AGUIAR, M. M.; MESSIAS, T. G.; POMPEU, G. B.; LOPEZ, A. M. Q.; SILVA, D. P., MONTEIRO, R. T. Evaluation of sugar-cane vinasse treated with Pleurotus sajor-caju utilizing aquatic organisms as toxicological indicators. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 74, p. 132–137. Set. 2011. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2010.08.042.
- FERREIRA, T. B.; REGO, G. C.; RAMOS, L. R.; SOARES, L. A.; SAKAMOTO, I. K.; DE OLIVEIRA, L. L.; SILVA, E. L. Selection of metabolic pathways for continuous hydrogen production under thermophilic and mesophilic temperature conditions in anaerobic fluidized bed reactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 43, p. 18908–18917. Out. 2018. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2018.08.177.
- FONTES LIMA, D. M.; MOREIRA, W. K.; ZAIAT, M. Comparison of the use of sucrose and glucose as a substrate for hydrogen production in an upflow anaerobic fixed-bed reactor.
 International Journal of Hydrogen Energy, v. 38, n. 35, p. 15074–15083. Nov. 2013. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2013.09.003.
- FORESTI, E.; FLORÊNCIO, L.; VAN HAANDEL, A.; ZAIAT, M.; CAVALCANTI, P. F. F. Fundamentos do tratamento anaeróbio. Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbio e disposição controlada no solo. Rio de Janeiro: **PROSAB**. Cap. 2, p. 29 – 52. 1999.
- FUESS, L. T.; GARCIA, M. L. Implications of stillage land disposal: a critical review on the impacts of fertigation. Journal of Environmental Management, v. 145, p. 210-229. 2014. DOI: 10.1016/j.jenvman.2014.07.003.
- FUESS, L. T.; KIYUNA, L. S. M.; GARCIA, M. L.; ZAIAT, M. Operational strategies for logterm biohydrogen production from sugarcane stillage in a continuous acidogenic

packed-bed reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, p. 8132-8145. Dez. 2016. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2015.10.143.

- FUESS, L.T.; ZAIAT, M.; NASCIMENTO, C. A. O. Novel insights on the versatility of biohydrogen production from sugarcane vinasse via thermophilic dark fermentation: Impacts of pH-driven operating strategies on acidogenesis metabolite profiles.
 Bioresource Technology, v. 286, p. 1-9. Ago. 2019. DOI: 10.1016/j.biortech.2019.121379.
- GADOW, S. I.; JIANG, H.; HOJO, T.; LI, Y.-Y. Cellulosic hydrogen production and microbial community characterization in hyper-thermophilic continuous bioreactor. International Journal Of Hydrogen Energy, v. 38, n. 18, p.7259-7267. jun. 2013. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2013.04.041.
- GARCÍA, A. B.; CAMMAROTA, M. C. Biohydrogen production from pretreated sludge and synthetic and real biodiesel wastewater by dark fermentation. International Journal of Energy Research, p. 1-11. Fev. 2019. DOI: 10.1002/er.4376.
- GARCÍA-DEPRAECT, O.; RENE, E. R.; DIAZ-CRUCES, V. F.; LEÓN-BECERRIL, E. Effect of process parameters on enhanced biohydrogen production from tequila vinasse via the lactate-acetate pathway. **Bioresource Technology**, Fev. 2018. DOI: 10.1016/j.biortech.2018.11.056.
- GARCÍA-DEPRAECT, O.; RENE, E. R.; GÓMEZ-ROMERO, J.; LÓPEZ-LÓPEZ, A.; LEÓN-BECERRIL, E. Enhanced biohydrogen production from the dark cofermentation of tequila vinasse and nixtamalization wastewater: Novel insights into ecological regulation by pH. Fuel, v. 253, p. 159–166. Out. 2019. DOI: 10.1016/j.fuel.2019.04.147.
- GARCÍA-GEN, S.; RODRÍGUEZ, J.; LEMA, J. Optimisation of substrate blends in anaerobic codigestion using adaptive linear programming. Bioresource Technology, v. 173, p. 159-167. Dez. 2014. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.09.089.
- GARCÍA-SÁNCHEZ, R.; RAMOS-IBARRA, R.; GUATEMALA-MORALES, G.; ARRIOLA-GUEVARA, E.; TORIZ-GONZÁLEZ, G.; CORONA-GONZÁLEZ, R. I. Photofermentation of tequila vinasses by Rhodopseudomonas pseudopalustris to

produce hydrogen. **International Journal of Hydrogen Energy**. v. 43, n. 33, p. 15857-15869. Ago. 2018. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2018.07.015.

- GONZALEZ-PAJUELO, M.; ANDRADE, J. C.; VASCONCELOS, I. Production of 1,3propanediol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 using a synthetic medium and raw glycerol. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, v. 31, p. 442–446, Out. 2004. DOI: 10.1007/s10295-004-0168-z.
- GONÇALVES, R. F.; CHERNICHARO, C. A. L.; ANDRADE NETO, C. O.; SOBRINHO, P. A.; KATO, M. T.; COSTA, R. H. R.; AISSE, M. M. e ZAIAT, M. Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios. Capítulo 4- Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios por reatores com biofilmes. PROSAB 2, p.171-278. 2001.
- GRANATO, E. F. Geração de Energia Através da Biodigestão anaeróbia da vinhaça. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia da Unesp, Universidade Estadual de São Paulo, Bauru, 2003.
- GUO, W.Q.; TRABLY, E.; LATRILLE, E.; CARRE`RE, H.; STEYER, J, P. Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. International Journal of Hydrogen Energy, v. 35, p. 10660-10673, Out. 2010. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2010.03.008.
- HAGOS, K.; ZONG, J.; DONGXUE, L.; LIU, C.; LU, X. Anaerobic co-digestion process for biogas production: Progress, challenges and perspectives. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v.76, p.1485-1496. Set. 2017. DOI: 10.1016/j.rser.2016.11.184.
- HALLENBECK, P. C., GHOSH, D. Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward. Trends in Biotechnology, v.27, n. 5 p.287–297. Mai. 2009. DOI: 10.1016/j.tibtech.2009.02.004.
- HARPER, S. R.; POHLAND, F. G. Recent developments in hydrogen management during anaerobic biological wastewater treatment. Biotechnology and Bioengineering, v. 28, p. 585 – 602. Abr. 1986. DOI: 10.1002/bit.260280416.

- HAWKES, F. R.; HUSSY, I.; KYAZZE, G.; DINSDALE, R.; HAWKES, D. L. Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: principles and progress. International Journal of Hydrogen Energy, v. 32, p. 172–184. Fev. 2007. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2006.08.014.
- HEIJNE, A. T.; GEPPERT, F.; SLEUTELS, T. H. J. A.; BATLLE-VILANOVA, P.; LIU, D.;
 PUIG, S. Mixed Culture Biocathodes for Production of Hydrogen, Methane, and
 Carboxylates. Bioelectrosynthesis, p. 203-229. Out. 2017.
 http://dx.doi.org/10.1007/10_2017_15.
- HOARAU J.; CARO Y.; GRONDIN I.; PETIT T. Sugarcane vinasse processing: Toward a status shift from waste to valuable resource. A review. Journal of Water Process Engineering, v. 24, p. 11–25. Ago. 2018. DOI: 10.1016/j.jwpe.2018.05.003.
- HWANG, M. H.; JANG, N. J.; HYUN, S. H.; KIM, I. S. Anaerobic bio-hydrogen production from ethanol fermentation: the role of pH. Journal of Biotechnology, v. 111, p. 297– 309. Ago. 2004. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2004.04.024.
- INTANOO P.; RANGSUNVIGIT P.; NAMPROHM W.; THAMPRAJAMCHIT B.; CHAVADEJ J.; CHAVADEJ S. Hydrogen production from alcohol wastewater by an anaerobic sequencing batch reactor under thermophilic operation: nitrogen and phosphorous uptakes and transformation. International Journal of Hydrogen Energy, v. 37, p. 11104-11112. Ago. 2012. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2012.04.129.
- ITO, T.; NAKASHIMADA, Y.; SENBA, K.; MATSUI, T.; NISHIO, N. Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 100, p. 260–265. Set. 2005. DOI: 10.1263/jbb.100.260.
- JANKE, L.; LEITE, A. F.; BATISTA, K.; SILVA, W.; NIKOLAUSZ, M.; NELLES, M.; STINNER, W. Enhancing biogas production from vinasse in sugarcane biorefineries: effects of urea and trace elements supplementation on process performance and stability.
 Bioresource Technology, v. 217, p. 10–20. Out. 2016. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.01.110.
- KADAR, Z.; DE VRIJEK, T.; VAN NOORDEN, G. E.; BUDDE, M. A.W.; SZENGYEL, Z.; RECZEY, K.; CLAASSEN, P. A. M. Yields from glucose, xylose, and paper sludge

hydrolysate during hydrogen production by the extreme thermophile Caldicellulosiruptor saccharolyticus. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 114, p. 497–508. Mar. 2004. DOI: 10.1385/ABAB:114:1-3:497.

- KALAMARAS C. M.; EFSTATHIOU A. M. Hydrogen production technologies: current state and future developments. Conference Papers in Energy, 2013. DOI: 10.1155/2013/690627.
- KARGI, F.; EREN, N. S.; OZMIHCI, S. Hydrogen gas production from cheese whey powder (CWP) solution by thermophilic dark fermentation. International Journal of Hydrogen Energy. v. 37, p. 2260–2266. Jun. 2012. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2011.11.018.
- KHANAL, S. K.; CHEN, W. S.; SUNG, S. Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products. International Journal of Hydrogen Energy, v. 29, p. 1123-1131, Set. 2004. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2003.11.002.
- KIM, I. S.; HWANG, M. H.; JANG, N. J.; HYUN, S. H.; LEE, S.T. Effect of low pH on the activity of hydrogen utilizing methanogen in bio-hydrogen process. International Journal of Hydrogen Energy, v. 29, p. 1133-1140. Set. 2003. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2003.08.017.
- KIM, M.; AHN, Y. H.; SPEECE, R. E. Comparative process stability and efficiency of anaerobic digestion; mesophilic vs. thermophilic. Water Research. v. 36, n. 17, p. 4369–4385. Out. 2002. DOI: 10.1016/S0043-1354(02)00147-1.
- KIM, M.; LEE, D.; KIM, D. Continuous hydrogen production from tofu processing waste using anaerobic mixed microflora under thermophilic conditions. International Journal of Hydrogen Energy. v. 36, p. 8712 8718. Jul. 2011. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2010.06.040.
- KIM, S. H.; HAN, S. K; SHIN, H. S. sis of the microbial community in a continuous fermenter.
 Process Biochemistry, v. 41, p. 199–207. Jan. 2006. DOI: 10.1016/j.procbio.2005.06.013.

- KIRTAY, E. Recent advances in production of hydrogen from biomass. Energy Conversion and Management, v. 52, n. 4, p. 1778-1789. Abr. 2011. DOI: 10.1016/j.enconman.2010.11.010.
- KIVISTO, A.; SANTALA, V.; KARP, M. Non-sterile process for biohydrogen and 1,3propanediol production from raw glycerol. International Journal of Hydrogen Energy, v. 38, p. 11749-11755. Set. 2013. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2013.06.119.
- KNOTHE, G.; GERPEN, J. V. Produção de biodiesel. In: KNOTHE, G.; GERPEN, J. V.; KRAHL, J.; RAMOS, L. P. Manual de Biodisel. São Paulo, 2006. p. 29-54.
- KOSKINEN, P. E. P.; KAKSONEN, A. H.; PUHAKKA, L. A. The relationship between instability of H2 production and compositions of bacterial communities within a dark fermentation fluidized bed bioreactor. Biotechnology Bioengineering, v. 97, p. 742-758. Jul. 2007. DOI: 10.1002/bit.21299.
- KOTSOPOULOS, T.A.; ZENG, I. A.; ANGELIDAKI, I. Biohydrogen production in granular up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors with mixed cultures under hyperthermophilic temperature (70°C). Biotechnology and Bioengineering, v. 94, p. 296-302, Jun. 2006. DOI: 10.1002/bit.20844.
- KOYAMA, M. H.; ARAÚJO J., MOACIR M.; ZAIAT, M.; FERRAZ J., ANTÔNIO D. N.
 Kinetics of thermophilic acidogenesis of typical Brazilian sugarcane vinasse. Energy, v. 116, p. 1097-1103. Dez. 2016. DOI: 10.1016/j.energy.2016.10.043.
- KRAUSE P. C. W.; OLEG S.; SCOTT D.; PEKAREK S. Analysis of electric machinery and drive systems. Hoboken, NJ, United States: John Wiley & Sons. 2013.
- KUMAR, N., DAS, D. Enhancement of hydrogen production by Enterobactercloacae IITBT
 08. Process Biochemistry, v. 35, p. 589–593. Jan. 2000. DOI: 10.1016/S0032-9592(99)00109-0.
- KUMAR, N.; GHOSH, A.; DAS, D. Redirection of biochemical pathways for the enhancement of H2 production by Enterobacter cloacae. Biotechnology Letters, v. 23, p. 537–541. Abr. 2001. DOI: 10.1023/A:1010334803961.
- KURAHASHI, K.; HISADA, K.; KASHIWAGI, M.; YOSHIHARA, S.; NOMURA, T.; TOKUMOTO, H. Analysis of the Continuous Bioconversion of Glycerol by Promotion

of Highly Glycerol-Resistant Glycerol-Degrading Bacteria. **Waste and Biomass Valorization**, v. 10, p. 3321-3330. Nov. 2018. DOI: 10.1007/s12649-018-0344-4.

- LAMAISON, F. C.; ANDRADE, P. A. M.; BIGATON, A. D.; ANDREOTE, F. D.; ANTÔNIO, R. V.; REGINATTO, V. Long-term effect of acid and heat pretreatment of sludge from a sugarcane vinasse treatment plant on the microbial community and on thermophilic biohydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, p. 14124– 14133. Nov. 2015. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2015.08.096.
- LATTIN W.; UTGIKAR V. Transition to hydrogen economy in the United States: a 2006 status report. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 32, p. 3230-3237. Out. 2007. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2007.02.004.
- LAZARO, C. Z.; PERNA, V.; ETCHEBEHERE, C.; VARESCHE, M. B. A. Sugarcane vinasse as substrate for fermentative hydrogen production: The effects of temperature and substrate concentration. International Journal of Hydrogen Energy, v.39, p.6407-6418, Abr. 2014. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2014.02.058
- LAZARO C. Z.; VARESCHE M. B. A.; SILVA E. L. Sequential fermentative and phototrophic system for hydrogen production: an approach for Brazilian alcohol distillery wastewater. International Journal of Hydrogen Energy, v. 40, p. 9642–9655. Ago. 2015. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2015.06.003.
- LEE, K. S.; LIN, P. J.; CHANG, J. S. Temperature effects on biohydrogen production in a granular sludge be induced by activated carbon carriers. International Journal of Hydrogen Energy, v. 31, p. 465–472. Mar. 2006. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2005.04.024.
- LEONETI, B. A.; LEONETI A. V.; OLIVEIRA W. V. S. Glycerol as a by-product of biodiesel production in Brazil: Alternatives for the use. International Journal of Hydrogen Energy, v. 45, p. 138–145. Set. 2012. DOI: 10.1016/j.renene.2012.02.032.
- LETTINGA, G.; REBAC, S.; PARSHINA, S.; NOZHEVNIKOVA, A.; VAN LIER, J. B.; STAMS, A. J. M. High-rate anerobic treatment of wastewater at low temperatures.

Applied and Environmental Microbiology, v. 65, p. 1696–1702. Abr. 1999. DOI: 10.1128/AEM.65.4.1696-1702.1999.

- LETTINGA, G; VELSEN, A. F. M. VAN; HOBMA, S. W.; ZEEUW, W. DE; KLAPWIJK, A. Use of the Upflow Sludge Blanket (USB) Reactor concept for biological wastewater treatment, especially for anaerobic treatment. Biotechnology and bioengineering, v. 22, p. 699-734. Abr. 1980. DOI: 10.1002/bit.260220402.
- LETTINGA, G.; REBAC, S.; ZEEMAN, G. Challenge of Psychrophilic Anaerobic Wastewater Treatment, **Trends in Biotechnology**, v. 19(9), p. 363-370. Set. 2001. DOI: 10.1016/S0167-7799(01)01701-2.
- LEVIN, B.; PITT, L.; LOVE, M. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. International Journal of Hydrogen Energy, v. 29, p. 173–185. Fev. 2004. DOI: 10.1016/S0360-3199(03)00094-6.
- LI C.; FANG, H. Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, v. 37, p. 1–39. Jan. 2007. DOI: 10.1080/10643380600729071.
- LI, J.; ZHENG, G.; HE, J.; CHANG, S.; QIN, Z. Hydrogen-producing capability of anaerobic activated sludge in three types of fermentations in a continuous stirred-tank reactor.
 Biotechnology Advances, v. 27, p. 573–577. Out. 2009. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2009.04.007.
- LI, Y.; LIU, Y.; CHU, C.; CHANG, P.; HSU, C.; LIN, P.; WU, S. Techno-economic evaluation of biohydrogen production from wastewater and agricultural waste. International Journal of Hydrogen Energy, v. 37, n. 20, p. 15704-15710. Out. 2012. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2012.05.043.
- LIDE, D. R., editor-in-chief; Handbook of Chemistry and Physics, 87th ed., Taylor and Francis Group: Boca Raton, 2006.
- LIJÓ, L.; GONZÁLEZ-GARCÍA, S.; BACENETTI, J.; FIALA, M.; FEIJOO, G.; LEMA, J.; MOREIRA, M. Life Cycle Assessment of electricity production in Italy from anaerobic co-digestion of pig slurry and energy crops. **Renewable Energy**, v. 68, p. 625-635. Ago. 2014. DOI: 10.1016/j.renene.2014.03.005.

- LIN, C. N.; WU, S.; CHANG, J.; CHANG, J. S. Biohydrogen production in a three-phase fluidized bed bioreactor using sewage sludge immobilized by ethylene-vinyl acetate copolymer. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 3298-3301, Jul. 2009. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.02.027.
- LIN, C. N.; WU, S. Y.; CHANG, J. S. Fermentative hydrogen production with a draft tube fluidized bed reactor containing silicon-gel-immobilized anaerobic sludge. International Journal of Hydrogen Energy, v. 31, p. 2200-2210. Dez. 2006. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2006.05.012.
- LIU, Y. Y. G.; ZHANG, R. B.; ZHANG, F.; ZHANG, J. Z. Glycerol/glucose co-fermentation: One more proficient process to produce propionic acid by Propionibacterium acidipropionic, **Current Microbiology**, v. 62. p. 152–158. Jun. 2011. DOI: 10.1007/s00284-010-9683-5.
- LÓPEZ, J. A. S.; SANTOS, M. L. A. M.; PÉREZ, A. F. C.; MARTÍN, A. M. Anaerobic digestion of glycerol derived from biodiesel manufacturing. Bioresource Technology, v. 100, n. 23, p. 5609–5615. Dez. 2009. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.06.017.
- LOVATO, G.; ALBANEZ, R.; STRACIERI, L.; ZAIAT, M.; RATUSZNEI, S. M.; RODRIGUES, J. A. D. Design study of an AnSBBR for hydrogen production by codigestion of whey with glycerin: Interaction effects of organic load, cycle time and feed strategy. International Journal of Hydrogen Energy, v. 42, n. 15, p. 9567–9576. Abr. 2017. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2017.03.125.
- LOVATO, G.; ALBANEZ, R.; TRIVELONI, M.; RATUSZNEI, S. M.; RODRIGUES, J. A.
 D. Methane Production by Co-Digesting Vinasse and Whey in an AnSBBR: Effect of Mixture Ratio and Feed Strategy. Applied biochemistry and biotechnology, v. 187, p. 28-46, Jun. 2018. DOI: 10.1007/s12010-018-2802-7.
- LOVATO, G.; BATISTA, L. P. P.; PREITE, M. B.; YAMASHIRO, J. N.; BECKER, A. L. S.; VIDAL, M. F. G.; RODRIGUES, J. A. D. Viability of Using Glycerin as a Co-substrate in Anaerobic Digestion of Sugarcane Stillage (Vinasse): Effect of Diversified

Operational Strategies. Applied Biochemistry and Biotechnology, Jan. 2019. DOI: 10.1007/s12010-019-02950-1.

- LO, Y.-C.; CHEN, X.-J.; HUANG C.-Y. Dark fermentative hydrogen production with crude glycerol from biodiesel industry using indigenous hydrogen-producing bacteria.
 International Journal of Hydrogen Energy, v. 38, p. 15815–15822. Nov. 2013. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2013.05.083.
- LU, J. Q.; GAVALA, H. N.; SKIADAS, I. V.; MLADENOVSKA, Z.; AHRING, B. K. Improving anaerobic sewage sludge digestion by implementation of a hyperthermophilic prehydrolysis step. Journal of Environmental Management, v. 88, p. 881–889. Set. 2008. DOI: 10.1016/j.jenvman.2007.04.020.
- LUDOVICE, M. T. F. Estudo do efeito da vinhaça infiltrada em canal condutor de terra sobre o lençol freático. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) - Faculdade de Engenharia Civil, Universidade de Campinas, Campinas, 1997.
- MA, F.; HANNA, M. A. Biodiesel production: a review. **Bioresource Technology**, v. 70, p. 1-15, Out. 1999. DOI: 10.1016/S0960-8524(99)00025-5.
- MA, J.; VAN WAMBEKE, M.; CARBALLA, M.; VERSTRAETE, W. Improvement of the anaerobic treatment of potato processing wastewater in a UASB reactor by codigestion with glycerol. Biotechnology Letters, v. 30, p. 861-867. Mai. 2008. DOI: 10.1007/s10529-007-9617-x.
- MACEDO, T. Z.; DELFORNO, T. P.; BRAGA, J. K.; OKADA, D. Y.; SILVA, E. L.; VARESCHE, M. B. A. Robustness and Microbial Diversity of a Fluidized Bed Reactor Employed for the Removal and Degradation of an Anionic Surfactant from Laundry Wastewater. Journal of Environmental Engineering, V. 143(9), n. 9, p. 1-13. Set. 2017. DOI: 10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0001240.
- MADRID, L.; DÍAZ-BARRIENTOS, E. Release of metals from homogenous soil columns by wastewater from an agricultural industry. Environmental Pollution, v. 101, p. 43–48. 1998. DOI: 10.1016/S0269-7491(98)00032-3.
- MAHIMAIRAJA, N. S.; BOLAN. The Regional Institute Problems and Prospects of Agricultural Use of Distillery Spent wash in India, (2008).

- MAINTINGUER, S.I.; FERNANDES, B. S.; DUARTE, I. C. S.; SAAVEDRA, N. K.; ADORNO, M. A. T.; VARESCHE, M. B. Fermentative hydrogen production by microbial consortium. International Journal of Hydrogen Energy, v. 33, n. 16, p. 4309-4317, Ago. 2008. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2008.06.053.
- MARU, B. T.; BIELEN, A. A. M.; CONSTANTÍ, M.; MEDINA, F.; KENGEN, S. W. M. Glycerol fermentation to hydrogen by Thermotoga maritima: Proposed pathway and bioenergetic considerations. International Journal of Hydrogen Energy, v. 38, p. 5563–5572. 2013. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2013.02.130.
- MATA-ALVAREZ, J.; DOSTA, J.; ROMERO-GÜIZA, M. S.; FONOLL, X.; PECES, M.; ASTALS, S. A critical review on anaerobic codigestion achievements between 2010 and 2013. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 36, p. 412-427, Ago. 2014. DOI: 10.1016/j.rser.2014.04.039.
- MATSUMOTO M.; NISHIMURA Y. Hydrogen production by fermentation using acetic acid and lactic acid. **Journal of Bioscience Bioengineering**, v. 103, p. 236–241. Mar. 2007. DOI: 10.1263/jbb.103.236.
- MCCARTY, P. L. Anaerobic waste treatment fundamentals: part one: Chemistry and Microbiology. **Public Works**. v. 95, p. 107-112, 1964a.
- MEIER T. R. W.; CREMONEZ P. A.; MATTJIE A. C.; PARISOTTO E. I. B.; DIETER J.; TELEKEN J. G. Produção de biogás a partir da codigestão de água residuária de suinocultura, vinhaça e glicerol bruto em reator com alimentação semicontínua. Exacta, v. 9, n. 2, p. 111-122. 2016. DOI: 10.18674/exacta.v9i2.1934.
- MENDES, A. A.; CASTRO, H. F.; PEREIRA, E. B.; JÚNIOR, A. F. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. Química Nova, v. 28, n. 2, p. 296–305. Abr. 2005. DOI: 10.1590/S0100-40422005000200022.
- MENEZES, C. A.; SILVA, E. L. Hydrogen production from sugarcane juice in expanded granular sludge bed reactors under mesophilic conditions: the role of homoacetogenesis and lactic acid production: The role of homoacetogenesis and lactic acid

production. Industrial Crops and Products, v. 138, p. 111586-11592. Out. 2019. DOI: 10.1016/j.indcrop.2019.111586.

- MIRZOYAN, S.; TRCHOUNIAN, A.; TRCHOUNIAN, K. Hydrogen production by Escherichia coli during anaerobic utilization of mixture of lactose and glycerol: Enhanced rate and yield, prolonged production. International Journal of Hydrogen Energy, Abr. 2019. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2019.02.114.
- MISHRA P.; DAS D. Biohydrogen production from Enterobacter cloacae IIT-BT 08 using distillery effluent. International Journal of Hydrogen Energy, v. 39, p. 7496–7507. 2014. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2013.08.100.
- MORAES, B. S.; JUNQUEIRA, T. L.; PAVANELLO, L. G.; CAVALETT, O.; MANTELATTO, P. E.; BONOMI, A. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane biorefineries in Brazil from energy, environmental, and economic perspectives: profit or expense? **Applied Energy**, v. 113, p. 825–835. Jan. 2014. DOI: 10.1016/j.apenergy.2013.07.018
- MORAES, B. S.; ZAIAT, M.; BONOMI, A. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil: Challenges and perspectives. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 44, p. 888-903. Abr. 2015. DOI: 10.1016/j.rser.2015.01.023.
- MORAES, M. A. F. D.; SHIKIDA, P. F. A. Agroindústria canavieira no Brasil: evolução, desenvolvimento e desafios. São Paulo, 2002.
- MOTA, V. T., FERRAZ JÚNIOR, A. D. N.; TRABLY, E.; ZAIAT, M. Biohydrogen production at pH below 3.0: Is it possible? Water Research, v. 128, p. 350–361. Jan. 2018. DOI: 10.1016/j.watres.2017.10.060.
- MOTAVALLI P. P.; DUXBURY J. M.; SOUZA D. M. G. The influence of organic soil amendments on sulfate adsorption and sulfur availability in a Brazilian Oxisol. **Plant** and Soil, V. 154, p. 301–308. Jul. 1993. DOI: 10.1007/BF00012535.
- MÜLLER K.; ARLT. W. Status and development in hydrogen transport and storage for energy applications. **Energy Technology**, v.1, p. 501–511. Ago. 2013. DOI: 10.1002/ente.201300055.
- NASPOLINI, B. F.; MACHADO, A. C. O.; CRAVO JR, W. B.; FREIRE, D. M. G.; CHRISTE,
 M. Bioconversion of Sugarcane Vinasse into High-Added Value Products and Energy.
 BioMed Research International, p. 1-11. Nov. 2017. DOI: 10.1155/2017/8986165.
- NAZARETH, T. C. Produção microbiológica de ácido propiônico, 1,3-propanodiol e hidrogênio a partir de glicerol bruto em reator anaeróbio de leito fluidizado. 110 p. Dissertação (Mestrado). Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015.
- NAZARETH, T. C.; PARANHOS, A. G. O.; RAMOS, L. R.; SILVA, E. L. Valorization of the Crude Glycerol for Propionic Acid Production Using an Anaerobic Fluidized Bed Reactor with Grounded Tires as Support Material. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 186, p. 400-413, Out. 2018. DOI: 10.1007/s12010-018-2754-y.
- NIZ, M. Y. K.; ETCHELET, I.; FUENTES, L.; ETCHEBEHERE, C.; ZAIAT, M. Extreme thermophilic condition: An alternative for long-term biohydrogen production from sugarcane vinasse. International Journal of Hydrogen Energy, v. 44, n. 41, p. 22876-22887. Jul. 2019. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2019.07.015.
- NOVA CANA. Processos da fabricação do etanol. Disponível em: https://www.novacana.com/etanol/fabricacao/. Acesso em: 8 Jan. 2020.
- O-THONG, S.; HNIMAN, A.; PRASERTSAN, P.; IMAI, T. Biohydrogen production from cassava starch processing wastewater by thermophilic mixed cultures. International Journal of Hydrogen Energy, v. 36, p. 3409-3416, Set. 2011. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2010.12.053.
- PAGLIARO, M.; CIRIMINNA, R.; KIMURA, H.; ROSSI, M.; PINA, C. D. From Glycerol to Value-Added Products. Angewandte Chemie International Edition, v. 46, p. 4434– 4440. Fev. 2007. DOI: 10.1002/anie.200604694.
- PANDEY, B.; PRAJAPATI Y. K.; SHETH, P. N. Recent progress in thermochemical techniques to produce hydrogen gas from biomass: A state of the art review. International Journal of Hydrogen Energy, v. 44, p. 25384 -25415. 2019. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2019.08.031.

- PÂNICO R., POWELL W. H. E RICHER J. C. GUIA IUPAC Nomenclatura de Compostos Orgânicos" Tradução Portuguesa nas variantes Europeia e Brasileira de "A Guide to IUPAC Nomenclature of Organic Compounds - Recomendations 1993", 2002.
- PANT, D.; ADHOLEYA, A. Biological approaches for treatment of distillery wastewater: a review. Bioresource Technology, v. 98, p. 2321–2334. Out. 2007. DOI: https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.09.027.
- PANWAR, N. L.; KAUSHIKB, S. C.; KOTHARIA, S. Role of renewable energy sources in environmental protection: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, p.1513-1524, Abr. 2011. DOI: 10.1016/j.rser.2010.11.037.
- PAPANIKOLAOU, S.; FAKAS, S.; FICK, M., CHEVALOT, I.; GALIOTOUPANAYOTOU,
 2M.; KOMAITIS, M; MARC, I.; AGGELIS, G. Biotechnological valorisation of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: production of 1,3-propanediol, citric acid and single cell oil. Biomass and Bioenergy, v. 32, n. 1, p. 60-71. Jan. 2008. DOI: 10.1016/j.biombioe.2007.06.007.
- PARANHOS, A. G. O. Produção otimizada de 1,3-propanodiol, ácido propiônico, etanol e hidrogênio, a partir de glicerol bruto e cultura mista, em reator anaeróbio de leito fluidificado. 142 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2016.
- PARANHOS, A. G. DE O.; SILVA, E. L. Optimized 1,3-propanediol production from crude glycerol using mixed cultures in batch and continuous reactors. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 41, p. 1807-1816. Dez. 2018. DOI:10.1007/s00449-018-2003-3.
- PARK, J. H.; KIM, D. H.; KIM, S. H.; YOON, J. J.; PARK, H. D. Effect of substrate concentration on the competition between Clostridium and Lactobacillus during biohydrogen production. International Journal of Hydrogen Energy, v. 43, n. 25, p. 11460-11469. Jun. 2018. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2017.08.150.
- PAWAR, S. S.; VAN NIEL, E. W. J. Thermophilic biohydrogen production: how far are we? Applied Microbiology and Biotechnology, v. 97, p. 7999–8009. Ago. 2013. DOI: 10.1007/s00253-013-5141-1.

- PEITER, G. C.; ALVES, H. J.; SEQUINEL, R.; BAUTITZ, I. R. Alternativas para o uso do glicerol produzido a partir do biodiesel. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v.5, n. 4, p. 519-537, Nov. 2016. DOI: 10.5380/rber.v5i4.46501.
- PEIXOTO, G.; PANTOJA-FILHO, J. L. R.; AGNELLI, J. A. B.; BARBOZA, M.; ZAIAT, M. Hydrogen and Methane Production, Energy Recovery, and Organic Matter Removal from Effluents in a Two-Stage Fermentative Process. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 168(3), p. 651–671. Jul. 2012. DOI: 10.1007/s12010-012-9807-4.
- PEREYRA, D. L. A. D.; RUEGER, I. B.; BARBOSA, P. A. M. A.; PEITER, F. S.; FREITAS, D. M. S.; AMORIM, E. L. C. Co-fermentation of glycerol and molasses for obtaining biofuels and value-added products. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 37, p. 653-660. Ago. 2020. DOI:10.1007/s43153-020-00056-4.
- PHUKINGNGAM, D.; CHAVALPARIT, O.; SOMCHAI, D.; ONGWANDEE, M. Anaerobic baffled reactor treatment of biodiesel-processing wastewater with high strength of methanol and glycerol: reactor performance and biogas production. Chemical Papers, v. 65(5), p. 644-651. Out. 2011. DOI: 10.2478/s11696-011-0061-y.
- PINHO, C. L. C.; OLIVEIRA, C. E. S.; COIMBRA, J. C.; COTRIM, W. S. Produção de ácido lático em meio à base de efluentes da indústria de alimentos por cultura láctea mista imobilizada. Brazilian Journal of Food Technology, v. 22, p.1-10. Mai. 2019. DOI: http://dx.doi.org/10.1590/1981-6723.10018.
- POIRIER, S.; STEYER, J. P.; BERNET, N.; TRABLY, E. Mitigating the variability of hydrogen production in mixed culture through bioaugmentation with exogenous pure strains. International Journal Of Hydrogen Energy, v. 45, n. 4, p. 2617-2626. Jan. 2020. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2019.11.116.
- POURESMAEIL, S.; NOSRATI, M.; EBRAHIMI, S. Operating Control for Enrichment of Hydrogen-producing Bacteria from Anaerobic Sludge and Kinetic Analysis for Vinasse Inhibition. Journal of Environmental Chemical Engineering, v. 7, p.7. 2019. DOI: 10.1016/j.jece.2019.103090.

- PRADO, R. D. M.; CAIONE, G.; CAMPOS, C. N. S. Filter Cake and Vinasse as Fertilizers Contributing to Conservation Agriculture. Applied and Environmental Soil Science, p. 8. Jul. 2013. DOI: 10.1155/2013/581984.
- RAJ, S. M.; TALLURI, S.; CHRISTOPHER, L. P. Erratum to: Thermophilic Hydrogen Production from Renewable Resources: Current Status and Future Perspectives.
 BioEnergy Research, v. 5(2), p. 532–533. Abr. 2012. DOI:10.1007/s12155-012-9196-0.
- RAMOS, L. P.; SILVA, F. R.; MANGRICH, A. S.; CORDEIRO, C. S. Tecnologias de Produção de Biodiesel. **Revista Virtual de Química**., v. 3 (5), p. 385-405, Out. 2011. DOI: 10.5935/1984-6835.20110043.
- RAMOS, L. R. Aplicação de biorreatores anaeróbios em diferentes temperaturas para produção de hidrogênio a partir de águas residuárias agroindustriais. 2016. 138 f. Dissertação (Mestrado) Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2016.
- RAMOS, L. R., SILVA, E. L. Continuous Hydrogen Production from Agricultural Wastewaters at Thermophilic and Hyperthermophilic Temperatures. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 182, p. 846–869. Dez. 2017. DOI: 10.1007/s12010-016-2366-3.
- RAMOS, L. R.; SILVA, E. L. Continuous hydrogen production from cofermentation of sugarcane vinasse and cheese whey in a thermophilic anaerobic fluidized bed reactor.
 International Journal of Hydrogen Energy, v. 43(29), p. 13081–13089. Jul. 2018. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2018.05.070.
- RAMOS, L. R.; SILVA, E. L. Thermophilic hydrogen and methane production from sugarcane stillage in two-stage anaerobic fluidized bed reactors. International Journal of Hydrogen Energy, Fev. 2020. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2019.05.025
- REDWOOD, M.D.; PATERSON-BEEDLE, M.; MACASKIE, L.E. Integrating dark and light bio-hydrogen production strategies: towards the hydrogen economy. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 8, p. 149–185. 2009. DOI: 10.1007/s11157-008-9144-9.

- REGO, G. C. Produção de hidrogênio em reatores anaeróbios de leito fluidificado mesofílico a partir de diferentes substratos orgânicos da indústria sucroalcooleira. 119 f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.
- REIS, C. M.; CAROSIA, M. F.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B. A.; SILVA, E. L. Evaluation of hydrogen and methane production from sugarcane vinasse in an anaerobic fluidized bed reactor. International Journal of Hydrogen Energy, v.40, p. 8498-8509, Jul. 2015. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2015.04.136.
- REIS, C. M.; SILVA, E. L. Effect of upflow velocity and hydraulic retention time in anaerobic fluidized-bed reactors used for hydrogen production. Chemical Engineering Journal, v. 172, p. 28-36. Ago. 2011. DOI: 10.1016/j.cej.2011.05.009.
- REN, N.-Q; ZHAO, L.; CHEN, C.; GUO, W.-Q.; CAO, G.-L. A review on bioconversion of lignocellulosic biomass to H₂: Key challenges and new insights. Bioresource Technology. v. 215, p. 92–99. Set. 2016. DOI: http://dx.doi:10.1016/j.biortech.2016.03.124.
- RENEWABLE FUEL STANDARD PROGRAM (RFS2). Regulatory Impact Analysis. Program 2010:1109. February 2010, EPA-420-R-10-006. Disponível em: https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-08/documents/420r10006.pdf.
- RIBEIRO, B. T.; LIMA, J. M.; GUILHERME, L. R. G.; JULIÃO, L. G. F. Lead sorption and leaching from an Inceptisol sample amended with sugarcane vinasse. Scientia Agricola, v. 67, p. 441–447. Ago. 2010. DOI: 10.1590/S0103-90162010000400011.
- RITTMANN, B.E. McCARTY, P.L. Environmental Biotechnology: Principles and Applications. Ed. Mc Graw Hill, New York, USA, 2001.
- RIVALDI, J. D.; SARROUB, B. F.; FIORILO, R.; SILVA, S. S. Glicerol de biodiesel: Estratégias biotecnológicas para o aproveitamento do glicerol gerado da produção de biodiesel. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento. v. 37, p. 44–51, 2007.

- RIVERO, M..; SOLERA, R..; PEREZ, M. Anaerobic mesophilic co-digestion of sewage sludge with glycerol: enhanced biohydrogen production. International Journal of Hydrogen Energy, v. 39(6), p. 2481–2488. Fev. 2014. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2013.12.006.
- RODRIGUES, C. V.; NESPECA, M. G.; SAKAMOTO, I. K.; OLIVEIRA, J. E.; AMÂNCIO VARESCHE, M. B.; MAINTINGUER, S. I. Bioconversion of crude glycerol from waste cooking oils into hydrogen by sub-tropical mixed and pure cultures.
 International Journal of Hydrogen Energy, p. 1-11. Jan. 2018. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2018.02.174.
- RODRIGUES, C. V.; SANTANA, K. O.; NESPECA, M. G.; EDUARDO DE OLIVEIRA, J.;
 MAINTINGUER, S. I. Crude glycerol by transesterification process from used cooking oils: Characterization and potentialities on hydrogen bioproduction. International Journal of Hydrogen Energy, v. 41(33), 14641–14651. Set. 2016. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2016.06.209.
- ROSA, P. R. F.; SANTOS, S. C.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B. A.; SILVA, E. L. Hydrogen Production from Cheese whey with ethanol-type fermentation: Effect of Hydraulic Retention Time on the Microbial Community Compositon. International Journal of Hydrogen Energy, v. 161, 10-19. Jun. 2014. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.03.020.
- ROSA, P. R. F.; SANTOS, S. C.; SILVA, E. L. Different ratios of carbon sources in the fermentation of cheese whey and glucose as substrates for hydrogen production and ethanol production in continuous reactors. International Journal of Hydrogen Energy, v. 39, p. 1288-1296. Jan. 2014. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2013.11.011.
- ROSSETTO, A. J. Utilização Agronômica Dos Subprodutos E Resíduos Da Indústria Açucareira E Alcooleira. Paranhos, S.B. **Cana-de-açúcar: cultivo e utilização**, Campinas: Fundação Cargill. p. 435-504. 1987. DOI: doi.org/10.1590/S1415-43662007000100014.
- ROSSI, D. M.; DA COSTA, J. B.; DE SOUZA, E. A.; PERALBA, M. C. R.; SAMIOS, D.; AYUB, M. A. C. Comparison of different pretreatment methods for hydrogen production using environmental microbial consortia on residual glycerol from biodiesel,

International Journal of Hydrogen Energy, v. 36, n. 8, p. 4814-4819. Abr. 2011. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2011.01.005.

- ROY, S.; VISHNUVARDHAN, M.; DAS, D. Continuous thermophilic biohydrogen production in packed bed reactor. Applied Energy, v. 136, p. 51–58. Dez. 2014. DOI: 10.1016/j.apenergy.2014.08.031.
- RYMOWICZ, W.; RYWIŃSKA, A.; ŻAROWSKA, B.; JUSZCZYK, P. Citric acid production from raw glycerol by acetate mutants of *Yarrowia lipolytica*. Chemical Papers, v. 60, n. 5, p. 391–394, Out. 2006. DOI: 10.2478/s11696-006-0071-3.
- RYWIŃSKA, A.; RYMOWICZ, W.; ZAROWSKA, B.; WOJTATOWICZ, M. Biosynthesis of citric acid from glycerol by acetate mutants of yarrowia lipolytica in fed-batch fermentation. Food Technology and Biotechnology, v. 47, n. 1, p. 1-6, 2009.
- SÁ, L. R. V.; CAMMAROTA, M. C.; OLIVEIRA, T. C.; OLIVEIRA, E. M. M.; MATOS, A.;
 FERREIRA-LEITÃO, V. S. Pentoses, hexoses and glycerin as substrates for biohydrogen production: An approach for Brazilian biofuel integration. International Journal of Hydrogen Energy, v. 38, p. 2986–2997, Mar. 2013. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2012.12.103.
- SAADY, N. M. C. Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge. International Journal of Hydrogen Energy, v. 38, n. 30, p. 13172–13191, Out. 2013. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2013.07.122.
- SAMPAIO, R.M.; BONACELLI, M. B.M. Capacidades estatais e programas de promoção dos biocombustíveis no Brasil. Revista Gestão & Conexões Management and Connections Journal, Vitória (ES), v. 7, n. 1 jan./jun. 2018. DOI: 10.13071/ regec.2317-5087.2018.7.1.17141.137-160.
- SANTOS, S. C.; ROSA, P. F. R.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B. A.; SILVA, E. L. Continuous thermophilic hydrogen production and microbial community analysis from anaerobic digestion of diluted sugar cane stillage. International Journal of Hydrogen Energy. v. 39, p. 9000–9011. Jun. 2014a. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2014.03.241.

- SANTOS, S. C.; ROSA, P. F. R.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B. A.; SILVA, E. L. Hydrogen production from diluted and raw sugarcane vinasse under thermophilic anaerobic conditions. International Journal of Hydrogen Energy, v. 39, p. 9599– 9610. Jun. 2014b. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2014.04.104.
- SANTOS, S. C.; ROSA, P. F. R.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B. A.; SILVA, E. L. Organic loading rate impact on biohydrogen production and microbial communities at anaerobic fluidized thermophilic bed reactors treating sugarcane stillage. **Bioresource Technology**, v. 159, v. 55–63. Mai. 2014c. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.02.051.
- SARMA, S. J.; PACHAPUR, V.; BRAR, S. K.; BIHAN, Y. L.; BUELNA, G. Hydrogen biorefinery: potential utilization of the liquid waste from fermentative hydrogen production. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 50, p. 942-951. 2015. DOI: 10.1016/j.rser.2015.04.191.
- SEIXAS, L.; GIMENES, L.; FERNANDES, N. R. C. Tratamento da vinhaça por adsorção em carvão de bagaço de cana-de-açúcar. Química Nova, v.39, n.2, p.172-179, Fev. 2016. DOI: 10.5935/0100-4042.20160013.
- 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 Bioengineering, v. 104, p. 1098–1106. Dez. 2009. DOI: 10.1002/bit.22487.
- SENGMEE, D.; CHEIRSILP, B.; SUKSAROGE, T. T.; PRASERTSAN, P. Biophotolysisbased hydrogen and lipid production by oleaginous microalgae using crude glycerol as exogenous carbon source. International Journal of Hydrogen Energy, v. 42, n. 4, p. 1970-1976. Jan. 2017. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2016.10.089.
- SHIDA, G. M.; BARROS, A. R.; REIS, C. M.; AMORIM, E. L. C.; DAMIANOVIC, M. H. R.
 Z.; SILVA, E. L. Long-term stability of hydrogen and organic acids production in an anaerobic fluidized-bed reactor using heat treated anaerobic sludge inoculum.
 International Journal of Hydrogen Energy, v. 34, p. 3679-3688. Mai. 2009. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2009.02.076.
- SHIDA, G. M.; SADER, L. T.; AMORIM, E. L. C.; SAKAMOTO, I. K.; MAINTINGUER, S. I.; SAAVEDRA, N. K.; VARESCHE, M. B. A.; SILVA, E. L. Performance and

composition of bacterial communities in anaerobic fluidized bed reactors for hydrogen production: Effects of organic loading rate and alkalinity. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, p. 16925- 16934. Nov. 2012. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2012.08.140

- SILES, J. A.; GARCÍA-GARCÍA, I.; MARTÍN, A.; MARTÍN, M. A. Integrated ozonation and biomethanization treatments of vinasse derived from ethanol manufacturing. Journal of Hazardous Materials, v. 188, p. 247–253. Abr. 2011. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2011.01.096.
- SILVA, A. N.; MACÊDO, W. V.; SAKAMOTO, I. K.; PEREYRA, D. DE L. A. D.; MENDES, C. O.; MAINTINGUER, S. I.; AMORIM, E. L. C. Biohydrogen production from dairy industry wastewater in an anaerobic fluidized-bed reactor. **Biomass and Bioenergy**, v. 120, p. 257–264. Jul. 2019. DOI: 10.1016/j.biombioe.2018.11.025.
- SILVA-ILLANES, F.; TAPIA-VENEGAS, E.; SCHIAPPACASSE, M. C.; TRABLY, E.; RUIZ-FILIPPI, G. Impact of hydraulic retention time (HRT) and pH on dark fermentative hydrogen production from glycerol. Energy, v. 141, p. 358–367. Dez. 2017. DOI: 10.1016/j.energy.2017.09.073.
- SILVEIRA, E. Vinhaça para gerar energia. Revista Pesquisa FAPESP. p. 68-71. 2015.
- SIMÕES, A. N. Processamento do Glicerol Bruto em reatores anaeróbios de leito fluidificado, acidogênico e metanogênico, em temperatura mesofílica. 2017. 147 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Hidráulica e Sanitária, Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.
- SINHA, P.; PANDEY, A. An Evaluative Report and Challenges for Fermentative Biohydrogen Production. International Journal of Hydrogen Energy, v. 36, p. 7460-7478. Jul. 2011. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2011.03.077.
- SITTIJUNDA, S.; REUNGSANG A. Biohydrogen production from waste glycerol and sludge by anaerobic mixed cultures. International Journal of Hydrogen Energy, v. 37, p. 13789–13796. Set. 2012a. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2012.03.126.

- 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, v. 42(45), p. 27558– 27569. Nov. 2017. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2017.05.149.
- SITTIJUNDA, S.; REUNGSANG, A. Media optimization for biohydrogen production from waste glycerol by anaerobic thermophilic mixed cultures. International Journal of Hydrogen Energy, v. 37, n. 20, p. 15473-15482. Out. 2012b. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2012.02.185.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, v. 42(45), p. 27558-27569. Nov. 2017. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2017.05.149.
- SIVAGURUNATHAN, P.; ANBURAJAN, P.; KUMAR, G.; ARIVALAGAN, P.; BAKONYI, P.; KIM, S. H. Improvement of hydrogen fermentation of galactose by combined inoculation strategy. Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 123, n. 3, p. 353– 357, Mar. 2017. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2016.10.006.
- SONNLEITNER, A.; PEINTNER, C.; WUKOVITS, W.; FRIEDL, A.; SCHNITZHOFER, W. Process investigations of extreme thermophilic fermentations for hydrogen production: Effect of bubble induction and reduced pressure. Bioresource Technology, v. 118, p. 170-176. Ago. 2012. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.05.046.
- SOUSA, S. P.; LOVATO, G.; ALBANEZ, R.; RATUSZNEI, S. M.; RODRIGUES, J. A. D. Improvement of Sugarcane Stillage (Vinasse) Anaerobic Digestion with Cheese Whey as its Co-substrate: Achieving High Methane Productivity and Yield. Applied **Biochemistry and Biotechnology**, v. 1, p. 1-20, Jun. 2019. DOI: 10.1007/s12010-019-03056-4. DOI: 10.1007/s12010-019-03056-4.
- SOUZA, V. H. A.; Análise do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB): Resultados e críticas. Revista de Administração Geral, v.1, n.1, p.23-41. Macapá, Nov. 2015.
- STREEKSTRA H.; DEMATTOS M. J. T.; NEIJSSEL O. M.; TEMPEST D. W. Overflow metabolism during anaerobic growth of Klebsiella-Aerogenes Nctc 418 on glycerol and

dihydroxyacetone in chemostat culture. **Archives of Microbiology**, v. 147(3), p. 268–275. 1987. DOI: 10.1007/BF00463487.

- SYDNEY E.B.; LARROCHE C.; NOVAK A. C.; NOUAILLE R.; SARMA S. J.; BRAR S. K.; LETTI L. A. J.; SOCCOL V. T.; SOCCOL C. R. Economic process to produce biohydrogen and volatile fatty acids by a mixed culture using vinasse from sugarcane ethanol industry as nutrient source. **Bioresource Technology**, v. 159, p. 380–386. Mai. 2014. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.02.042.
- TACONI, K.; VENKATARAMANAN, K.; JOHNSON, D. Growth and Solvent Production by Clostridium pasteurianum ATCC 6013TM Utilizing Biodiesel-Derived Crude Glycerol as the Sole Carbon Source. Environmental Progress & Sustainable Energy, v. 28, n. 1. Mar. 2009. DOI: 10.1002/ep.10350.
- TÄHTI, H.; KAPARAJU, P.; & RINTALA, J. Hydrogen and methane production in extreme thermophilic conditions in two-stage (upflow anaerobic sludge bed) UASB reactor system. International Journal of Hydrogen Energy, v. 38(12), p. 4997–5002. Abr. 2013. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2013.02.058.
- TAVARES, A. S.; FERREIRA, T. F.; COELHO, M. A. Z. Produção de butanol a partir de glicerina utilizando bactérias do gênero *clostridium*. 8º Congresso Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento em Petróleo e Gás. 2015.
- TEMUDO, M. F.; POLDERMANS, R.; KLEEREBEZEM, R.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Glycerol fermentation by (open) mixed cultures: A chemostat study. Biotechnology and Bioengineering. v. 100, n. 6, p. 1088-1098. Ago. 2008. DOI: 10.1002/bit.21857.
- THOMPSON, J. C.; HE, B. B. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. Applied Engineering in Agriculture, v. 22, n. 2, p. 261– 265, Mar. 2006. DOI: 10.13031/2013.20272.
- TOKUMOTO, H.; KASHIWAGI, M. Change in dominant fermentation type during anaerobic digestion of high-loading glycerol with slight glucose content. Bioresource Technology, 126, p. 13–17. Dez. 2012. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.09.028.

- TOKUMOTO, H.; TANAKA, M. Novel anaerobic digestion induced by bacterial components for value-added byproducts from high-loading glycerol. Bioresource Technology, v. 107, p. 327–332. Mar. 2012. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.12.051.
- VAN GROENESTIJN, J. W.; HAZEWINKEL, J. H. O.; NIENOORD, M.; BUSSMANN, P. J. T. Energy aspects of biological hydrogen production in high-rate bioreactors operated in the thermophilic temperature range. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 27, p. 1141–1147. Dez. 2002. DOI: 10.1016/S0360-3199(02)00096-4.
- VARRONE C.; ROSA S.; FIOCCHETTI F. Enrichment of activated sludge for enhanced hydrogen production from crude glycerol. International Journal of Hydrogen Energy, v. 38, p. 1319–1331. Fev. 2013. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2012.11.069
- VI, L. V. T.; SALAKKAM, A.; REUNGSANG, A. Optimization of key factors affecting biohydrogen production from sweet potato starch. Energy Procedia, v. 138, p. 973-978. Out. 2017. DOI: 10.1016/j.egypro.2017.10.092.
- VIANA, M. B.; DAMS, R. I.; PINHEIRO, B. M.; LEITÃO, R. C.; SANTAELLA, S. T.; SANTOS, A.B. The Source of Inoculum and the Method of Methanogenesis Inhibition Can Affect Biological Hydrogen Production from Crude Glycerol. Bioenergy Research, v. 12, p. 733–74 2. Jun. 2019. DOI: 10.1007/s12155-019-09994-5.
- VIANA, M. B.; FREITAS, A. V.; LEITÃO, R. C.; PINTO, G. A. S.; SANTAELLA, S. T. Anaerobic digestion of crude wglycerol: a review. Environmental Technology Reviews, v. 1, p. 81–92. Jun. 2012. DOI: 10.1080/09593330.2012.692723.
- VIEIRA, M. C. A.; LIMA, J. F.; BRAGA, N. M. Setor sucroalcooleiro brasileiro: evolução e perspectivas. 2007.
- VON SPERLING, M. Princípios básicos de tratamento de esgotos. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - UFMG, 1996.
- VUITIK, G. A.; FUESS, L. T.; DEL NERY, V.; BAÑARES-ALCÁNTARA, R.; PIRES, E.
 C. Effects of recirculation in anaerobic baffled reactors. Journal of Water Process
 Engineering. v. 28, p. 36–44. Abr. 2019. DOI: 10.1016/j.jwpe.2018.12.013.

- WALKER, M.; ZHANG, Y.; HEAVEN, S.; BANKS, C. Potential errors in the quantitative evaluation of biogas production in anaerobic digestion processes. Bioresource Technology, v. 100, p. 6339–6346. Dez. 2009. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.07.018.
- WANG, J. L.; WAN, W. Comparison of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing cultures from digested sludge. International Journal of Hydrogen Energy, v. 33: 2934–2941. Jun. 2008a. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2008.03.048.
- WANG, J. L.; WAN, W. Effect of temperature on fermentative hydrogen production by mixed cultures. International Journal of Hydrogen Energy, v. 33, p. 5392–5397, Out. 2008b. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2008.07.010.
- WANG, J. L.; WAN, W. Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. International Journal of Hydrogen Energy, v. 34, n. 2, p. 799-811. Jan. 2009. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2008.11.015.
- WANG, W.; XIE, L.; LUO, G.; ZHOU, Q.; LU, Q. Optimization of biohydrogen and methane recovery within a cassava ethanol wastewater/waste integrated management system.
 Bioresource Technology, v.120, p. 165-172. Set. 2012. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.06.048.
- WANG, Z. X. et al. Glycerol production by microbial fermentation: A review. Biotechnology Advances, v. 19, p. 201-223, Jun. 2001. DOI: 10.1016/S0734-9750(01)00060-X.
- WILKIE, A. C.; RIEDESEL, K.; OWENS, J. M. Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks, **Biomass Bioenergy**, V. 19. p. 63–102. Ago. 2000. DOI: 10.1016/S0961-9534(00)00017-9.
- WU, K.-J.; LIN, Y.-H.; LO, Y.-C.; CHEN, C.-Y.; CHEN, W.-M.; CHANG, J.-S. Converting glycerol into hydrogen, ethanol, and diols with a Klebsiella sp. HE1 strain via anaerobic fermentation. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers. v. 42(1), p. 20–25. Jan. 2011. DOI: 10.1016/j.jtice.2010.04.005.

- WU, S.; CHU, C.; SHEN, Y. Effect of calcium ions on biohydrogen production performance in a fluidized bed bioreactor with activated carbon-immobilized cells. International Journal Hydrogen Energy, v. 37, p. 15496-15502, Out. 2012. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2012.04.119.
- WU, S. Y.; LIN, C. N.; CHANG, J. S.; LEE, K.S.; LIN, P. J. Hydrogen production with immobilized sewage sludge in three-phase fluidized-bed bioreactor. Biotechnology Progress, v. 19, p. 828-832. Set. 2003. DOI: 10.1021/bp0201354.
- XIA, Y.; CAI, L.; ZHANG, T.; FANG, H. H. P. Effects of substrate loading and co-substrates on thermophilic anaerobic conversion of microcrystalline cellulose and microbial communities revealed using high-throughput sequencing. International Journal of Hydrogen Energy, v.37, p.13652-13659, Out. 2012. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2012.02.079.
- XIU, Z. L.; CHEN, X.; SUN, Y. Q.; ZHANG, D. J. Stoichiometric analysis and experimental investigation of glycerol-glucose cofermentation in *Klebsiella pneumoniae* under microaerobic conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 33, p. 42 – 52, 2007. DOI: 10.1016/j.bej.2006.09.027.
- YADAV, M.; PARITOSH, K.; VIVEKANAND, V. Lignocellulose to bio-hydrogen: an overview on recent developments.: An overview on recent developments. International Journal of Hydrogen Energy, p. 523-345. out. 2019. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2019.10.027.
- YANG, G.; TIAN, J.; LI. J. Fermentation of 1,3-propanediol by a lactate deficient mutant of Klebsiella oxytoca under microaerobic conditions. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 73(5), p. 1017–1024. Jan. 2007. DOI: 10.1007/s00253-006-0563-7.
- YAZDANI, S.; GONZALEZ R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. Current Opinion in Biotechnology, v. 18(3), p. 213– 219. Jun. 2007. DOI: 10.1016/j.copbio.2007.05.002.
- YESHANEW, M. M.; FRUNZO, L.; LUONGO, V.; PIROZZI, F.; LENS, P. N. L.; ESPOSITO, G. Start-up of an anaerobic fluidized bed reactor treating synthetic carbohydrate rich wastewater. Journal of Environmental Management. v. 184, p. 456–464. Dez. 2016. DOI: 10.1016/j.jenvman.2016.10.001.

- YING, Z.; WANG, Y.; ZHENG, X.; GENG, Z.; DOU, B.; CUI, G. Experimental study and development of an improved sulfur–iodine cycle integrated with HI electrolysis for hydrogen production. International Journal of Hydrogen Energy, v. 45, n. 24, p. 13176-13188. Mai. 2020. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2020.03.037.
- ZHANG, G. L.; MA, B. B.; XU. X. L.; LI, C.; WANG, L. Fast conversion of glycerol to 1,3propanediol by a new strain of Klebsiella pneumoniae, Biochemical Engineering Journal, v. 37, p. 256–260. Dez. 2007. DOI: 10.1016/j.bej.2007.05.003.
- ZHANG, Z. P.; TAY, J. H.; SHOW, K. L.; YAN, R.; LIANG, D. T.; LEE, D. F.; JIANG, W. J. Biohydrogen production in a granular activated carbon anaerobic fluidized bed reactor. International Journal of Hydrogen Energy, v. 32, p. 185 191, 2007a. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2006.08.017.
- ZHOU, C.-H. C.; BELTRAMINI, J. N.; FAN, Y.-X.; LU, G. Q. M. Chemoselective catalytic conversion of glycerol as a biorenewable source to valuable commodity chemicals. Chemical Society Reviews. v. 37, p. 527–549, Abr. 2008. DOI: 10.1039/b707343g.