

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Escola de Engenharia de São Carlos

Co-digestão anaeróbia de glicerol bruto e esgoto sanitário em reatores anaeróbios de leito fluidificado visando a produção de hidrogênio e metano

Mariana Miziara Amui
Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Silva

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

MARIANA MIZIARA AMUI

Co-digestão anaeróbia de glicerol bruto e esgoto sanitário em reatores
anaeróbios de leito fluidificado visando a produção de hidrogênio e metano

São Carlos

2023

MARIANA MIZIARA AMUI

Co-digestão anaeróbia de glicerol bruto e esgoto sanitário em reatores anaeróbios de leito fluidificado visando a produção de hidrogênio e metano

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Engenharia Hidráulica e Saneamento.

Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Silva

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos

2023

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE 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).

A529c Amui, Mariana
Co-digestão anaeróbia de glicerol bruto e esgoto sanitário em reatores anaeróbios de leito fluidificado visando a produção de hidrogênio e metano / Mariana Amui; orientador Edson Luiz Silva. São Carlos, 2023.

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, 2023.

1. Esgoto doméstico. 2. Glicerina. 3. RALF. 4. Produção de biogás. 5. Processos fermentativos. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Engenheira **MARIANA MIZIARA AMUI**.

Título da dissertação: "Co-digestão anaeróbia de glicerol bruto e esgoto sanitário em reatores anaeróbios de leito fluidificado visando a produção de hidrogênio e metano".

Data da defesa: 12/09/2023.

Comissão Julgadora

Prof. Dr. Edson Luiz Silva
(Orientador)

(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

Prof. Dr. Rogers Ribeiro

(Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos/FZEA-USP)

Profa. Dra. Giovanna Lovato

(Instituto Mauá de Tecnologia/Mauá)

Resultado

Aprovada

Aprovada.

Aprovada.

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento:
Prof. Assoc. **Juliano Jose Corbi**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:
Prof. Titular **Carlos De Marqui Junior**

À minha mãe, Glória (*in memoriam*), por
todo amor e apoio incondicional
dedicados a mim enquanto esteve aqui.
Este trabalho é a concretização de todos
os seus esforços.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e pelas infinitas oportunidades a mim concedidas ao longo dos anos, e a Nossa Senhora da Medalha Milagrosa por ter guiado os meus caminhos para que eu chegasse até aqui.

Aos meus pais, Glória (*in memoriam*) e Oswaldo, por serem meu exemplo de amor, força e perseverança. Mãe, obrigada por ter sido sempre tão presente e cuidadosa comigo, por me dar o amor mais puro e verdadeiro que eu já senti. Obrigada por ter se preocupado tanto com meus estudos e com minha educação. Este mestrado foi seu sonho e eu sinto muito porque a senhora não está aqui fisicamente para comemorar comigo esta conquista que também é sua. Pai, obrigada por me ensinar tanto, todos os dias, e por ser meu maior modelo de caráter, trabalho duro e fé. Obrigada por sempre apoiar minhas decisões e acreditar tanto no meu sucesso. Se eu tive forças para finalizar este trabalho, mesmo com todas as dificuldades que enfrentamos no meio deste caminho, foi porque o senhor esteve ao meu lado, me incentivando. Agora, somos nós dois, juntos, até o fim. Enfim, obrigada por terem me escolhido como filha, eu devo tudo a vocês!

Ao meu noivo, Matheus, por todo o apoio e suporte na realização do mestrado. Obrigada pelas incontáveis vezes em que você precisou me acompanhar no laboratório durante a noite, aos finais de semana e feriados, e sempre sem reclamar porque sabia das minhas responsabilidades. Obrigada por ser meu parceiro, por conseguir me tranquilizar nos momentos difíceis, por me escutar quando eu precisei desabafar, e por comemorar comigo quando os resultados foram bons. Obrigada por sempre acreditar em mim, mais do que eu mesma. Acima de tudo, obrigada por todo o amor e carinho e por se fazer sempre presente, mesmo que distante fisicamente. Obrigada por escolher dividir a vida comigo e por tornar tudo mais leve.

À Tininha, minha segunda mãe, por cuidar tão bem de mim durante esses trinta anos. Obrigada por estar presente nos momentos mais difíceis, por se alegrar com as minhas conquistas e por ser minha confidente e amiga. E ao Gabriel, por dividir sua mãe comigo. Espero que eu possa ser um exemplo para você, meu irmãozinho caçula.

Ao Prof. Dr. Edson Luiz Silva pela orientação, pela paciência (principalmente nos momentos mais difíceis) e pelos ensinamentos. Obrigada por todo o aprendizado ao longo dos últimos anos e, acima de tudo, obrigada por ter visto potencial em mim.

Ao CNPq pelo apoio financeiro concedido ao longo do processo por meio da Bolsa de Mestrado.

À Escola de Engenharia de São Carlos (EESC-USP) e à Secretaria de Pós-Graduação do SHS, representada pelas queridas Rose e Sá, por todo o apoio e suporte.

Ao Prof. Dr. José Alberto Domingues Rodrigues e ao Prof. Dr. Marcelo Zaiat pelas valiosas considerações no Exame de Qualificação. Estendo, ainda, meus agradecimentos ao Prof. Dr. José Alberto por todas as dúvidas tiradas, pelos conhecimentos compartilhados, por me receber tão bem em seu Laboratório de Engenharia Bioquímica (EEM) e pela ajuda na realização das análises cromatográficas.

Ao Prof. Dr. Rogers Ribeiro e à Prof. Dra. Giovanna Lovato por aceitarem o convite para a banca de Comissão Julgadora e por todas as considerações feitas durante a defesa, as quais contribuíram brilhantemente para o texto final desta dissertação.

Às Dras. Isabel Kimiko Sakamoto e Franciele Pereira Camargo, por me receberem no Laboratório de Processos Biológicos (USP), pelo apoio imprescindível nas análises microbiológicas e na elaboração do perfil metabólico.

Aos docentes Prof. Dr. Juliano José Corbi, Prof. Dr. Davi Gasparini, Prof. Dr. Valdir Schalch, Prof. Dra. Maria Bernadete Amâncio Varesche, Dra. Valéria Del Nery, da Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento (EESC-USP) por todo o conhecimento transmitido ao longo das disciplinas cursadas.

Ao Oscar e ao Samuel, pela confecção dos reatores e pela ajuda com a manutenção deles durante todo o meu período no LCA-II.

Aos meus familiares, tios e primos (Neli, Leticia (*in memoriam*), Inês, Luzia, Carício, Antônio, Lourdes, Eduardo, Sérgio e Liliane, Camila e Cláudio) e todos os outros que, mesmo de longe, acompanharam esta caminhada e torceram pelo meu sucesso. E não poderia deixar de agradecer à minha sogra, Carmen, aos meus cunhados Rafael e Claudinha, ao meu sobrinho Lucas e à minha avó, Dona Dirce, e todos os que fazem parte da família do meu noivo, que me acolheram e que hoje também são minha família. Obrigada por todo o suporte, pelas orações e pelo carinho de sempre.

Aos meus melhores amigos da vida, por sempre estarem presentes, mesmo com a distância física (seja de cidade ou até de país). Júlia, Bianca, Natália Diniz, Paola, Rafael, Bárbara, Isabella, Natália Nunes – e tantos outros que seria difícil contar –, que sempre tiveram um lugar guardado no meu coração. Obrigada por vibrarem com as minhas conquistas.

Aos meus amigos e colegas de LCA II, que dividiram comigo momentos bons e ruins ao longo desta caminhada de mestrado. Kauanna, obrigada pela amizade, por toda a ajuda profissional e pessoal, pelo companheirismo nesses últimos anos. Alexandre,

obrigada pela paciência em ensinar sempre que precisei. Vocês dois foram minha família dentro do laboratório, com quem dividi longas noites de análises, períodos de desespero com prazos, uma rotina maçante e cansativa. Mas também foi com vocês que dividi noites de comida boa e gargalhadas, pizzas dentro do LCA II, além da eterna luta entre ir à academia ou comer um pastel de pós-treino, porque a gente sempre merecia. Às queridas Camila e Priscilla, obrigada por me acolherem no início de laboratório, quando eu não sabia nem segurar uma pipeta. Vocês me ensinaram a base e tudo o que eu sei hoje. À Carolina e à Yasmin, obrigada pelo curto tempo que dividimos o mesmo laboratório. Vocês também fizeram parte de todo o meu aprendizado.

Por fim, a todos, mesmo que não citados aqui, que fizeram ou fazem parte da minha vida e desta jornada, e que contribuíram de alguma forma para o meu crescimento pessoal e profissional.

Meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

AMUI, M. M. **Co-digestão anaeróbia de glicerol bruto e esgoto sanitário em reatores anaeróbios de leito fluidificado visando a produção de hidrogênio e metano.** 2023. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2023.

A questão da energia limpa e renovável tem sido estimulada a partir da crescente preocupação com a utilização de combustíveis fósseis em grande escala. É neste contexto em que se inserem os avanços em estudos e tecnologias em busca de energia limpa e biocombustíveis como biodiesel e biogás. O glicerol bruto, subproduto gerado no processo de produção do biodiesel, e potencial passivo ambiental excedente, possui elevada concentração de matéria orgânica, alto teor de carbono e poder de digestibilidade. Tais características fazem desse substrato um potencial gerador de biogás, podendo ser utilizado em associação a outros substratos durante a digestão anaeróbia. Posto isso, o presente trabalho visa associar o uso do glicerol bruto ao esgoto sanitário, de modo a avaliar a eficiência na produção de hidrogênio (H_2) e metano (CH_4), a partir da codigestão em Reatores Anaeróbios de Leito Fluidificado (RALF). Com esse objetivo, o presente estudo utilizou três reatores, confeccionados em acrílico, submetidos a condições mesofílicas (30 ± 2 °C). Os reatores foram operados continuamente, sendo um deles metanogênico de fase única (controle) (RALF-CM), enquanto os demais funcionaram em duas fases, sendo um reator acidogênico (RALF-A) e um sequencial metanogênico (RALF-SM). O RALF-CM foi submetido a diversas taxas de carregamento orgânico (TCO), a partir da variação dos tempos de detenção hidráulica (TDH) de 8, 12, 16 e 24 h, e das concentrações de 1,0, 1,5 e 3,0 g DQO.L⁻¹, as quais foram aplicadas progressivamente. O RALF-A, por sua vez, operou com TDH fixo em 2 h, mas com progressão de concentração de DQO de 1,0 a 3,0 g DQO.L⁻¹. O RALF-SM foi alimentado a partir do efluente acidogênico, e teve variações de TDH de 6, 12 e 18 h. Em todos os casos, a concentração de esgoto se manteve fixa em 500 mg DQO.L⁻¹, enquanto a solução de glicerol sofreu as variações de concentração de DQO. O RALF-CM obteve rendimento máximo de CH_4 (169,3 mL $CH_4.kg^{-1}$ DQO_{rem}) na TCO de 4,5 g DQO.L⁻¹.d⁻¹ (1,5 g DQO.L⁻¹ e TDH 8 h) e produtividade volumétrica de metano (PVM) máxima de 30,5 mL $CH_4.L^{-1}.h^{-1}$. O RALF-A obteve rendimento máximo de H_2 (1,5 mmol $H_2.g^{-1}DQO_{add}$) e produtividade volumétrica de hidrogênio (PVH) (31,2 mL $H_2.L^{-1}.h^{-1}$) na concentração de 1,5 g DQO.L⁻¹. Como consequência da etapa acidogênica, o RALF-SM apresentou máximo rendimento de CH_4 (213 mL $CH_4.g^{-1}$ DQO_{rem}) e máxima PVM (28,8 mL $CH_4.L^{-1}.h^{-1}$). Quanto ao potencial energético, o RALF-CM produziu 45,84 kJ.d⁻¹ em sua melhor fase, enquanto o RALF-A produziu 14,17 kJ.d⁻¹ e o RALF-SM produziu 34,14 kJ.d⁻¹ em sequência. No reator acidogênico, além da produção de hidrogênio foi detectada a produção de etanol, com valor máximo de 456 mg.L⁻¹. Em ambos os casos, com o aumento da concentração de DQO para 3,0 g DQO.L⁻¹, os reatores passaram a ter seus resultados reduzidos, chegando a zero no caso do RALF-CM. As análises de sequenciamento do gene 16 sRNA e do perfil metabólico indicaram genes do metabolismo de metano e vias de fixação do carbono e glicólise em maiores proporções nos RALF-CM e RALF-SM, enquanto os genes do metabolismo de ácidos graxos e biossíntese de ácidos graxos instaurados foram inferidas majoritariamente no RALF-A.

Palavras-chave: Esgoto doméstico. Glicerina. RALF. Produção de biogás. Processos fermentativos.

ABSTRACT

AMUI, M. M. **Crude glycerol and sanitary sewage anaerobic co-digestion in anaerobic fluidized bed reactors aiming at the production of hydrogen and methane.** 2023. Dissertação (Mestrado) – São Carlos School of Engineering, University of São Paulo, São Carlos, 2023.

The issue of clean and renewable energy has been stimulated by the growing concern with the use of fossil fuels on a large scale. In this context, progress has been made in studies and technologies in the search for clean energy and biofuels such as biodiesel and biogas. Crude glycerol is a by-product generated in the biodiesel production process and potential surplus environmental passive. It has a high concentration of organic matter, high carbon content and digestibility power. Such characteristics make this substrate a potential generator of biogas, which can be used in association with other substrates during anaerobic digestion. Therefore, the present work aims to associate the use of crude glycerol with sanitary sewage, in order to evaluate the co-digestion in Anaerobic Fluidized Bed Reactors (RALF) and the efficiency in the hydrogen (H_2) and methane (CH_4) production. With this goal in mind, the present study used three reactors made of acrylic submitted to mesophilic conditions (30 ± 2 °C). The reactors were operated continuously, one of them being a single-phase methanogenic (control) (RALF-CM), while the others operated in two phases, being an acidogenic reactor (RALF-A) and a sequential methanogenic reactor (RALF-SM). The RALF-CM was submitted to different organic loading rates (OLR), due to the variation of the hydraulic retention times (TDH) from 8, 12, 16 to 24 h, and the variation of the concentrations from 1.0, 1.5 to 3.0 g $COD.L^{-1}$, which were applied progressively. On the other hand, the RALF-A operated with a 2 h fixed TDH, with progression of COD concentration from 1.0 to 3.0 g $COD.L^{-1}$. The RALF-SM was fed from the acidogenic effluent, and had TDH variations of 6, 12 and 18 h. In all cases, the sewage concentration remained fixed at 500 mg $COD.L^{-1}$, while the glycerol solution underwent variations in COD concentration. The RALF-CM obtained a maximum methane yield ($169.3 \text{ mL } CH_4.kg^{-1} COD_{rem}$) at the OLR of 4.5 g $COD.L^{-1}.d^{-1}$ (1.5 g $COD.L^{-1}$ and TDH 8 h) and maximum methane production rate (MPR) of 30.5 mL $CH_4.L^{-1}.h^{-1}$. RALF-A obtained maximum hydrogen yield of 1.5 mmol $H_2.g^{-1} COD_{add}$ and hydrogen production rate (HPR) of 31.2 mL $H_2.L^{-1}.h^{-1}$ at a concentration of 1.5 g $COD.L^{-1}$. Following the acidogenic step, RALF-SM showed maximum methane yield of 213 mL $CH_4.g^{-1} COD_{rem}$ and maximum MPR of 28.8 mL $CH_4.L^{-1}.h^{-1}$. Regarding energy potential, RALF-CM produced 45.84 kJ.d⁻¹ in its best phase, while RALF-A produced 14.17 kJ.d⁻¹ and RALF-SM produced 34.14 kJ.d⁻¹ in sequence. In the acidogenic reactor, in addition to hydrogen production, ethanol was also detected, with a maximum result of 456 mg.L⁻¹. In both cases, with the increase in the COD concentration to 3.0 g $COD.L^{-1}$, the results of the reactors began to be reduced, reaching zero in the case of the RALF-CM. Sequencing analyzes of the 16 sRNA gene and metabolic profile indicated genes for methane metabolism and carbon fixation and glycolysis pathways in greater proportions in RALF-CM and RALF-SM, while genes for fatty acid metabolism and biosynthesis of unsaturated fatty acids were mostly inferred in RALF-A.

Keywords: Domestic sewage. Glycerin. AFBR. Biogas production. Fermentation processes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Reação de transesterificação de triglicerídeo.....	30
Figura 2 – Fluxograma da cadeia produtiva do biodiesel.....	31
Figura 3 – Glicerol gerado na produção de biodiesel segundo grandes regiões – 2012-2021	32
Figura 4 – Dados gerais do esgotamento sanitário no Brasil e projeções para 2035	36
Figura 5 – Rota metabólica e grupos microbianos envolvidos na digestão anaeróbia ...	39
Figura 6 – Rotas metabólicas da fermentação do glicerol.....	43
Figura 7 – Reator metanogênico em fase única.....	64
Figura 8 – reatores em duas fases: acidogênico e sequencial metanogênico	65
Figura 9 – Meio suporte e suas dimensões: pneu triturado	67
Figura 10 – Fluxograma do procedimento de partida dos reatores	70
Figura 11 – Fluxograma experimental da operação contínua dos reatores	73
Figura 12 – TCO aplicada, DQO afluente e remoção de DQO nas fases de 1 a 6.....	82
Figura 13 – TCO aplicada, concentração de glicerol afluente e conversão de glicerol nas fases de 1 a 6.....	84
Figura 14 – Rendimento e produção volumétrica de biogás para as fases de 1 a 6 no RALF-CM	89
Figura 15 – TCO aplicada, DQO afluente e remoção de DQO nas fases de 1 a 3	92
Figura 16 - TCO aplicada, concentração de glicerol afluente e conversão de glicerol nas fases de 1 a 3.....	95
Figura 17 – Rendimento e produção volumétrica de biogás para as fases de 1 a 3 no RALF-A.....	98
Figura 18 – TCO aplicada, DQO afluente e remoção de DQO nas fases de 1 a 5.....	105
Figura 19 – Concentração de glicerol afluente e conversão de glicerol nas fases de 1 a 5	107
Figura 20 - Rendimento e produção volumétrica de biogás para as fases de 1 a 5 no RALF-SM	111
Figura 21 – Comparação do rendimento de metano observado no RALF-CM e no RALF-SM	114
Figura 22 – Comparação da produção volumétrica de metano observada no RALF-CM e no RALF-SM.....	115

Figura 23 – Possíveis rotas metabólicas e enzimas envolvidas na conversão do glicerol, produção de ácidos graxos, hidrogênio e metano.....	118
Figura 24 – Proporção dos principais Kos inferidos nas amostras analisadas em relação ao metabolismo de degradação de glicerolípídeos (A), metabolismo de piruvato (B) e metabolismo de produção de metano (C), de acordo com as vias metabólicas do KEGG.	122
Figura 25 – Vias metabólicas de interesse para obtenção de metano a partir da degradação do glicerol em sistema de digestão anaeróbia, inferidas a partir do sequenciamento do gene 16S rRNA para as quatro amostras analisadas.....	124

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características químicas dos esgotos domésticos brutos.....	34
Tabela 2 – Resumo da literatura sobre as condições para produção de H ₂ a partir de glicerol.....	50
Tabela 3 – Resumo da literatura sobre as condições para produção de CH ₄ a partir de glicerol.....	51
Tabela 4 – Resumo da literatura sobre as condições para produção de H ₂ e CH ₄ a partir de esgoto sanitário e glicerol	56
Tabela 5 – Trabalhos realizados com esgoto em Reator de Leito Fluidificado	58
Tabela 6 - Trabalhos realizados com glicerol em Reator de Leito Fluidificado	60
Tabela 7 – Dimensões e volumes dos reatores	63
Tabela 8 – Caracterização do glicerol	67
Tabela 9 – Composição do esgoto sintético	68
Tabela 10 – Composição do esgoto sintético para produção de 1 litro de meio com 500mgDQO.L-1.....	68
Tabela 11 – Fases operacionais do RALF-CM	71
Tabela 12 – Fases operacionais do RALF-A.....	71
Tabela 13 – Fases operacionais do RALF-SM.....	72
Tabela 14 – Parâmetros físico-químicos, frequência amostral e metodologia das análises realizadas para monitoramento.....	74
Tabela 15 – Condições cromatográficas para análise de composição do biogás	75
Tabela 16 – Condições cromatográficas para análise de metabólitos solúveis	76
Tabela 17 – Condições operacionais aplicadas ao RALF-CM.....	78
Tabela 18 – Eficiência de remoção de DQO no RALF-CM	81
Tabela 19 – Concentrações afluente e efluente e conversão do glicerol no RALF-CM	83
Tabela 20 - Composição do biogás no RALF-CM nas fases de 1 a 6.....	85
Tabela 21 – Rendimento de metano no RALF-CM nas fases de 1 a 6.....	87
Tabela 22 – Produção volumétrica de metano obtida nas fases de 1 a 6 no RALF-CM	88
Tabela 23 – Condições operacionais aplicadas ao RALF-A	91
Tabela 24 – Remoção de DQO no RALF-A	91
Tabela 25 - Concentrações afluente e efluente e conversão do glicerol no RALF-A	93
Tabela 26 – Composição do biogás no RALF-A nas fases de 1 a 3	96

Tabela 27 – Rendimento de hidrogênio no RALF-A nas fases de 1 a 3	97
Tabela 28 – Concentração de ácidos voláteis no RALF-A	100
Tabela 29 – Balanço de DQO da Fase 2 do RALF-A	100
Tabela 30 – Condições operacionais aplicadas ao RALF-SM	102
Tabela 31 – Eficiência de remoção de DQO no RALF-SM.....	104
Tabela 32 – Concentrações afluente e efluente e conversão do glicerol no RALF-SM	106
Tabela 33 - Composição do biogás no RALF-SM nas fases de 1 a 5	108
Tabela 34 - Rendimento de metano no RALF-SM nas fases de 1 a 5.....	109
Tabela 35 – Produção volumétrica de metano obtida nas fases de 1 a 5 no RALF-SM	110
Tabela 36 – Principais resultados obtidos nos reatores em etapa única e em duas etapas	113
Tabela 37 – Comparação do processo em uma etapa com resultados globais do processo em duas etapas.....	113
Tabela 38 – Proporção dos principais Kos (%) inferidos nas quatro amostras analisadas em relação ao metabolismo de degradação glicerolípídeos (map00561), metabolismo de piruvato (map00620) e metabolismo de produção de metano (map00680) de acordo com as vias metabólicas de KEGG	119

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

- AI: alcalinidade intermediária
- ANA: Agência Nacional de guas
- ANP: Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
- AP: alcalinidade parcial
- APHA: American Public Health Association
- ASBR: reator anaeróbio batelada sequencial (*anaerobic sequencing batch reactor*)
- AT: alcalinidade total
- AV: acidez volátil
- BPIT: banda de rodagem de pneus inservíveis triturada
- CA: carvão antracitoso
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: cloreto de cálcio
- CAG: carvão ativado granular
- CH_4 : metano
- CO_2 : dióxido de carbono
- COV: carga orgânica volumétrica
- CSTR: reator contínuo de mistura perfeita (*continuous stirred tank reactor*)
- DBO: demanda bioquímica de oxigênio
- DGGE: eletroforese em gel com gradiente desnaturante
- DQO: demanda química de oxigênio
- H_2 : hidrogênio
- H_2S : sulfeto de hidrogênio
- HCl: cido clorídrico
- $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: cloreto de magnésio
- N_2 : nitrogênio
- NaCl: cloreto de sódio
- NaOH: hidróxido de sódio
- NaHCO_3 : bicarbonato de sódio
- PCR: reao em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*)
- pH: potencial hidrogeniônico
- PNPB: Programa Nacional de Produo e Uso de Biodiesel
- PVH: produo volumétrica de hidrogênio
- PVM: produo volumétrica de metano

RAHLF: reator anaeróbio horizontal de leito fixo

RALF: reator anaeróbio de leito fluidificado

RALF-A: Reator acidogênico

RALF-CM: reator metanogênico controle

RALF-SM: reator metanogênico sequencial

RCH4: reator metanogênico

TCO: taxa de carregamento orgânico

TDH: tempo de detenção hidráulica

UASB: reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (*upflow anaerobic sludge blanket reactor*)

UFCB: biorreator anaeróbio de coluna ascendente (*anaerobic upflow column bioreactor*)

Vmf: velocidade mínima de fluidização

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
2 OBJETIVOS	28
2.1 Objetivo Geral	28
2.2 Objetivos Específicos.....	28
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
3.1 Matriz Energética, Biodiesel E Glicerol	29
3.2 Esgoto Sanitário.....	33
3.3 Digestão Anaeróbia	37
3.3.1 Digestão Em Duas Fases.....	40
3.4 Digestão Anaeróbia De Glicerol.....	41
3.5 Codigestão	52
3.6 RALF	57
3.6 Considerações Finais	61
4 MATERIAL E MÉTODOS	63
4.1 Reator Anaeróbio De Leito Fluidificado	63
4.2 Inóculo E Material Suporte	65
4.3 Substratos.....	67
4.4 Operação Dos reatores E Condições Experimentais.....	69
4.5 Métodos Analíticos	74
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
5.1 Operação Em Fase Única: Reator Controle Metanogênico (RALF-CM).....	77
5.1.1 Desempenho Do RALF-CM.....	77
5.1.1.1 Remoção De DQO.....	80
5.1.1.2 Conversão De Glicerol	83
5.1.1.3 Composição Do Biogás	85

5.1.1.4	Rendimento E Produção Volumétrica De Metano No RALF-CM	87
5.2	Operação Em Duas Fases: Reator Acidogênico (RALF-A).....	90
5.2.1	Desempenho Do RALF-A	90
5.2.1.1	Remoção De DQO.....	91
5.2.1.2	Conversão De Glicerol	93
5.2.1.3	Composição Do Biogás	95
5.2.1.4	Rendimento E Produção Volumétrica De Metano No RALF-A	97
5.2.2	Metabólitos Solúveis No RALF-A.....	99
5.3	Operação Em Duas Fases: Reator Sequencial Metanogênico (RALF-SM)	101
5.3.1	Desempenho Do RALF-SM	102
5.3.1.1	Remoção De DQO.....	103
5.3.1.2	Conversão De Glicerol	106
5.3.1.3	Composição Do Biogás	108
5.3.1.4	Rendimento E Produção Volumétrica De Metano No RALF-SM.....	109
5.4	Codigestão Em Uma Etapa <i>Versus</i> Duas Etapas	112
5.5	Análise De Viabilidade Econômica	116
5.6	Análise Da Comunidade Microbiana Dos Reatores	117
6	CONCLUSÕES.....	125
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	128
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	129

1 INTRODUÇÃO

A grande dependência da sociedade, de modo geral, dos combustíveis fósseis é um dos atuais problemas ambientais e um desafio de grande escala. Os debates acerca desse tema envolvem questões econômicas e geopolíticas e, principalmente, o fato de não serem renováveis. Desse modo, essa preocupação legítima tem sido o fator que impulsiona o planeta pela busca da geração de formas alternativas de energia que sejam capazes de suprir a necessidade energética mundial (KHAN *et al.*, 2018).

Dentre as respostas encontradas para a resolução desta problemática, o biogás e os biocombustíveis destacam-se como fontes energéticas eficientes e têm recebido uma atenção considerável de pesquisadores dos mais variados campos de atuação ao redor do mundo (AZADI *et al.*, 2017; KHAN *et al.*, 2018). Tais tecnologias representam processos sustentáveis, renováveis, além de serem alternativas ambientalmente seguras e de menor impacto quando comparadas aos combustíveis fósseis (DHARMADI; MURARKA; GONZALES, 2006).

Nesse contexto, o biogás, sobretudo metano (CH₄) e hidrogênio (H₂), é uma valiosa fonte de energia renovável, produzido a partir da biodegradação de matéria orgânica por meio da digestão anaeróbia. Sua importância se deve à sua capacidade de auxiliar na redução de resíduos, assim como na redução da emissão de gases do efeito estufa (AWE *et al.*, 2017).

Por esse motivo, o biogás é considerado, pelo plano energético brasileiro, como uma das soluções para a geração de energia nas ETEs (estações de tratamento de esgoto) do futuro, sendo uma das práticas sustentáveis a serem implementadas no Brasil (PROBIOGÁS, 2017). Este estímulo promovido no país ocorre porque a digestão anaeróbia do esgoto sanitário, como forma de tratamento de efluentes utilizada nas ETEs, produz biogás rico em metano. Isso confere potencial energético, que poderia ser utilizado *in loco*, de modo a tornar a ETE autossuficiente em energia. No entanto, atualmente, o biogás produzido é simplesmente liberado para a atmosfera, contribuindo para as elevadas taxas de emissão de gases do efeito estufa, sem que haja o devido aproveitamento do potencial para a geração de energia (GARCIA, 2019).

Por sua vez, os biocombustíveis têm se mostrado como importantes fontes energéticas. Dentre eles, destaca-se o biodiesel, combustível biodegradável, derivado de fontes renováveis e produzido a partir da transesterificação de óleos vegetais ou gorduras animais com metanol e etanol, por meio de catálise básica. Este biocombustível tem sido

considerado por muitos uma alternativa eficiente para a complementação do uso de combustíveis derivados do petróleo, com até mesmo com grandes chances para a substituição destes (MEHER; SAGAR; NAIK, 2006; MOTA; SILVA; GONÇALVES, 2009).

Neste cenário, o biodiesel é um dos biocombustíveis já com ampla utilização no Brasil, cuja produção se destaca a nível mundial, devido ao Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB) instituído em 2004 pelo Governo Federal. Este programa estabeleceu a adição obrigatória do biocombustível ao óleo diesel de origem fóssil, sendo estipulado, para o ano de 2023, o valor de 12% de biodiesel para a mistura (CNPE, 2023).

Ao final do processo de produção de biodiesel, obtém-se o glicerol como principal subproduto, também conhecido como glicerina em sua forma comercial. Com o aumento constante na produção de biodiesel devido aos incentivos federais, ocorre, também, o aumento na geração de glicerol. Segundo dados da Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) (2022), foram gerados, no ano de 2021, 613,3 mil m³ de glicerina bruta como subproduto da produção de biodiesel. Dessa maneira, existe certo acúmulo desse subproduto, que não consegue ser totalmente absorvido pela indústria, visto que normalmente utilizam sua versão refinada e com maior grau de pureza do que aquela produzida pelo biodiesel. Ressalta-se que o processo de purificação é oneroso e economicamente desvantajoso, principalmente para pequenos produtores. Dessa forma, sabendo do elevado potencial poluidor deste subproduto, que possui elevada concentração de matéria orgânica, é necessário reconhecer que o excesso de glicerol pode vir a se tornar um passivo ambiental excedente e, por consequência, aumentar consideravelmente os riscos de problemas ambientais (POLETO *et al.*, 2016; VARRONE *et al.*, 2013).

Assim, a preocupação com o possível acúmulo de glicerol no meio ambiente, devido ao aumento na produção, tem estimulado a pesquisa por maneiras de realizar seu aproveitamento direto. Dentre elas, o uso do glicerol como substrato orgânico voltado para a geração de produtos intermediários com elevado valor agregado, como etanol, ácidos acético, butírico, propiônico e 1,3-propanodiol, por exemplo, tem sido apontado como uma alternativa significativa (SIMÕES, 2017). Do mesmo modo, a utilização do glicerol para a produção de bioenergia - metano (CH₄) e hidrogênio (H₂) -, gerada a partir da digestão anaeróbia, é vista como uma promissora solução energética a partir de fontes renováveis (SILVA; MACK; CONTIERO, 2009).

Inúmeros estudos têm investigado a produção de biogás a partir da adição de glicerol bruto a diversos substratos como lixiviado (TAKEDA; GOTARDO; GOMES, 2020), lodo de esgoto (FOUNTOULAKIS; PETOUSI; MANIOS, 2010) e subprodutos agroindustriais (FOUNTOULAKIS; MANIOS; 2009). O esgoto sanitário também é um substrato com grande potencial de codigestão, mas ainda com estudos recentes (AYABE, 2018; GARCIA, 2019; PRAKASH *et al.*, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2020).

Desta forma, sabendo-se do potencial energético existente por meio do esgoto sanitário produzido diariamente no Brasil, considerando a existência de projetos de fomento do Governo Federal, como o PROBIOGÁS (2017), que visam ampliar o uso eficiente do biogás em sistemas de saneamento básico, e aliando à utilização do glicerol como cossustrato, tem-se uma estratégia interessante de destinação deste resíduo e aproveitamento dos gases gerados no tratamento de esgotos. Assim, a baixa concentração de matéria orgânica característica desta água residuária, que pode ser fator limitante no processo anaeróbio e na produção de biogás no efluente, pode ser superada com a adição do glicerol no processo de digestão, aumentando a eficiência do processo.

Posto isto, embasado na possibilidade de se obter bioenergia por meio de glicerol e esgoto sanitário, a presente pesquisa foi desenvolvida com o objetivo de avaliar a eficiência da produção de hidrogênio e metano, a partir do processo da codigestão dos substratos glicerol bruto e esgoto sanitário, em Reatores Anaeróbios de Leito Fluidificado (RALF). O RALF apresenta-se como uma importante opção, visto que este tem sido empregado em diversos estudos para diferentes tipos de águas residuárias (SIMÕES, 2017). Entretanto, existe uma lacuna quanto à utilização deste tipo de reator para o tratamento de esgoto sanitário com codigestão de glicerol, fator que justifica a escolha do reator e a importância dele no presente estudo.

Assim, objetivando a produção de metano e hidrogênio, foram avaliados os processos de codigestão em RALF, sob condições mesofílicas (30 ± 2 °C), em fase única, com um reator controle metanogênico (RALF-CM), e em duas fases, sendo a primeira em reator acidogênico (RALF-A) e a segunda em reator sequencial metanogênico (RALF-SM). Os reatores foram submetidos a uma variação da taxa de carregamento orgânico (TCO), do tempo de detenção hidráulica (TDH) e da concentração de DQO em diferentes razões de esgoto ($0,5$ g DQO L⁻¹) e de glicerol (de $0,5$ a $2,5$ g DQO L⁻¹).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho possui como objetivo geral avaliar a produção de hidrogênio e metano a partir da codigestão de glicerol e esgoto sanitário, em reatores anaeróbios de leito fluidificado (RALF), sob condições mesofílicas (30 ± 2 °C).

2.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- a) avaliar os resultados obtidos para os indicadores de desempenho da codigestão de glicerol e esgoto sanitário em reator anaeróbio de leito fluidificado em fase única;
- b) analisar a performance do reator sequencial a partir do uso do efluente do reator acidogênico;
- c) avaliar o desempenho para produção de hidrogênio e metano em diferentes condições de concentração e tempo de detenção hidráulica, tanto para RALF-CM quanto para RALF-A e RALF-SM;
- d) comparar os resultados da codigestão no processo em duas fases (RALF-A e RALF-SM) com o processo em fase única (RALF-M) e seus respectivos desempenhos para produção de hidrogênio e metano;
- e) determinar as comunidades microbianas encontradas nos reatores, relativas ao desempenho de cada um;
- f) quantificar a produção de ácidos acético, propiônico, butírico e valérico e etanol por meio de cromatografia nos reatores de fase única e de duas fases.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta seção do trabalho estão apresentadas as bases de fundamentação teórica para melhor entendimento dos objetivos, desenvolvimento da pesquisa a partir dos material e métodos, assim como para futuras comparações, interpretações e discussão dos resultados que foram obtidos e, por fim, para a elaboração das conclusões. Tais informações foram consultadas na literatura de referência relevante para o tema proposto, e incluem: o panorama da matriz energética brasileira e mundial, o biodiesel e seu processo de produção, o detalhamento do processo de digestão anaeróbia e a codigestão, o esgoto sanitário e suas características, o glicerol como fonte suplementar de carbono na codigestão e uma revisão acerca do funcionamento e da aplicação dos reatores anaeróbios de leito fluidificado.

3.1 Matriz energética, biodiesel e glicerol

Ao longo das últimas centenas de anos, a partir da primeira revolução industrial no século XVIII, os avanços científicos trouxeram consigo uma grande exploração dos recursos energéticos, principalmente no que diz respeito aos combustíveis fósseis. Primeiro o carvão mineral, depois o petróleo e o gás natural foram as principais fontes de energia que acompanharam a evolução humana e o desenvolvimento mundial. (GOLDEMBERG, 2016; NOGUEIRA; CARDOSO, 2007). Entretanto, com o surgimento de tecnologias mais avançadas, também nasceu a preocupação com a escassez dos combustíveis fósseis, o constante aumento nos custos de produção, além dos problemas gerados a partir da combustão destes, com a emissão de gases poluentes, intensificadores do efeito estufa, como o CO₂. Neste cenário, surge a urgência em encontrar outras fontes alternativas de energia, que sejam renováveis e mais atrativas (SANTIBÁÑEZ; VARNERO; BUSTAMANTE, 2011).

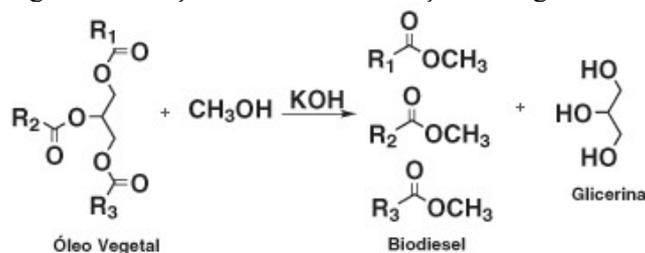
Acompanhando a tendência mundial de busca por soluções alternativas de energia, a produção de biocombustíveis tem chamado grande atenção. Biogás, biodiesel e bioetanol são alguns exemplos das novas fontes renováveis de energia, produzidas a partir de biomassa, que têm sido desenvolvidas. Dentre eles, o biodiesel tem grande potencial para substituição do diesel de petróleo, visto que possui um desempenho semelhante, sem exigir modificações nos motores (DABDOUB; BRONZEL; RAMPIN,

2009), além da vantagem de não ser tóxico, possuir baixos índices de emissões de poluentes e ser biodegradável (CHENG *et al.*, 2007).

Nesse contexto, o biodiesel passou a ser amplamente utilizado na matriz energética brasileira. O Governo Federal, a partir de 2003, passou a investir em políticas de incentivo à produção desse biocombustível. Em 2004, foi instituído o Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB), que estabelece a adição obrigatória de biodiesel ao diesel de petróleo. O percentual de teor do biocombustível presente no diesel fóssil aumentou gradativamente de 2%, em 2008, a 12% em 2023, conforme prevê a Resolução nº 03, de 20 de março de 2023 (CNPE, 2023).

O biodiesel é produzido, predominantemente, a partir do processo de transesterificação de óleos vegetais ou gorduras animais, por meio de catálise básica, com um álcool. O catalisador básico pode ser hidróxido de sódio (NaOH) ou hidróxido de potássio (KOH) e o álcool pode ser metanol ou etanol. O óleo vegetal e a gordura animal são triglicerídeos que, durante o processo de transesterificação, formam três moléculas de ésteres metílicos ou etílicos dos ácidos graxos – ou seja, o biodiesel – e liberam uma molécula de glicerol (MOTA; SILVA; GONÇALVES, 2009). A reação está demonstrada na Figura 1.

Figura 1 - Reação de transesterificação de triglicerídeo



Fonte: Mota, Silva e Gonçalves (2009)

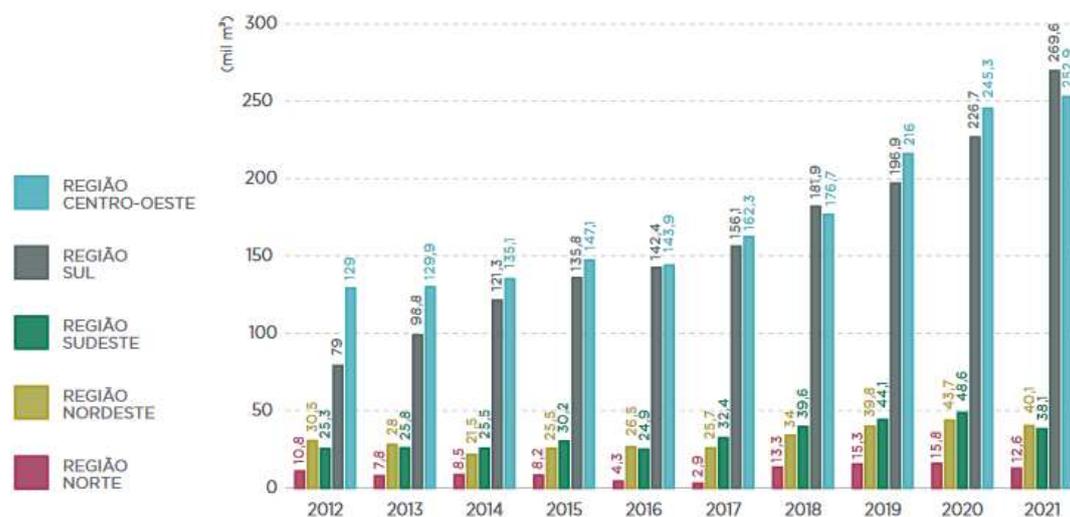
A cadeia produtiva do biodiesel, apresentada na Figura 2, tem início com a escolha da matéria-prima que será utilizada. Uma infinidade de óleos vegetais pode ser utilizada, como por exemplo os óleos de soja, palma, girassol, canola, coco e algodão. No caso da gordura de origem animal, usualmente é utilizado o sebo. Podem ainda ser utilizados os óleos de descarte, como óleos usados em frituras (KNOTHE *et al.*, 2006). É importante ressaltar que, independentemente da escolha da matéria-prima, o processo de transesterificação é basicamente igual, tendo apenas mudanças nos balanços de massa e nas dosagens (COSTA *et al.*, 2013).

A fase mais densa (pesada), representa a glicerina bruta, com excesso de álcool, água e impurezas advindas da matéria prima. Estes constituintes determinam o grau de pureza do glicerol, importante para os processos futuros que virão a utilizar este subproduto (KNOTHE *et al.*, 2006; SAMUL; LEJA; GRAJEK, 2014). Esta fase passa por um processo de evaporação a 70 °C para a recuperação do álcool. Neste momento, a mistura encontra-se parcialmente livre de impurezas, sendo considerado glicerol bruto. Em seguida, ocorre o processo de destilação do glicerol, o qual é realizado para obtenção de glicerina com níveis de aproximadamente 99 % de pureza. Este processo ocorre sob vácuo elevado, com 600 a 1330 Pa absoluto, em temperaturas entre 190 °C e 200 °C, motivo pelo qual é tão oneroso. Ao final do processo, obtém-se a chamada glicerina destilada (MARÇOM, 2010).

Na atualidade, o Brasil apresenta-se como destaque na produção mundial de biodiesel. Desse modo, com o aumento constante na produção de biodiesel, ocorre, também, o aumento na geração da glicerina. De acordo com dados da Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, em 2021, a produção de biodiesel no país atingiu a marca de aproximadamente 6,8 milhões de metros cúbicos produzidos. Levando-se em consideração o processo de produção do biocombustível, foram gerados, em 2021, cerca de 613 mil metros cúbicos de glicerina (ANP, 2022).

Na Figura 3 está apresentada a evolução na geração de glicerol a partir da produção de biodiesel segundo as regiões brasileiras. Percebe-se o constante aumento nos valores de glicerol à medida que a produção do biodiesel foi ganhando força no país.

Figura 3 – Glicerol gerado na produção de biodiesel segundo grandes regiões – 2012-2021



Fonte: ANP (2022)

Dessa maneira, levando-se em consideração o aumento constante na geração de glicerol a partir da produção de biodiesel, existe a probabilidade do acúmulo desse subproduto como um passivo ambiental, caso a grande quantidade não consiga ser totalmente absorvida pela indústria, visto que normalmente utilizam a versão refinada da glicerina e com maior grau de pureza do que aquela produzida pelo processo de transesterificação. Assim, sua disponibilidade na forma bruta e, principalmente, sua forma altamente reduzida de carbono, tornam o glicerol um produto de grande interesse para a produção de biogás (MARU *et al.*, 2012).

3.2 Esgoto sanitário

Os esgotos sanitários, de maneira geral, são constituídos basicamente por água, cerca de 99,9 %, e o restante é composto por sólidos orgânicos (proteínas, carboidratos, lipídios e microrganismos) e inorgânicos (amônia, nitratos, ortofosfatos etc.), suspensos e dissolvidos, além de microrganismos, que podem ser bactérias, protozoários, fungos, algas, helmintos e vírus. Entretanto, as características dos esgotos podem ser variáveis em função dos usos aos quais a água for submetida, além de outros fatores como clima, hábitos e situação socioeconômica da população (VON SPERLING, 1996).

Desse modo, os esgotos domésticos brutos possuem características quantitativas químicas típicas, as quais estão apresentadas na Tabela 1.

Com relação à matéria orgânica constituinte dos esgotos sanitários, pode-se afirmar que é variável de acordo com a origem do efluente. Cerca de 70 % dos sólidos existentes no esgoto têm origem orgânica, sendo, geralmente, uma combinação de hidrogênio, carbono e, algumas vezes, nitrogênio. É importante que a matéria orgânica presente em uma água residuária seja quantificada para que se conheça o nível de poluição dela.

Tabela 1 – Características químicas dos esgotos domésticos brutos

Parâmetro	Contribuição per capita (g.hab ⁻¹ .d ⁻¹)		Concentração		
	Faixa	Típico	Unidade	Faixa	Típico
<i>Sólidos Totais</i>	120-220	180	mg.L ⁻¹	700-1350	1100
• Em suspensão	35-70	60	mg.L ⁻¹	200-450	400
Fixos	7-14	10	mg.L ⁻¹	40-100	80
Voláteis	25-60	50	mg.L ⁻¹	165-350	320
• Dissolvidos	85-150	120	mg.L ⁻¹	500-900	700
Fixos	50-90	70	mg.L ⁻¹	300-550	400
Voláteis	35-60	50	mg.L ⁻¹	200-350	300
• Sedimentáveis	-	-	mg.L ⁻¹	10-20	15
<i>Matéria Orgânica</i>					
• Determinação indireta					
DBO ₅	40-60	50	mg.L ⁻¹	200-500	350
DQO	80-130	100	mg.L ⁻¹	400-800	700
DBO última	60-90	75	mg.L ⁻¹	350-600	500
• Determinação direta					
COT	30-60	45	mg.L ⁻¹	170-350	250
<i>Nitrogênio Total</i>	6,0-112,0	8,0	mg N.L ⁻¹	35-70	50
• Nitrogênio orgânico	2,5-5,0	3,5	mg N.L ⁻¹	15-30	20
• Amônia	3,5-7,0	4,5	mg NH ₃ -N.L ⁻¹	20-40	30
• Nitrito	≈0	≈0	mg NO ₂ -N.L ⁻¹	≈0	≈0
• Nitrato	0,0-0,5	≈0	mg NO ₃ -N.L ⁻¹	0-2	≈0
<i>Fósforo</i>	1,0-4,5	2,5	mg P.L ⁻¹	5-25	14
• Fósforo orgânico	0,3-1,5	0,8	mg P.L ⁻¹	2-8	4
• Fósforo inorgânico	0,7-3,0	1,7	mg P.L ⁻¹	4-17	10
<i>pH</i>	-	-	-	6,7-7,5	7,0
<i>Alcalinidade</i>	20-30	25	mg CaCO ₃ .L ⁻¹	110-170	140
<i>Cloretos</i>	4-8	6	mg.L ⁻¹	20-50	35
<i>Óleos e Graxas</i>	10-30	20	mg.L ⁻¹	55-170	110

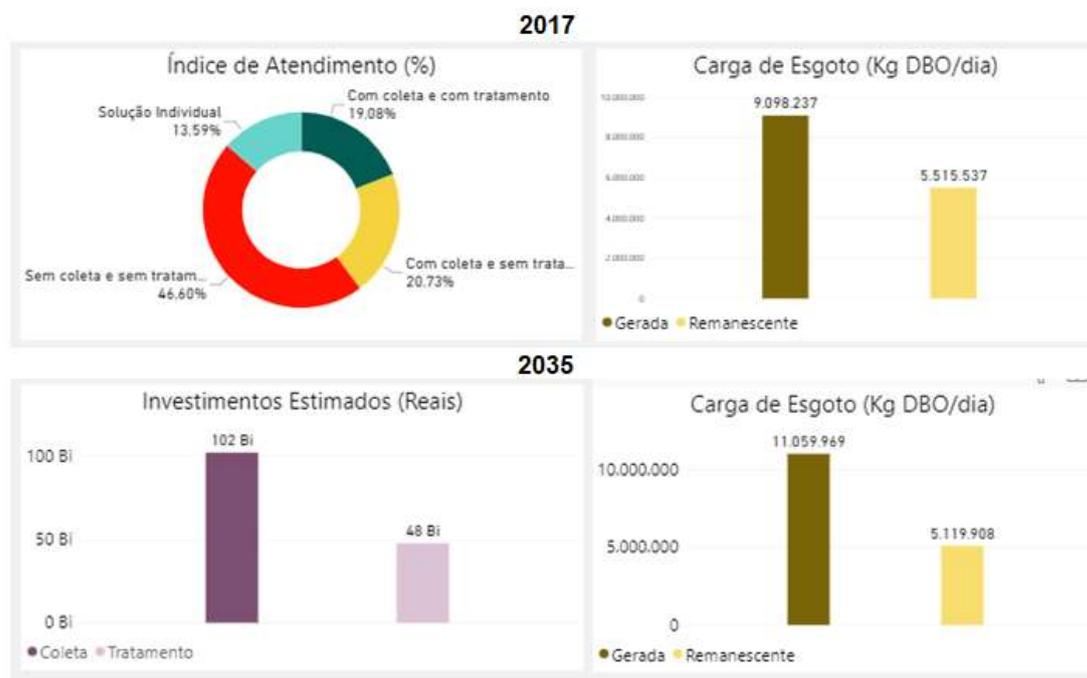
Fonte: Adaptado de Von Sperling (1996)

Dentre as maneiras mais utilizadas para medição da quantidade de matéria orgânica presente no esgoto, está a demanda bioquímica de oxigênio (DBO), que mede a quantidade de oxigênio que é necessária para que a matéria orgânica seja estabilizada biologicamente, após um período de cinco dias, a uma temperatura padrão. Outra forma comumente utilizada no controle operacional de Estações de Tratamento de Esgotos (ETEs) é a demanda química de oxigênio (DQO). Esta corresponde a quantidade necessária de oxigênio para oxidar a matéria orgânica de uma amostra, por meio de permanganato ou dicromato de potássio. O tempo de resposta da DQO é de duas horas, muito menor quando comparado à DBO, o que constitui uma das grandes vantagens e justifica seu amplo uso em laboratórios de análises de ETEs. Tipicamente, a DQO pode variar entre 200 e 800 mg DQO.L⁻¹ para esgotos domésticos, tendo média de 400 mg DQO.L⁻¹, enquanto a DBO normalmente varia entre 100 e 400 mg DBO.L⁻¹ (JORDÃO; PESSOA, 2017).

A produção de esgotos tem relação direta com o contingente populacional, ou seja, é natural que grandes capitais e aglomerados urbanos sejam responsáveis pela maior quantidade de esgotos gerados. De acordo com dados da Agência Nacional de Águas (ANA, 2017), 9,1 mil toneladas de DBO.dia⁻¹ são geradas no Brasil, sendo 48% desse total gerados por 106 municípios com população acima de 250 mil habitantes. Dessa carga total gerada, cerca de 2,4 mil t DBO/dia são dispostas a céu aberto ou encaminhadas para soluções não adequadas de coleta e tratamento, como fossas negras, sendo considerado um atendimento precário, e apenas 43%, cerca de 3,9 mil t DBO/dia, passam por coleta e tratamento adequados.

Tendo em vista o crescente aumento populacional e sua correlação com a geração de esgotos, projeções foram realizadas pela ANA (2017) a fim de mensurar a carga de esgoto gerada e, conseqüentemente, as alternativas técnicas e os investimentos que podem ser tomados ao longo dos anos. Nesse sentido, para o ano de 2035, as projeções apontam uma carga de esgoto gerada no país de 11 mil t DBO/dia (ANA, 2017). Ou seja, de acordo com os resultados, a geração diária de esgoto sofrerá um aumento de 21,5% no país. Os dados citados anteriormente estão apresentados na Figura 4.

Figura 4 – Dados gerais do esgotamento sanitário no Brasil e projeções para 2035



Fonte: Adaptado de ANA (2017)

É de suma importância entender o impacto do lançamento de esgotos nos corpos hídricos, visto que compromete a qualidade das águas em ambientes urbanos e, conseqüentemente, gera impactos na saúde da população (ANA, 2017). Por esse motivo, a escolha de uma ETE e de tratamentos adequados e eficientes, que respeitem as exigências ambientais e legais, incorporam as preocupações da sociedade, tanto de natureza ambiental e ecológica quanto voltados para a saúde pública.

As estações de tratamento contam, normalmente, com combinações de tratamento que envolvem processos unitários físicos, químicos e biológicos. Os processos físicos envolvem a remoção de compostos da superfície do esgoto por meio de forças físicas, como métodos de sedimentação, floculação, entre outros. Na etapa química, a remoção dos constituintes ocorre por meio de reações químicas envolvendo precipitação, adsorção e desinfecção, por exemplo. Por último, são aplicados processos biológicos, que realizam a remoção especificamente de constituintes da matéria orgânica, além de serem utilizados na remoção de nitrogênio e fósforo do esgoto (METCALF; EDDY, 2016).

Dessa forma, alguns processos unitários são reunidos, de modo a realizar o processamento do esgoto, seguindo a ordem de tratamento preliminar e primário

(processos unitários físicos), secundário (processos unitários químicos e biológicos) terciário e avançado (combinação dos três processos unitários). Os tratamentos biológicos que se desenvolvem em reatores acontecem por intermédio de microrganismos responsáveis por oxidar a matéria orgânica carbonácea, particulada e dissolvida (METCALF; EDDY, 2016). Neste trabalho, um dos objetos de estudo se baseia nos processos biológicos que ocorrem a partir da digestão anaeróbia do esgoto sanitário que, ao final do tratamento, libera biogás, normalmente não aproveitado nas ETEs (GARCIA, 2019).

Com relação à digestão anaeróbia do esgoto sanitário voltado para a produção de biogás e bioenergia e para a geração de produtos de valor agregado, nota-se limitado número de trabalhos na área. Tendo em vista as características químicas do esgoto doméstico, com baixas concentrações de matéria orgânica, o que acontece normalmente é a adição de cossustratos, com o objetivo principal de fornecer nutrientes para o efluente, compensando a falta ou o excesso destes nas águas residuárias, de modo a otimizar a cinética da produção de biogás (CHERNICHARO, 2007).

3.3 Digestão anaeróbia

Os processos anaeróbios de digestão para tratamento de águas residuárias têm sido considerados de grande importância, com estudos crescendo nas últimas décadas, principalmente por apresentarem vantagens sobre os processos aeróbios. Dentre essas vantagens, estão o baixo consumo de energia e a possibilidade de recuperação energética com a geração de bioenergia por meio do metano; a baixa produção de biomassa ou lodo; e a aceitação de maiores cargas orgânicas volumétricas aplicadas aos reatores com áreas menores. Entretanto, a digestão anaeróbia necessita de um longo período para partida e estabilização do sistema, além da sensibilidade a mudanças operacionais como temperatura e pH. Contudo, esses são problemas que podem ser gerenciados e até mesmo evitados quando se tem conhecimento e habilidade operacional adequados (METCALF; EDDY, 2016).

A digestão anaeróbia pode ser descrita como sendo o processo biológico de conversão da matéria orgânica em condições de ausência de oxigênio (CHERNICHARO, 1997). Este processo acontece de maneira natural e autorregulada, por uma variedade de grupos microbianos que interagem entre si, convertendo compostos orgânicos complexos, por meio de suas atividades metabólicas, em biogás, composto por metano (CH₄), dióxido

de carbono (CO_2), hidrogênio (H_2) e sulfeto de hidrogênio (H_2S) (CAMPOS, 1999; MOSEY, 1983). De acordo com Chernicharo (2007), ao final da biodigestão, de 50 a 70 % da matéria biodegradável transforma-se em metano, e cerca de 5 a 15 % se torna biomassa microbiana.

Durante o processo de digestão anaeróbia, a degradação biológica dos compostos orgânicos ocorre, de maneira simplificada, em quatro etapas principais: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese. Em substratos em que existe a presença significativa de sulfatos, também ocorre a etapa de sulfetogênese, que acarreta a produção de H_2S .

A primeira etapa, chamada de hidrólise, tem início a partir da quebra de materiais orgânicos complexos e insolúveis, como carboidratos, proteínas e lipídeos, em derivados menores, solúveis, como aminoácidos, açúcares e peptídeos, por meio da ação de coenzimas.

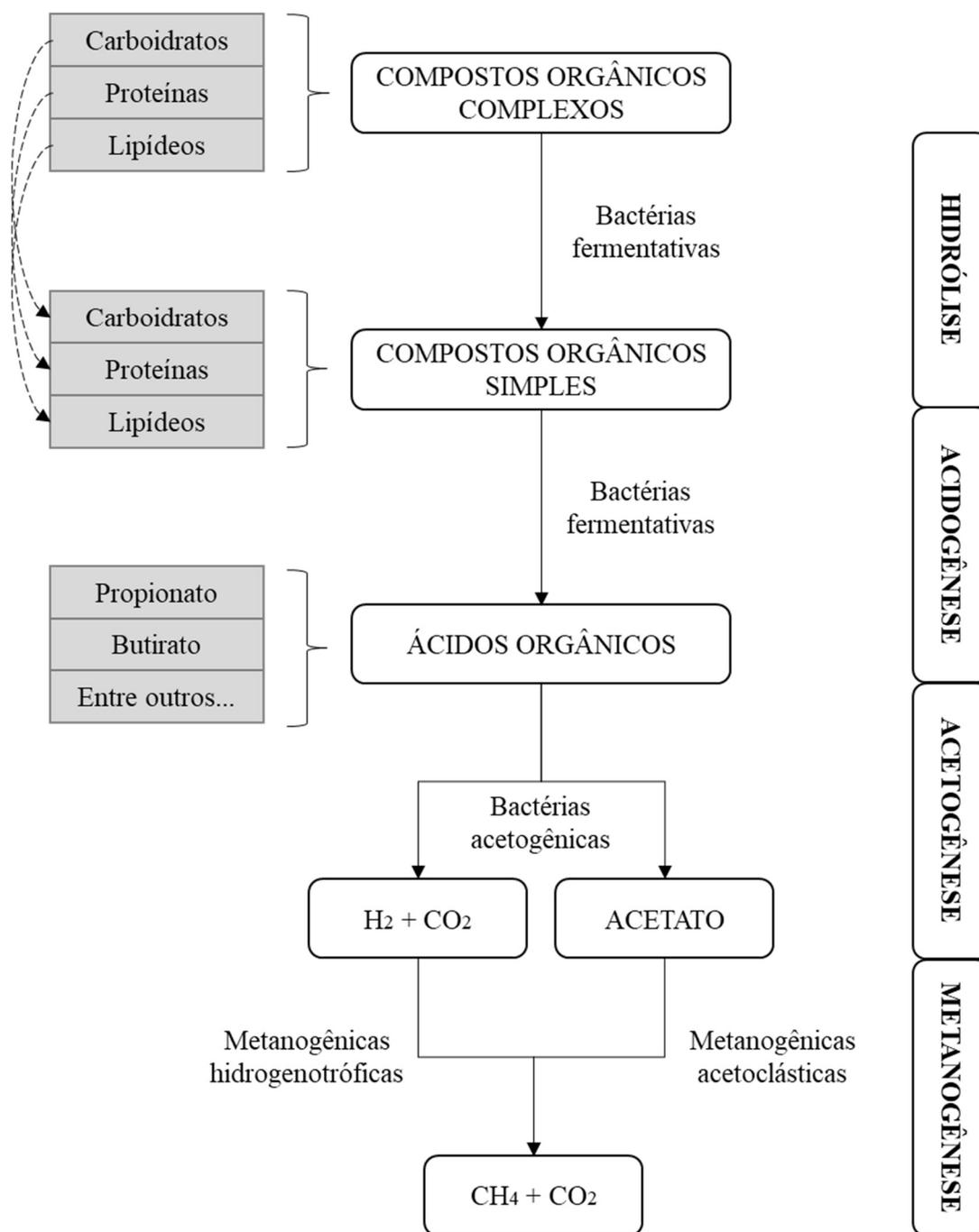
Na etapa de acidogênese, os monômeros que foram hidrolizados na primeira fase serão convertidos em ácidos orgânicos, álcoois, cetonas, dióxido de carbono, hidrogênio e novas células bacterianas, por bactérias fermentativas acidogênicas. Dentre os produtos da acidogênese, estão ácido acético, propiônico, butírico, lático e etanol. Os produtos resultantes dessa segunda etapa não conseguem ser transformados diretamente pelas arqueias metanogênicas.

Desse modo, ocorre a fase de acetogênese, antecedendo a fase de metanogênese. Nesta etapa, os produtos obtidos anteriormente são convertidos em acetato, hidrogênio e dióxido de carbono por bactérias sintróficas acetogênicas. Assim, elas oxidam os produtos intermediários em compostos apropriados para a última etapa de digestão anaeróbia.

Por fim, os produtos obtidos nas etapas anteriores são convertidos em metano e dióxido de carbono pelas arqueias metanogênicas. Esta conversão pode ocorrer por meio da via acetoclástica (com arqueias metanogênicas acetoclásticas que utilizam o acetato como fonte de energia) ou hidrogenotrófica (com arqueias metanogênicas hidrogenotróficas que utilizam o hidrogênio como fonte de energia), a depender do substrato consumido (ADEKUNLE; OKOLIE, 2015; KHAN *et al.*, 2018).

As sequências metabólicas envolvidas na digestão anaeróbia e os respectivos grupos microbianos estão demonstradas na Figura 5, por meio de um esquema simplificado.

Figura 5 – Rota metabólica e grupos microbianos envolvidos na digestão anaeróbia



Fonte: Adaptado de Chernicharo (2007)

A eficiência do processo de digestão anaeróbia – e, por consequência, do sistema de tratamento – depende do estabelecimento de um equilíbrio dinâmico e ecológico entre os vários microrganismos presentes. Isto porque existem diferenças fisiológicas entre as bactérias fermentativas e as arqueias metanogênicas, as quais devem ser respeitadas pelas condições operacionais estabelecidas (SHIDA, 2008). Quando as condições ambientais

no interior do reator são favoráveis ao sistema anaeróbio para produção de metano, e existe uma quantidade suficiente de arqueias metanogênicas presente no meio reacional, os ácidos orgânicos intermediários são utilizados por elas assim que são formados (CHERNICHARO, 1997).

Desse modo, os ácidos não se acumulam e o pH permanece em uma faixa favorável, não somente a diferentes organismos, mas principalmente às arqueias, e assim o processo permanece em equilíbrio. Caso as arqueias metanogênicas estejam expostas a condições desfavoráveis ou não estejam presentes em quantidade suficiente, elas não serão capazes de consumir os ácidos presentes na mesma taxa em que são produzidos pelas bactérias acidogênicas. Ou seja, de modo simplificado, a alcalinidade do meio é consumida rapidamente, provocando uma queda no pH, tornando o reator “azedo” ou em desequilíbrio (CHERNICHARO, 1997).

3.3.1 Digestão em duas fases

Nos sistemas convencionais de digestão anaeróbia, as quatro etapas do processo (as reações de hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese) acontecem em um único reator, concomitantemente. Neste tipo de configuração única, os grupos de microrganismos (fermentativos e metanogênicos) estão sempre em constante relação, mesmo tendo restrições termodinâmicas e ambientais bem diferentes no mesmo meio. As bactérias fermentativas apresentam, de maneira geral, as maiores taxas de crescimento e são mais resistentes a condições de estresse no meio, enquanto as arqueias metanogênicas apresentam taxas de crescimento menores e têm maior sensibilidade a variações bruscas nas condições operacionais. Isso geralmente acarreta o acúmulo de produtos da etapa acidogênica nos reatores anaeróbios, o que provoca o desequilíbrio e um consequente “choque” de carga (POHLAND; GHOSH, 1971).

Diante deste problema, sabendo-se que as condições ótimas de operação para o processo fermentativo e para o processo metanogênico são diferentes, realizar a separação da digestão anaeróbia em reatores independentes possibilita um aprimoramento de ambas as etapas (SIVAGURUNATHAN *et al.*, 2018).

Em outras palavras, o processo de digestão anaeróbia, e suas quatro etapas, pode acontecer separadamente em duas fases. Na primeira, chamada acidogênese, um grupo de bactérias é responsável por converter compostos orgânicos complexos em compostos mais simples, principalmente ácidos voláteis. Na segunda fase, conhecida por

metanogênese, ocorre a conversão dos ácidos orgânicos, hidrogênio e gás carbônico em metano e mais gás carbônico por meio das arqueias metanogênicas, obtendo-se os produtos finais do processo de digestão (CHERNICHARO, 1997). Assim, realizando-se tal separação, é possível combinar a produção de hidrogênio e metano a partir de águas residuárias (KRISHNAN *et al.*, 2019).

Isso significa que a configuração do tratamento anaeróbio a partir da separação por etapas potencializa a atividade e o crescimento de cada grupo microbiano envolvido tanto na acidogênese quanto na metanogênese. Isso acontece porque as condições favoráveis às bactérias fermentativas são inibitórias às arqueias metanogênicas (INCE, 1998). Devido a essa potencialização, há um aumento na eficiência da remoção de matéria orgânica e na produção de CH₄ pela fase metanogênica, além da possibilidade de recuperação do hidrogênio e de conversão de compostos de elevado valor agregado gerados pela etapa acidogênica.

Em adição, outras vantagens podem ser percebidas a partir do tratamento anaeróbio em duas fases, tais como: maior estabilidade dos sistemas quando são submetidos a choques de carga elevada, possibilitam menores tempos de detenção hidráulica, apresentam tolerância a maiores cargas orgânicas aplicadas e maiores porcentagens de gás metano no biogás produzido (MALINOWSKY, 2021).

No entanto, é importante salientar que, apesar de vantajosa, a digestão em duas etapas acaba por separar os grupos microbianos e, assim, interromper as relações sintróficas entre eles (MARCHAIM; KRAUSE, 1992).

Assim, visando a otimização das etapas e a geração de produtos a partir da digestão anaeróbia, em 1971 o primeiro trabalho foi proposto nesse sentido. Pohland e Ghosh (1971) realizaram a separação do processo, em dois reatores em série, de acordo com a cinética de crescimento dos microorganismos, com o objetivo de garantir as condições ambientais ótimas para cada grupo, de modo a melhorar o desempenho e a estabilidade do processo.

3.4 Digestão anaeróbia de glicerol

Glicerol ou glicerina são os nomes comuns para 1,2,3-propanotriol, um composto químico que pode ser gerado como subproduto a partir de reações de saponificação e hidrólise em plantas oleoquímicas, bem como a partir da reação de transesterificação de óleos vegetais do biodiesel (TAN; ABDUL AZIZ; AROUA, 2013). É um álcool simples,

com diversos usos na indústria de cosméticos, alimentícia, automotiva, farmacêutica, entre outras (WANG *et al.*, 2001).

A glicerina bruta vegetal resultante da produção do biodiesel apresenta cerca de 20% de impurezas, como catalisadores, álcool, ácidos graxos, sais e água. Tais impurezas vão depender do tipo de oleaginosa e do tipo de catálise utilizada no processo. Por esse motivo, o glicerol bruto possui poucas aplicações diretas (BEATRIZ; ARAÚJO; DE LIMA, 2011). O processo de purificação pode ser realizado, mas constitui um método oneroso, principalmente para pequenos e médios produtores de biodiesel.

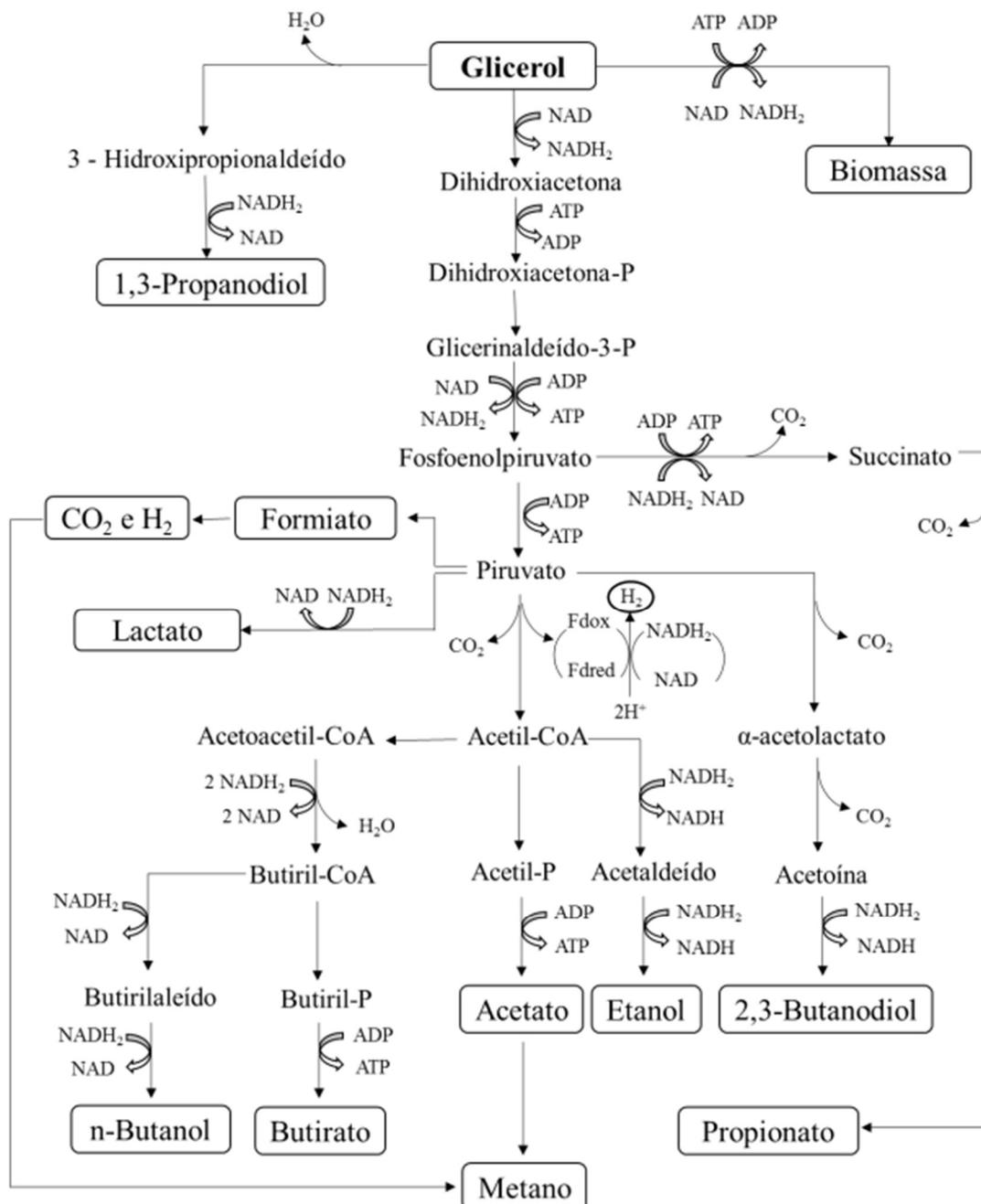
Levando-se em consideração os elevados valores progressivos de glicerol bruto gerado a partir do biodiesel, citados anteriormente, faz-se necessária a criação de novas aplicações para este subproduto. Logo, a conversão do glicerol em compostos de elevado valor agregado, a partir da fermentação biológica, torna-se uma das aplicações promissoras. Desse modo, diversas pesquisas têm utilizado o glicerol bruto como objeto de estudo, seja como monossustrato ou cossustrato na produção fermentativa de hidrogênio e metano, visando à geração de energia.

A digestão anaeróbia de glicerol ocorre por meio de microrganismos variados, encontrados no meio ambiente, e que têm a capacidade de utilizá-lo como fonte de carbono e energia (ITO *et al.*, 2005; SILVA; MACK; CONTIERO, 2009). Entre estes microrganismos, estão descritos na literatura aqueles capazes de converter glicerol em hidrogênio, como *Clostridium* sp. (FORSBERG, 1987; MANGAYIL; KARP; SANTALA, 2012), *Enterobacter aerogenes* (ITO *et al.*, 2005; REUNGSANG; SITTIJUNDA; O-THONG, 2013) e *Klebsiella* sp. (CHENG *et al.*, 2007; CHOOKAEW; O-THONG; PRASERTSAN, 2014) e em metano, como *Methanosaeta* sp., *Methanosarcina* sp., *Methanobacterium* sp. e *Methanospirillum* (DINH *et al.*, 2014; LOVATO *et al.*, 2012; PHUKINGNGAM *et al.*, 2011; YANG; TSUKAHARA; SAWAYAMA, 2008).

As rotas metabólicas do processo de fermentação do glicerol já são muito conhecidas e estabelecidas, podendo ocorrer por meio da via metabólica redutora ou por via metabólica oxidativa (BIEBL *et al.*, 1999). Na via redutora, o glicerol passa por um processo de desidratação, por intermédio da enzima *glicerol desidratase*, e, posteriormente, é convertido em 3-hidroxi propionaldeído. Por fim, este composto é reduzido a 1,3-propanodiol (1,3-PD), por meio da enzima *1,3-propanediol desidrogenase*. No caso da via oxidativa, o glicerol é desidrogenado por meio da enzima *glicerol desidrogenase*, formando a dihidroxiacetona. Este composto passa por

fosforilação, por intermédio da enzima *dihidroxiacetona quinase*, sendo convertido em succinato e, posteriormente, em propionato ou piruvato. Nesta via metabólica, a depender das condições do meio e das enzimas presentes, podem ser originados compostos como lactato, butirato, acetato, etanol, hidrogênio e dióxido de carbono (BIEBL *et al.*, 1999; BIEBL, 2001; PAPANIKOLAOU *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2014). As rotas metabólicas do glicerol descritas estão representadas na Figura 6.

Figura 6 – Rotas metabólicas da fermentação do glicerol.



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

A partir da Figura 6, observa-se que, para a obtenção de metano para geração de energia no processo anaeróbico do glicerol, necessita-se da presença dos microrganismos formadores de acetato, formiato, hidrogênio e dióxido de carbono na forma do íon bicarbonato. Afinal, estes são os únicos compostos possíveis de serem diretamente convertidos a CH₄ pelas arqueias metanogênicas.

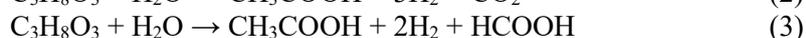
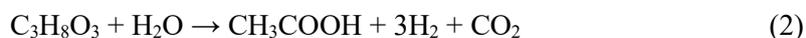
É importante ressaltar que todo esse processo pode ser inibido na presença de algum fator externo que possa interferir na degradação anaeróbia das vias metabólicas mencionadas. Este fator pode ser ambiental ou operacional, como temperatura, pH e alcalinidade, além da presença de compostos que podem ser considerados tóxicos, capazes de inibir a digestão anaeróbia do glicerol, como ácidos graxos de cadeia longa, cloretos, sulfatos e sulfetos (VIANA, 2011).

As Equações 1 a 12 descrevem a formação de diferentes metabólitos por meio da fermentação do glicerol (C₃H₈O₃).

a) Ácido propiônico (C₄H₆O₂):



b) Ácido acético (CH₃COOH) e ácido fórmico (HCOOH):



c) Ácido butírico (C₄H₈O₂):



d) Ácido láctico (C₃H₆O₃):



e) Ácido succínico (C₄H₆O₄):



f) Etanol (C₂H₆O) e ácido fórmico (HCOOH):



g) 2,3-butanodiol (C₄H₁₀O₂):



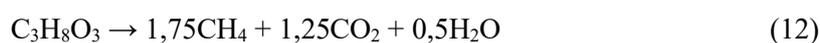
h) Butanol (C₄H₁₀O):



i) 1,3-propanodiol (C₃H₈O₂):



j) Metano (CH₄):



Analisando as equações apresentadas, verifica-se que a produção teórica máxima de hidrogênio é de 3 mol para cada mol de glicerol consumido, resultado atingido quando o acetato é o produto da fermentação. Já a produção teórica máxima de metano é de 1,75 mol para cada mol de glicerol consumido.

No decorrer dos últimos anos, uma infinidade de estudos tem sido feita, investigando a produção biológica de hidrogênio e metano a partir da digestão anaeróbia do glicerol. Tais estudos, utilizando glicerol em reatores com diferentes configurações e condições operacionais, estão apresentados, resumidamente, nas Tabelas 2 e 3.

Ito *et al.* (2005) realizaram o estudo da fermentação do glicerol bruto e glicerol puro em reatores em batelada, visando a produção de etanol, hidrogênio e outros metabólitos. O pH inicial foi de 6,8 e a temperatura foi mantida em 37 °C. Nestas condições, os autores observaram a diminuição no rendimento de hidrogênio, de 1,12 para 0,71 mol H₂.mol⁻¹_{glicerol}, à medida que aumentava a concentração de glicerol bruto de 1,7 g.L⁻¹ para 25,0 g.L⁻¹. O mesmo ocorreu com o rendimento de etanol, o qual decresceu de 0,96 para 0,56 mol EtOH.mol⁻¹_{glicerol}. Para o glicerol puro, com o aumento da concentração de 5,0 para 25,0 g.L⁻¹, o rendimento de hidrogênio decresceu de 1,05 para 0,82 mol H₂.mol⁻¹_{glicerol}, e o rendimento de etanol caiu de 1,00 para 0,80 mol EtOH.mol⁻¹_{glicerol}. Ito *et al.* (2005) também realizaram ensaios com reator contínuo de leito fixo com material suporte, utilizando glicerol bruto e glicerol puro. A concentração de glicerol utilizada foi de 10,0 g.L⁻¹, a qual apresentou produtividade volumétrica máxima de hidrogênio de 63 mmol.L⁻¹.h⁻¹ e rendimento de etanol de 0,85 mol EtOH.mol⁻¹_{glicerol}.

Lo *et al.* (2013) avaliaram a utilização de glicerol bruto e glicerol puro em reator contínuo de mistura perfeita (CSTR), para produção de hidrogênio, em temperatura mesofílica de 35 °C, pH inicial de 7,0 e concentração de glicerol de 10 g.L⁻¹. Utilizando glicerol puro como fonte de carbono, a produção média de hidrogênio foi de 103,1 ± 8,1 mL.L⁻¹.h⁻¹ e o rendimento foi de 0,50 ± 0,02 molH₂.mol⁻¹_{glicerol}. Utilizando glicerol bruto,

os autores obtiveram resultados melhores, com produção de hidrogênio de $166,0 \pm 8,7$ mL.L⁻¹.h⁻¹ e o rendimento de $0,77 \pm 0,05$ molH₂.mol⁻¹_{glicérol}.

Reungsang, Sittijunda e O-thong (2013) avaliaram a produção de hidrogênio em reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB), também utilizando glicérol puro e glicérol bruto como substratos. Houve a variação da TCO, de 25 a 75 g.L⁻¹.d⁻¹, a temperatura foi mantida em 37 °C e o pH afluente em 5,5. A TCO considerada ótima foi de 50 g.L⁻¹.d⁻¹, proporcionando a maior produtividade volumétrica de hidrogênio, de 9,0 mmolH₂.L⁻¹.h⁻¹ para glicérol puro e 6,2 mmolH₂.L⁻¹.h⁻¹ para glicérol bruto, e máximo rendimento de hidrogênio de 410 molH₂.mol⁻¹_{glicérol} para glicérol puro e 324 molH₂.mol⁻¹_{glicérol} para glicérol bruto. De acordo com os autores, os menores valores obtidos para o glicérol bruto são decorrentes das impurezas contidas nele.

Chookaew, O-thong e Prasertsan (2014) investigaram a produção de hidrogênio a partir de glicérol em reatores UASB, operados a 40 °C e pH inicial de 8,0, variando o TDH aplicado de 12 a 2 h. o glicérol foi utilizado em diferentes concentrações de 10, 20 e 30 g.L⁻¹. Os autores determinaram que o TDH ótimo foi de 4 h, no qual foi obtida a produção volumétrica máxima de hidrogênio, de 242,15 mmolH₂.L⁻¹.d⁻¹, e máximo rendimento, de 44,27 molH₂.g⁻¹_{glicérolconsumido}, para as concentrações de 30 e 10 g.L⁻¹, respectivamente. No TDH ótimo de 4h, os autores perceberam que, com o aumento da concentração de glicérol de 10, 20 e 30 g.L⁻¹, houve um aumento na produção volumétrica e, no entanto, o rendimento decaiu. O conteúdo de hidrogênio no biogás, no entanto, se manteve na média.

As taxas de produção de hidrogênio também foram estudadas por Dounavis, Ntaikou e Lyberatos (2015), em um biorreator anaeróbio de coluna ascendente (UFCB) empacotado com grânulos cerâmicos cilíndricos. A temperatura foi mantida em 35 °C, o pH foi mantido entre 6,0 e 7,0, o TDH variou de 24 a 48 h e a concentração de glicérol variou de 10,0 a 25,0 g.L⁻¹. Os autores verificaram que, com a concentração de 10,0 g.L⁻¹, no TDH de 36 h, pH igual a 6 e TCO de 8,7 g DQO.d⁻¹.L⁻¹, o reator apresentou o maior consumo de glicérol (96,1%). Na concentração de 25,0 g.L⁻¹, no TDH de 24 h, pH igual a 7 e TCO de 29,7 g DQO.d⁻¹.L⁻¹, observou-se a máxima produção volumétrica de 4,23 L.d⁻¹. Os autores verificaram que o conteúdo de hidrogênio no biogás foi levemente afetado pelas mudanças operacionais, variando entre 40,2 e 45,2%. No entanto, o rendimento de hidrogênio apresentou comportamento contrário, tendo aumentado quando a concentração de glicérol na alimentação passou de 10,0 g.L⁻¹ para 20,0 g.L⁻¹, e então sofreu redução quando o TDH aumentou de 36 a 48 h.

No que se refere à produção biológica de metano a partir da digestão anaeróbia do glicerol, alguns estudos devem ser destacados. Yang, Tsukahara e Sawayama (2008) avaliaram a digestão anaeróbia de metano em biorreatores de leito fixo com espuma de poliuretano como meio suporte. Os reatores foram operados no modo semi-contínuo, a 35 °C e 55 °C, e o TDH escolhido foi de 14 dias e a TCO variou de 0,25 a 0,70 g.L⁻¹.d⁻¹. Na condição termofílica, ao final ainda foi aplicada uma TCO de 1,00 g.L⁻¹.d⁻¹. Nos reatores mesofílicos, o pH se manteve abaixo de 7,0, enquanto nos reatores termofílicos o pH esteve em torno de 7,5. Além disso, em condições termofílicas, os reatores apresentaram melhor eficiência média de remoção de matéria orgânica, em torno de 87 %, enquanto em condições mesofílicas a eficiência foi de 50 %. A maior produção de metano foi obtida no reator termofílico, de 0,45 L CH₄.g⁻¹DQO_{aplicada} para uma TCO de 0,70 g.L⁻¹.d⁻¹. No reator mesofílico, o rendimento de metano apresentou queda com o aumento da TCO.

O estudo de Vlassis, Antonopoulou e Lyberatos (2012) objetivava a utilização de glicerol puro para a produção de metano e hidrogênio, a partir de reator CSTR operado em condições mesofílicas, a 35 °C. Sua alimentação consistiu em glicerol nas concentrações de 5,0 a 10,0 g DQO.L⁻¹, com TCO de 0,25 a 0,5 g DQO.L⁻¹.d⁻¹. O TDH estabelecido foi de 20 dias. Após a operação do reator, os autores perceberam que ele não suportou uma TCO acima de 0,25 g DQO.L⁻¹.d⁻¹, devido ao acúmulo de AGV e redução do pH. Nesta TCO, portanto, o rendimento máximo de metano atingido foi de 0,30 m³CH₄.kg⁻¹DQO_{aplicada}. Em seguida, a produção de hidrogênio foi investigada em reatores em batelada sob condições mesofílicas (35 °C). Nas primeiras etapas dos experimentos, os autores investigaram o efeito da concentração inicial de glicerol na produção de hidrogênio, variando de 8,3 a 25 g DQO.L⁻¹. Em seguida, na etapa subsequente, os autores estudaram a influência do pH sobre a produção de hidrogênio, mantendo a concentração de glicerol inicial fixa em 8,3 g DQO.L⁻¹. Neste experimento, o pH foi ajustado obtendo valores iniciais entre 4,5 e 8,0. O maior rendimento obtido foi de 22,14 mL H₂.g⁻¹DQO_{aplicada} com pH inicial de 6,5 e concentração de glicerol fixa de 8,3 g DQO.L⁻¹. Além disso, o principal metabólito obtido foi 1,3 propanodiol, também sendo detectados, em menores concentrações, os ácidos butírico e acético, bem como o etanol.

Albuquerque (2014) realizou um estudo com quatro reatores UASB, tendo como substratos glicerol puro e glicerol bruto, avaliando a produção de metano e a remoção de DQO. Foram utilizadas diferentes concentrações de DQO inicial, de 1,0 e 2,0 g DQO.L⁻¹, com temperatura ambiente e 35 °C e TDH variando entre 12 e 24 h. Os reatores UASB

foram operados em 2 fases. Na Fase 1, foram testados glicerol puro e bruto sob temperaturas diferentes, em uma TCO de $1,0 \text{ g DQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e com TDH de 24 h. Na Fase 2, a TCO foi de $2,0 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, sendo dois reatores com concentração de 1 g DQO.L^{-1} e TDH de 12 h e outros dois reatores com concentração de 2 g DQO.L^{-1} e TDH de 24 h. A Fase 1 apresentou elevadas eficiências de degradação da matéria orgânica, entre 77 e 84% de remoção de DQO, que foram acompanhadas por um acúmulo de AGV, entre 112 e $170 \text{ mg DQO}_{\text{AGV}}.\text{L}^{-1}$, após um longo período de adaptação dos microrganismos. Não foram observadas diferenças significativas entre os reatores alimentados com glicerol pura e com glicerol bruto. Com relação ao biogás, não foram constatadas diferenças estatísticas no teor médio de metano, sendo igual a 80 %, com produção máxima atingida de $0,61 \text{ mL.d}^{-1}$. Quanto ao TDH, os melhores resultados foram obtidos para o de 12 h. Além disso, os melhores resultados para o biogás foram obtidos quando houve o aumento da concentração de glicerol. No entanto, o aumento da TCO para $2 \text{ g DQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ prejudicou a remoção de matéria orgânica, caindo para 21 e 48% de eficiência, também aumentando o acúmulo de AGV, de 272 e $563 \text{ mg DQO}_{\text{AGV}}.\text{L}^{-1}$. A autora concluiu que a baixa produção de metano na Fase 1, em comparação com a Fase 2, indicou que a quantificação deste gás foi subestimada.

Tangkathitipong, Intanoo e Chavadej (2014) estudaram a produção simultânea de hidrogênio e metano a partir de águas residuais do processo de produção de biodiesel contendo glicerol, em um sistema de reatores anaeróbios em batelada sequencial (ASBR) em dois estágios, e temperatura mantida a $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$. A concentração do substrato foi mantida em $45,0 \text{ g DQO.L}^{-1}$. O sistema ASBR de dois estágios foi operado com diferentes TCO, de $33,75$ a $84,38 \text{ kg DQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ no sistema ASBR H_2 e de $5,63$ a $14,06 \text{ kg DQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ no sistema ASBR CH_4 . Para o sistema ASBR H_2 , a TCO ótima foi de $67,50 \text{ kg DQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, na qual a produtividade volumétrica máxima de hidrogênio foi de $332,54 \text{ mL H}_2.\text{L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, e a composição máxima de H_2 de 31,67 % no biogás. No ASBR CH_4 a TCO ótima foi de $11,25 \text{ kg DQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, na qual a máxima produtividade volumétrica de metano foi de $672,84 \text{ mL CH}_4.\text{L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, e a composição máxima de CH_4 de 74,76 % no biogás. No entanto, para TCOs mais elevadas, houve uma queda no desempenho na produção de H_2 e CH_4 devido à toxicidade e acúmulo AGV nos reatores. Em adição, ao considerar o sistema como fase única, a TCO de $9,64 \text{ kg DQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ foi considerada ótima, para a qual a composição máxima de H_2 e CH_4 foi de 16,65 % e 38,12 %, respectivamente, a produtividade volumétrica de H_2 de $154 \text{ mL H}_2.\text{L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e a produtividade volumétrica de CH_4 de $355 \text{ mL CH}_4.\text{L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, além dos rendimentos máximo de H_2 , de $20,43 \text{ mL H}_2.\text{g}^{-1}$

$^1\text{DQO}_{\text{aplicada}}$, e de CH_4 , de $6,11 \text{ mL CH}_4 \cdot \text{g}^{-1}\text{DQO}_{\text{aplicada}}$. Desse modo, os autores concluíram que o sistema sequencial foi mais vantajoso que a operação em fases separadas.

Boonsawang *et al.* (2014), em seu trabalho, avaliaram o processo anaeróbio em duas fases, com reator acidogênico e metanogênico, tratando águas residuárias de biodiesel contendo glicerol. Os autores investigaram os efeitos do pH, do TDH e da TCO sobre o desempenho dos reatores, sob condição mesofílica, com temperatura de $30 \text{ }^\circ\text{C}$. A água residuária afluente foi diluída para a concentração de $10,0 \text{ g DQO} \cdot \text{L}^{-1}$. No reator acidogênico, o pH ótimo, o TDH e a TCO foram 6,48, 16 h, e $26,0 \text{ g DQO} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, respectivamente. Aplicando-se essas condições experimentalmente, observou-se que uma elevada produção de AGV, de $9,35 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, foi alcançada, com baixa remoção de DQO de 41,5 %. No reator metanogênico, o valor ótimo do pH, do TDH e da TCO foram 6,95, 30 h, e $6,0 \text{ g DQO} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, respectivamente. A produção de biogás, a qual foi verificada experimentalmente, obteve resultado equivalente a $19,1 \text{ L} \cdot \text{d}^{-1}$. A remoção de DQO foi de 93,5 % e a produção de metano foi de $0,14 \text{ L CH}_4 \cdot \text{g}^{-1}\text{DQO}_{\text{removida}}$. Os AGV foram completamente consumidos. Em comparação, o sistema operado em duas fases apresentou maior eficiência, com relação à remoção de DQO, produção de biogás e produção de metano, do que o sistema de uma fase.

Sawasdee, Haosagul e Pisutpaisal (2019) utilizaram o glicerol como co substrato na fermentação anaeróbia de glicose em reatores em batelada sob condições mesofílicas e pH 7. O objetivo foi avaliar a produção de metano a partir da codigestão. Os autores variaram a relação glicerol/glicose e fixaram a DQO de $5200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. As taxas analisadas foram 10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 5:5 e 0:10. Nessas condições, o melhor rendimento foi obtido para a taxa de 5:5 glicerol/glicose, sendo $213,3 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}\text{DQO}_{\text{glicerol}}$.

Outros trabalhos, relevantes na literatura, acerca da digestão anaeróbia do glicerol estão descritos no item 3.6 sobre RALF.

Tabela 2 – Resumo da literatura sobre as condições para produção de H₂ a partir de glicerol

Reator	Temperatura (°C)	Glicerol (g.L ⁻¹)	TDH (h)	TCO (kg.m ⁻³ .d ⁻¹)	Rendimento de H ₂ (molH ₂ .mol ⁻¹ glicerol _{consumido})	Referência
Batelada	37	1,7 - 25,0	-	-	GP: 1,05 (5,0 g.L ⁻¹) GP: 1,12 (1,7 g.L ⁻¹)	Ito <i>et al.</i> (2005)
Leito fixo	37	10,0	0 - 0,67	0 - 358	-	Ito <i>et al.</i> (2005)
CSTR	35	10,0	12	20	GP: 0,50 GB: 0,77	Lo <i>et al.</i> (2013)
UASB	37	25	12	30	GP: 0,41 GB: 0,32	Reungsang, Sittijunda e O-thong (2013)
UASB	40	10, 20 e 30	12 - 2	20 - 360	4,08 (4h)	Chookaew, O-thong e Prasertsan (2014)
UFCB	35	10, 15, 20 e 25	24 - 48	8,7 - 29,7	0,50 (25 g.L ⁻¹ ; 24h)	Dounavis, Ntaikou e Lyberatos (2015)

CSTR: *Continuous Stirred Tank Reactor*; UASB: *Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor*; UFCB: *Anaerobic Upflow Column Bioreactor*; GP: glicerol puro; GB: glicerol bruto.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 3 – Resumo da literatura sobre as condições para produção de CH₄ a partir de glicerol

Reator	Temperatura (°C)	Glicerol (g.L ⁻¹)	TDH (h)	TCO (kg.m ⁻³ .d ⁻¹)	Rendimento de CH ₄ (m ³ .kg ⁻¹ DQO _{aplicada})	Referência
Leito fixo	35	3,5 - 9,8	336	0,25 - 0,70	0,370 (TCO=0,25)	Yang, Tsukahara e Sawayama (2008)
	55	3,5 - 14,0		0,25 - 1,00	0,451 (TCO=0,70)	
CSTR	35	5 - 10	480	0,25 - 0,50	0,3 (TCO=0,25)	Vlassis, Antonopoulou e Lyberatos (2012)
UASB	Ambiente (16 - 37) e 35	1 - 2	12 e 24	1 e 2	-	Albuquerque (2014)
ASBR _{fase única}	37	45	-	4,82 - 12,05	6,11x10 ⁻³ (TCO=9,64)	Tangkathitipong, Intanoo e Chavadej (2014)
ASBR _{duas fases}			-	5,63 - 14,06	-	
RCH ₄ fase única	30	-	-	8,8	0,143 (TCO=6,10)	Boonsawang <i>et al.</i> (2014)
RCH ₄ duas fases			-	4,0 - 8,0	0,190 (TCO=4,00)	
Batelada	37	2,6	-	-	0,21	Sawasdee, Haosagul e Pisutpaisal (2019)

CSTR: *Continuous Stirred Tank Reactor*; UASB: *Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor*; ASBR: *Anaerobic Sequencing Batch Reactor*; RCH₄: Reator metanogênico.

Fonte: Autoria própria.

3.5 Codigestão

Codigestão anaeróbia consiste na digestão de uma mistura de dois ou mais substratos de características complementares. A realização da codigestão em tratamentos de águas residuárias se justifica na necessidade de fornecimento de determinados nutrientes, para compensar a falta ou o excesso de algum deles no processo, além da possibilidade de evitar a inibição da metanogênese e de otimizar a produção de biogás (MATA-ALVAREZ *et al.*, 2011).

Dessa forma, o uso da codigestão pode ser fundamentado em alguns fatores como a possibilidade de tratar resíduos que são complexos de se tratar individualmente; a diluição de substâncias tóxicas que possam ser inibitórias para o processo; a otimização do processo para produção de biocombustíveis; a possibilidade de efeitos sinérgicos sobre a biomassa; a facilidade no controle de condições como o pH; além da otimização da relação carboidrato:proteína (GIOANNIS *et al.*, 2013).

No caso da codigestão de glicerol e esgoto sanitário, o primeiro contribui para o aumento da carga orgânica biodegradável, enquanto o segundo contribui com a parcela de nutrientes necessária para o desenvolvimento dos microrganismos no reator. Desse modo, a carga orgânica da mistura que passará pelo processo de digestão anaeróbia dependerá das proporções utilizadas de cada substrato. É importante ressaltar que, de modo geral, em função de suas características, os valores de DQO do glicerol em relação ao esgoto sanitário são muito mais elevados, o que pode causar efeitos variados conforme a TCO aplicada. Sendo assim, nos casos em que a concentração do glicerol é muito maior, espera-se que o esgoto exerça o papel de diluente na mistura.

Com relação aos trabalhos referentes à codigestão, percebe-se que a literatura atual ainda apresenta poucos estudos investigando a produção de H₂ e CH₄ tendo glicerol e esgoto sanitário como cossustratos. Nota-se a ausência de trabalhos desta codigestão em reatores de leito fluidizado.

Neste sentido, Prakash *et al.* (2018) avaliaram a produção de hidrogênio a partir da codigestão de esgoto doméstico e glicerol bruto. *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus thuringiensis* foram isolados em laboratório e adicionados a um caldo nutritivo, que também continha 2% de glicerol bruto. A cultura foi utilizada como inóculo posteriormente. Como material suporte para imobilização das bactérias, foram utilizados cartuchos de coco seco embalados em tubos de PVC. Cultura livre de material suporte foi utilizada como controle. Inicialmente, os autores utilizaram reatores em batelada. Os

reatores foram mantidos a 37 °C e pH 7,0, com adição de NaOH ou HCl, durante 5 dias. Amostras de gases eram coletadas diariamente. Em seguida, utilizaram reatores contínuos com TDH de 2 dias, mantidos a 37 °C, durante 60 dias. O efluente gerado no processo de digestão contínua foi posteriormente diluído com o esgoto doméstico, em diferentes proporções, e sua produção de gás H₂ foi observada por mais 60 dias. Como resultado, nos reatores em batelada, Prakash *et al.* (2018) observaram uma produção de 55 a 110 L H₂.L⁻¹ CG pela cultura de *Bacillus thuringiensis*, e de 70 a 100 L H₂.L⁻¹ CG pela cultura de *Bacillus amyloliquefaciens*, com 56,2 – 70,2 % e 58,3 – 60 % de gás H₂ produzido, respectivamente. Nos reatores contínuos sem material suporte, a produção de gás foi decrescente, chegando a zero a partir do 30º dia. Enquanto o efeito do uso de material suporte pôde ser claramente observado para as duas culturas; quanto maior a porcentagem de cartuchos de coco (0, 5, 10, 15%) maior a produção de H₂. Ao observar o efluente reciclado por mais 60 dias, os autores observaram uma queda na produção de gás para as duas culturas.

No caso de Ayabe (2018), foram realizados estudos acerca da produção de CH₄ a partir da codigestão de glicerol residual e esgoto sanitário em reatores UASB. O glicerol utilizado foi coletado na indústria Biobrotas Oleoquímica e o esgoto sanitário foi obtido de um coletor de esgoto na Universidade de São Paulo em São Carlos. Lodo de reator UASB para tratamento de efluente de abatedouro de aves foi utilizado como inóculo. O reator foi operado em condições mesofílicas, a 25 °C, de maneira contínua, com TDH de 8 horas, por 280 dias. O experimento foi dividido em seis fases, diferenciadas pela concentração de glicerol utilizada na alimentação do reator, sendo a carga orgânica volumétrica (COV) aumentada progressivamente ao longo das fases, de 1,74 a 6,92 kg DQO.m⁻³.d⁻¹. A eficiência na remoção de DQO observada foi maior para maiores valores de COV aplicada. Na sexta e última fase do reator, foi observada uma queda na produção do biogás devido à sobrecarga orgânica, demonstrando o colapso do reator. Ou seja, o processo foi estável até COV de 5,68 kgDQO.m⁻³.d⁻¹, atingindo eficiência de remoção de matéria orgânica de 85 % e porcentagem de metano no biogás de 95%. Com aplicação de 6,92 kgDQO.m⁻³.d⁻¹, o reator apresentou instabilidade na produção de biogás, na remoção de matéria orgânica e no pH, indicando sobrecarga orgânica. Assim, os resultados obtidos por Ayabe (2018) mostram que a adição de glicerol ao afluente de reator UASB tratando esgoto sanitário é adequada para o aumento da produção de metano.

Assim como Ayabe (2018), Garcia (2019) também estudou a produção de CH₄ a partir da codigestão de glicerol residual com esgoto sanitário em reatores UASB híbridos

(parte da biomassa imobilizada e parte suspensa). Garcia (2019) também manteve o TDH constante de 8 horas, em condições mesofílicas, variando progressivamente a concentração aplicada de glicerol no afluente. O trabalho foi dividido em duas partes, sendo a primeira operação com esgoto sanitário bruto em reator único, e a segunda com esgoto sanitário tratado como efluente de reator UASB, com dois reatores metanogênicos. Nas etapas seguintes, foi adicionado glicerol, aumentando a TCO afluente progressivamente, na alimentação dos reatores. A autora observou que, na primeira parte de operação, o reator híbrido não apresentou bom desempenho, com baixa produção de biogás e queda de pH, sendo levado ao colapso, com TCO de $2,2 \pm 0,81 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$. Já na operação em duas fases, o desempenho foi melhor, com TCO limitante de $2,48 \pm 0,19 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$. Com relação à eficiência de remoção de DQO, a melhor fase também foi relativa à operação com dois reatores metanogênicos, com $77 \pm 12 \%$ de remoção de matéria orgânica. Nessas condições, o rendimento de CH_4 foi de $75 \pm 68 \text{ mL CH}_4.\text{g}^{-1}\text{DQO}_{\text{removida}}$, com teor de 92 % de metano no biogás. Nesse estudo específico, a produção de biogás foi abaixo da esperada (a produção teórica é de $350 \text{ mL CH}_4.\text{g}^{-1}\text{DQO}_{\text{removida}}$). Tal valor abaixo do esperado pode ter ocorrido devido a vazamentos de gás e metano dissolvido no efluente.

Rodrigues *et al.* (2020) estudaram a produção de hidrogênio a partir da codigestão de glicerol bruto e esgoto sanitário em reatores anaeróbios operados em bateladas sequenciais, em condições mesofílicas (30 °C) e pH inicial de 7,0, por 55 h. Foram sete ensaios com o aumento da carga de glicerol (20, 40, 60, 80, 160, 240 e 320 g DQO.L⁻¹). O inóculo (consórcio de microrganismos) utilizado foi lodo advindo de reatores UASB para tratamento de resíduos de um abatedouro de aves e passou por um tratamento térmico para inibir a atividade metanogênica e, conseqüentemente, o consumo de H₂. O glicerol bruto, obtido da produção de biodiesel através da transesterificação de resíduos de óleo de cozinha, continha 1961,33 g DQO.L⁻¹ e era composto por 15,84 % de metanol, 23,38 % de sabão, 3,04 % de cinzas e 10,41 % de glicerol. A composição do esgoto sanitário era de 0,55 mg.L⁻¹ de SST, 0,372 g DQO.L⁻¹, 23,70 mg.L⁻¹ de amônia, 1,60 mg.L⁻¹ de nitrato, 5,90 mg.L⁻¹ de fósforo e pH de 6,90. Conforme Rodrigues *et al.* (2020), o aumento nas concentrações de glicerol causou uma mudança na rota metabólica, favorecendo a produção de acetato e 1,3-propanodiol. Esse aumento nas concentrações de glicerol também causou um aumento nas concentrações de impurezas advindas desse substrato, como o metanol, interferindo na rota de produção de H₂, diminuindo seus rendimentos. Vale ressaltar que existem estudos anteriores utilizando o glicerol puro; no entanto, esse

detalhe torna o processo mais caro. Por fim, a maior taxa de produção de H_2 foi de 35,82 mmol $H_2.L^{-1}$ a partir da mistura de 240 g DQO. L^{-1} de glicerol e esgoto sanitário, com consumo de 63,9 % de glicerol ao final do processo. Ou seja, a codigestão facilitou o consumo desse resíduo tóxico, a fim de gerar produtos de valor agregado.

Adames (2022) realizou o estudo da codigestão de esgoto sanitário e glicerol bruto em reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (RAHLF). O trabalho tinha como objetivo analisar o efeito do aumento da concentração de glicerol no afluente, segundo as proporções de 1,5 %, 2 % e 3 %. O autor realizou o processo de digestão anaeróbia em reatores sequenciais, objetivando a produção de hidrogênio, a partir da fermentação, e de metano, a partir da metanogênese. Com o aumento da concentração de glicerol bruto nos reatores, o autor descreve uma seleção na microbiota e nas rotas metabólicas, gerando predominância na produção de ácido propiônico e 1,3-propanodiol. Dessa forma, ao utilizar a proporção máxima de 3 % de glicerol, a elevada produção de ácidos inibiu a produção de biogás. Portanto, a adição de 1,5 % de glicerol foi responsável por produzir os melhores resultados para biogás. O autor registrou a produção de 44,70 L $H_2.m^{-3}.d^{-1}$, com média de 16,32 % de hidrogênio no biogás produzido, e 92,16 L $CH_4.m^{-3}.d^{-1}$. Com média de 63,30 % de metano no biogás.

Por fim, Logan *et al.* (2023) realizou um estudo em reatores UASB, contendo água residuária sintética e glicerol. Os reatores funcionaram com temperatura de 37 °C. O estudo teve como objetivo principal analisar a produção de metano a partir da digestão anaeróbia e investigar a biorremediação do selênio (Se) em águas residuárias. Por esse motivo, os autores realizaram o estudo em três fases, sendo a primeira para adaptação do substrato, a segunda para adição e análise do selênio e a terceira, que também analisou o efeito do Se, mas realizada em batelada. Na fase inicial, que trata apenas da água residuária sintética e do glicerol, os autores trabalharam com TCO de 1,5 g DQO. $L^{-1}.d^{-1}$ e tempo de detenção hidráulica de 48 h. Os resultados obtidos, mostram uma remoção de matéria orgânica de 98 %, com pH mantido acima de 7,5. Além disso, o rendimento de metano médio foi de 200 mL. $g^{-1}DQO$. Com relação ao selênio na codigestão anaeróbia de glicerol e água residuária sintética, cerca de 80 a 90 % do selênio solúvel foi removido. No entanto, ao longo da operação, o selênio se mostrou inibitório ao processo de metanogênese, causando alterações nas arqueias metanogênicas, reduzindo a eficiência na remoção de matéria orgânica e induzindo ao acúmulo de ácidos graxos.

Na Tabela 4 estão, resumidamente, as características principais dos trabalhos, envolvendo a codigestão de esgoto sanitário e glicerol, citados ao longo deste tópico.

Tabela 4 – Resumo da literatura sobre as condições para produção de H₂ e CH₄ a partir de esgoto sanitário e glicerol

Reator	Temperatura (°C)	TDH (h)	TCO (kg DQO.m ⁻³ .d ⁻¹)	Biogás	Produção de biogás	Rendimento na produção de biogás	Referência
Batelada	37	-	-	Hidrogênio	-	0,40 - 044 mol H ₂ .mol ⁻¹ Glicerol	Prakash <i>et al.</i> (2018)
Contínuo	37	48h	-	Hidrogênio	2,4 - 3,0 LH ₂ .L ⁻¹ .d ⁻¹	0,53 - 063 mol H ₂ .mol ⁻¹ Glicerol	Prakash <i>et al.</i> (2018)
UASB	25	8h	5,68	Metano	2,66 LCH ₄ .d ⁻¹	66,64 mL CH ₄ .g ⁻¹ DQO _{removida}	Ayabe (2018)
UASB híbrido	25	8h	2,09	Metano	126 mLCH ₄ .L ⁻¹ .d ⁻¹	75 mL CH ₄ .g ⁻¹ DQO _{removida}	Garcia (2019)
Batelada	30	-	-	Hidrogênio	35,82 mmolH ₂ .L ⁻¹	0,74 mol H ₂ .mol ⁻¹ Glicerol	Rodrigues <i>et al.</i> (2020)
RAHLF	37	24	18,06	Hidrogênio	44,70 L CH ₄ .m ⁻³ .d ⁻¹	-	Adames (2022)
		192	3,59	Metano	92,16 L CH ₄ .m ⁻³ .d ⁻¹	-	
UASB	37	48	1,5	Metano	-	200 mL CH ₄ .g ⁻¹ DQO _{removida}	Logan <i>et al.</i> (2023)

UASB: *Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor*; RAHLF: Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo.

Fonte: Autoria própria.

3.6 RALF

O reator anaeróbio de leito fluidificado (RALF) foi desenvolvido por Switzenbaum e Jewell (1978) na década de 70, na *Cornell University* - EUA. De acordo com Campos e Pereira (1999), o objetivo do reator era tratar águas residuárias, visando o aumento da retenção de biomassa e, ao mesmo tempo, diminuindo os problemas de colmatação que ocorriam em reatores de leito fixo pelo acúmulo de materiais sólidos nos interstícios.

Por definição, o RALF é um reator vertical e de fluxo ascendente, cuja velocidade, criada pelas taxas de escoamento de alimentação e recirculação, deve promover a suspensão das partículas do leito, sem que ocorra seu arraste pelo efluente, retendo grandes quantidades de biomassa. A separação de sólido, líquido e biogás ocorre por meio de um separador trifásico no topo do reator (BARROS, 2009). Dessa forma, o efluente que será tratado passa pelo “recheio” de biofilme, o que permite que ocorra a degradação biológica da matéria orgânica presente (NICIURA, 2005).

Assim, de modo geral, o RALF trata de um sistema baseado no desenvolvimento da biomassa anaeróbia sobre partículas inertes que compõem o denominado material suporte, fluidizado pela velocidade ascensional do líquido (METCALF; EDDY, 2016). É no material suporte inerte onde os microrganismos se desenvolvem e permanecem aderidos. Este conjunto (material suporte e microrganismos) mantém-se suspenso graças ao movimento ascendente da massa líquida (CAMPOS; PEREIRA, 1999). Os materiais utilizados como meio suporte devem apresentar uma superfície específica para a adesão da biomassa. São, em sua maioria, grãos de diâmetro pequeno, de 0,2 a 10,0 mm (NICIURA, 2005). São exemplos, materiais granulares como argila calcinada, xisto expandido, carvão ativado, pneu triturado e materiais arenosos (CHERNICHARO, 1997).

Esse tipo de configuração de reator apresenta algumas vantagens como o contato máximo garantido entre meio suporte e líquido, o acúmulo de elevadas concentrações de biomassa aderida ao meio suporte, a menor área necessária, possibilidade de aplicação de taxas de carregamento orgânico mais elevadas e tempos de detenção hidráulica baixos, a recirculação do líquido que possibilita uma boa mistura, e a alta velocidade de agitação da fase líquida que favorece o desprendimento do biogás, são alguns dos fatores que contribuem para a eficiência do reator de leito fluidificado (MENEZES; SILVA, 2019; WU; LIN; CHANG, 2003).

O Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos – Universidade de São Paulo (EESC – USP) e o Laboratório de controle Ambiental II (LCA II) da Universidade Federal de São Carlos (UFscar) têm realizado importantes trabalhos envolvendo a tecnologia do RALF. As pesquisas com reatores anaeróbios de leito fluidificado envolvem desde o tratamento de águas residuárias (MENDONÇA, 2004; NICIURA, 2005) até a produção anaeróbia de biogás (AMORIM *et al.*, 2009; MENEZES; SILVA, 2019; WU; LIN; CHANG, 2003; ZHANG *et al.*, 2007;).

No que concerne a aplicação de reatores anaeróbios de leito fluidificado visando o tratamento de esgoto sanitário no Brasil, as pesquisas foram pioneiras na década de 1980, as quais contribuíram para o desenvolvimento inicial da tecnologia. Os trabalhos em RALF com esgoto estão apresentados, de maneira resumida, na Tabela 5.

Tabela 5 – Trabalhos realizados com esgoto em Reator de Leito Fluidificado

Volume do reator	Escala	Despejo	Leito do reator	TDH (h)	Referência
10,5 L	bancada	esgoto sintético	areia	1,5 a 1,0	Maragno (1988)
9,5 L	bancada	esgoto sintético	areia	2 a 1,4	Barros (1989)
9,5 L	bancada	esgoto sintético	areia	1,5 a 5,2	Campos (1989)
9,5 L	bancada	esgoto sintético	areia	7 a 1,5	Vieira (1989)
10,9 L	bancada	esgoto sintético	areia	5,2 a 1,4	Therezo (1993)
20 L	bancada	esgoto sintético	areia	12 a 2,4	Cuba Teran (1995)
20 L	bancada	esgoto sintético	areia	12 a 3,2	Araújo (1995)
32 m ³	plena	esgoto sanitário	CAG	7 a 3,2	Mendonça (1998)
32 m ³	plena	esgoto sanitário	CAG	7 a 3,2	Pereira (2000)
32 m ³	plena	esgoto sanitário (com coagulante)	CAG	7 a 3,2	Santos (2001)
160 m ³	plena	esgoto sanitário	CAG	2,7	Mendonça (2004)
32 m ³	plena	esgoto sanitário	BPIT	3,2	Niciura (2005)
160 m ³	plena	esgoto sanitário	CAG + CA	8,8	Siman (2007)
159 m ³	plena	esgoto sanitário	CAG+CA+areia	14 a 8	Silva (2009)

CAG: carvão ativado granular; CA: carvão antracitoso; BPIT: banda de rodagem de pneus inservíveis triturada.

Fonte: Adaptado de Niciura (2005).

Dentre os estudos apresentados, destacam-se alguns, incluindo aquele desenvolvido por Campos (1989), que se aprofundou na remoção de matéria orgânica e de nitrogênio, focando nos aspectos microbiológicos do processo de digestão anaeróbia.

Araújo (1995), alguns anos depois, também obteve destaque ao estudar o desenvolvimento do biofilme de um RALF com esgoto sintético como substrato, acompanhando o crescimento e a composição da biomassa. Para isso, o autor realizou testes para determinar a atividade metanogênica específica, além de realizar medidas como a espessura do biofilme.

Foi a partir dos estudos realizados em escala de bancada que se tornou possível o desenvolvimento de pesquisas com reatores RALF em escala plena. Mendonça (1998) investigou a partida do sistema em escala plena com reator de 32 m³, estudando diversas variáveis que seriam importantes futuramente para se estabelecer uma rotina de análises para o processo de digestão anaeróbia em um RALF. Pereira (2000) realizou estudos sobre a aplicabilidade (concepção, construção e operação) do sistema em escala plena também com 32 m³ de volume, utilizando carvão ativado granular. Esses e outros estudos foram complementares e necessários para o grande avanço da aplicabilidade e da potencialidade dos reatores anaeróbios de leito fluidificado, como ele é conhecido na atualidade.

Com relação aos trabalhos envolvendo a aplicação de reatores anaeróbios de leito fluidificado para a conversão de glicerol em biogás e metabólitos solúveis, o LCA II – Ufscar também tem obtido grande destaque. Os trabalhos, do grupo de pesquisa, em RALF com glicerol estão apresentados, de maneira resumida, na Tabela 6.

Tabela 6 - Trabalhos realizados com glicerol em Reator de Leito Fluidificado

Substrato	Produção	Temperatura (°C)	TDH (h)	Referência
glicerol	H ₂ e metabólitos	55	1 a 14	Ferreira (2014)
glicerol	H ₂ e metabólitos	30	0,5 a 8	Nazareth (2015)
glicerol	H ₂ e metabólitos	30	0,76 a 9,24	Paranhos (2016)
glicerol	H ₂ e metabólitos CH ₄	55	0,5 a 8 24	Costa (2017)
glicerol	H ₂ e metabólitos CH ₄	30	0,5 a 8 24	Simões (2017)
glicerol + soro de queijo	H ₂ e metabólitos CH ₄	22 e 55	4 16 a 24	Almeida (2021)

Fonte: Autoria própria.

Ferreira (2014) avaliou a influência do tempo de detenção hidráulica (TDH) sobre a produção de H₂ a partir de glicerol no RALF termofílico. A autora variou os TDH de 1 a 14 h, e pôde perceber que, para o menor TDH aplicado (1 h), a eficiência na produção de hidrogênio foi maior. Além disso, também avaliou a formação de metabólitos como 1,3-propanodiol, etanol e ácido acético.

Nazareth (2015) também avaliou a produção de metabólitos solúveis e hidrogênio no RALF a partir de glicerol, variando o TDH de 0,5 a 8 h, em condições mesofílicas. Para a autora, a produção de H₂ apresentou maior rendimento no TDH de 4 h e os metabólitos produzidos em todas as fases foram, predominantemente, 1,3-propanodiol e ácido propiônico.

Paranhos (2016) continuou seguindo a mesma linha de estudos do grupo, procurando otimizar a produção de hidrogênio e metabólitos utilizando o glicerol como substrato em RALF, adicionando um meio de cultura mista. De acordo com a autora, a aplicação do meio de cultura não resultou em melhoria no rendimento de H₂ e etanol, mas melhorou o rendimento de 1,3-propanodiol.

Costa (2017) avaliou a produção de hidrogênio e metano por meio de glicerol com cultura mista, neste caso sob condições termofílicas, utilizando o processo de digestão anaeróbia em duas fases. No reator acidogênico, o autor obteve rendimento máximo no TDH de 1 h. Também foram produzidos metabólitos solúveis como 1,3-propanodiol,

ácido butírico, propiônico e acético. Para o reator metanogênico adaptado para receber o efluente do reator acidogênico, o autor obteve resultados elevados e próximos ao teórico.

Concomitantemente, Simões (2017) desenvolveu um trabalho que objetivava avaliar a produção de hidrogênio e metano a partir de glicerol em RALF mesofílicos. Em reator acidogênico, a autora obteve os melhores resultados para produção de H₂ no menor TDH de 0,5 h. Nele também foram produzidos metabólitos como 1,3-propanodiol, que se destacou com rendimento máximo. No reator metanogênico, a autora notou instabilidade com o aumento da carga orgânica aplicada, tendo, inclusive, observado o desequilíbrio do sistema por sobrecarga de ácidos.

O trabalho mais recente do grupo, envolvendo o RALF tratou da codigestão de glicerol e soro de queijo como substratos. Almeida (2021) realizou a digestão em duas fases, para a produção de hidrogênio e metano, analisando como a taxa de carregamento orgânico e a temperatura afetam o processo. Para tal, a autora realizou a comparação com a digestão em fase única em temperatura termofílica. Ao final dos estudos, os resultados foram favoráveis ao processo em duas etapas, sendo que tanto o reator mesofílico quanto termofílico apresentaram resultados satisfatórios.

3.6 Considerações finais

Diante do cenário energético atual e dos dados analisados, observa-se a tendência de aumento na produção de biodiesel ao longo dos próximos anos. Essa situação pode causar o acúmulo do glicerol produzido, o qual é descartado pelas indústrias produtoras deste biocombustível. O processo de purificação deste resíduo possui custo elevado, o que pode, muitas vezes, tornar inviável a sua utilização pela indústria química. Por esse motivo, a aplicação de glicerol em reatores anaeróbios tem sido amplamente estudada, e se mostra como uma opção atrativa pela possibilidade de recuperação de energia pelo biogás produzido, além de outros subprodutos de valor agregado.

Ao final da revisão da literatura, percebe-se que a ideia da aplicação da tecnologia de codigestão anaeróbia do glicerol com o esgoto sanitário com os objetivos de realizar o tratamento do efluente sanitário, reduzir o glicerol excedente no meio ambiente e realizar o aproveitamento energético para produção de metano e hidrogênio, mostra-se como uma alternativa viável, principalmente dentro do contexto do dia a dia de funcionamento das biorrefinarias e ETEs. Entretanto, poucas são as pesquisas envolvendo a codigestão deste

substrato com esgoto sanitário, mesmo com as diversas vantagens atreladas à associação destes dois efluentes.

Quanto à digestão anaeróbia em duas etapas, a implementação deste tipo de sistema, com uma fase acidogênica e outra fase metanogênica, surgiu como uma alternativa para superar a falha do balanceamento dos grupos microbianos envolvidos, podendo potencializar os resultados obtidos em cada fase do processo biológico. Seu objetivo é voltado para a produção de hidrogênio, na fase acidogênica, e de metano, na fase metanogênica, além de ser uma opção estratégica para aprimorar o tratamento do efluente a partir da melhora na degradação da matéria orgânica. Esse tipo de aplicação ainda é um desafio, que vem sendo amplamente estudado nos últimos anos. No entanto, quando se refere à codigestão em duas etapas de glicerol e esgoto sanitário, existe uma brecha na literatura.

Em adição a isso, também se percebe a lacuna existente quanto aos experimentos envolvendo a aplicação da digestão anaeróbia em reatores anaeróbios de leito fluidificado (RALF). Os estudos analisados que abrangem a codigestão de glicerol e esgoto sanitário ocorreram, predominantemente, em batelada, em reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (RAHLF) e, principalmente, em reatores anaeróbios de manta de lodo (UASB). A codigestão ainda é um obstáculo que requer estudos em diferentes configurações de reatores, por isso a escolha do RALF para este trabalho. De acordo com a literatura apresentada, o RALF se mostra como uma configuração com potencial elevado para a produção de biogás e metabólitos, principalmente devido a sua capacidade de acumular biomassa no sistema, além da elevada transferência de massa que ocorre neste sistema. Além disso, este reator apresenta bons resultados obtidos em estudos prévios, com diferentes substratos, para a produção de hidrogênio e metano em digestão em duas etapas.

Assim sendo, frente à escassez de estudos envolvendo o alcance de bioenergia (hidrogênio e metano) por meio da digestão anaeróbia, em duas etapas, do glicerol e do esgoto sanitário em reatores de leito fluidificado, este trabalho tem o objetivo de preencher esta lacuna existente, contribuindo para o desenvolvimento de pesquisas na área.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Nesta seção do trabalho estão apresentados os materiais utilizados e a metodologia empregada. Todos os estágios da pesquisa descritos foram realizados no Laboratório de Controle Ambiental II (LCA II) do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), além de análises realizadas em parceria com o Laboratório de Processos Biológicos (LPB) da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC/USP) e com o Laboratório de Engenharia Bioquímica do Instituto Mauá de Tecnologia. Desse modo, a metodologia descrita trata sobre os três reatores utilizados, o material suporte e o inóculo, os substratos, assim como as etapas de partida e operação dos reatores. Além disso, também apresenta as análises físico-químicas que foram realizadas.

4.1 Reator Anaeróbio de Leito Fluidificado

Os três reatores anaeróbios de leito fluidificado (RALF) utilizados nesta pesquisa foram confeccionados em acrílico transparente, semelhantes entre si. Os reatores possuem alturas de 151 cm, 148 cm e 151 cm, e diâmetro interno de 4,1 cm, 4,0 cm e 3,6 cm, respectivamente. Desse modo, cada reator possui volumes aproximados de 1,9 L, 1,9 L e 1,5 L, conforme descrito na Tabela 7. É importante destacar que os reatores utilizados foram desenvolvidos em um processo manual, o que justifica a ligeira diferença nas dimensões de cada um deles.

Tabela 7 – Dimensões e volumes dos reatores

Reator	Altura (cm)	Diâmetro (cm)	Volume (cm ³)	Volume (L)
RALF-CM	151	4,05	1897,5	1,9
RALF-A	148	4,00	1860,0	1,9
RALF-SM	151	3,55	1503,0	1,5

Fonte: Autoria própria.

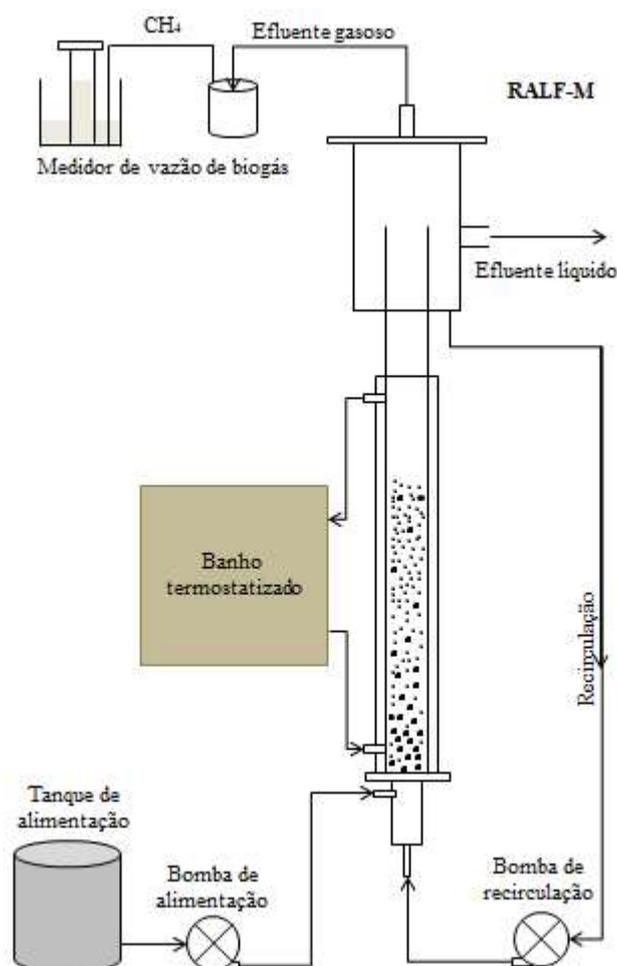
Os três reatores foram operados com temperatura na faixa mesofílica, ou seja, submetidos à temperatura 30 ± 2 °C, controlada através de um sistema de controle de temperatura por meio de banho termostático.

Para simplificação, os reatores foram nomeados da seguinte forma:

- a) RALF-CM: reator controle metanogênico, operado em fase única, utilizado com função de controle;
- b) RALF-A: reator acidogênico, operado como primeira fase e utilizado para produção de H_2 ;
- c) RALF-SM: reator sequencial metanogênico, operado como segunda fase, alimentado com efluente do RALF-A e utilizado para produção de CH_4 .

A configuração dos reatores e o esquema do aparato experimental estão representados nas Figuras 7 e 8.

Figura 7 – Reator metanogênico em fase única

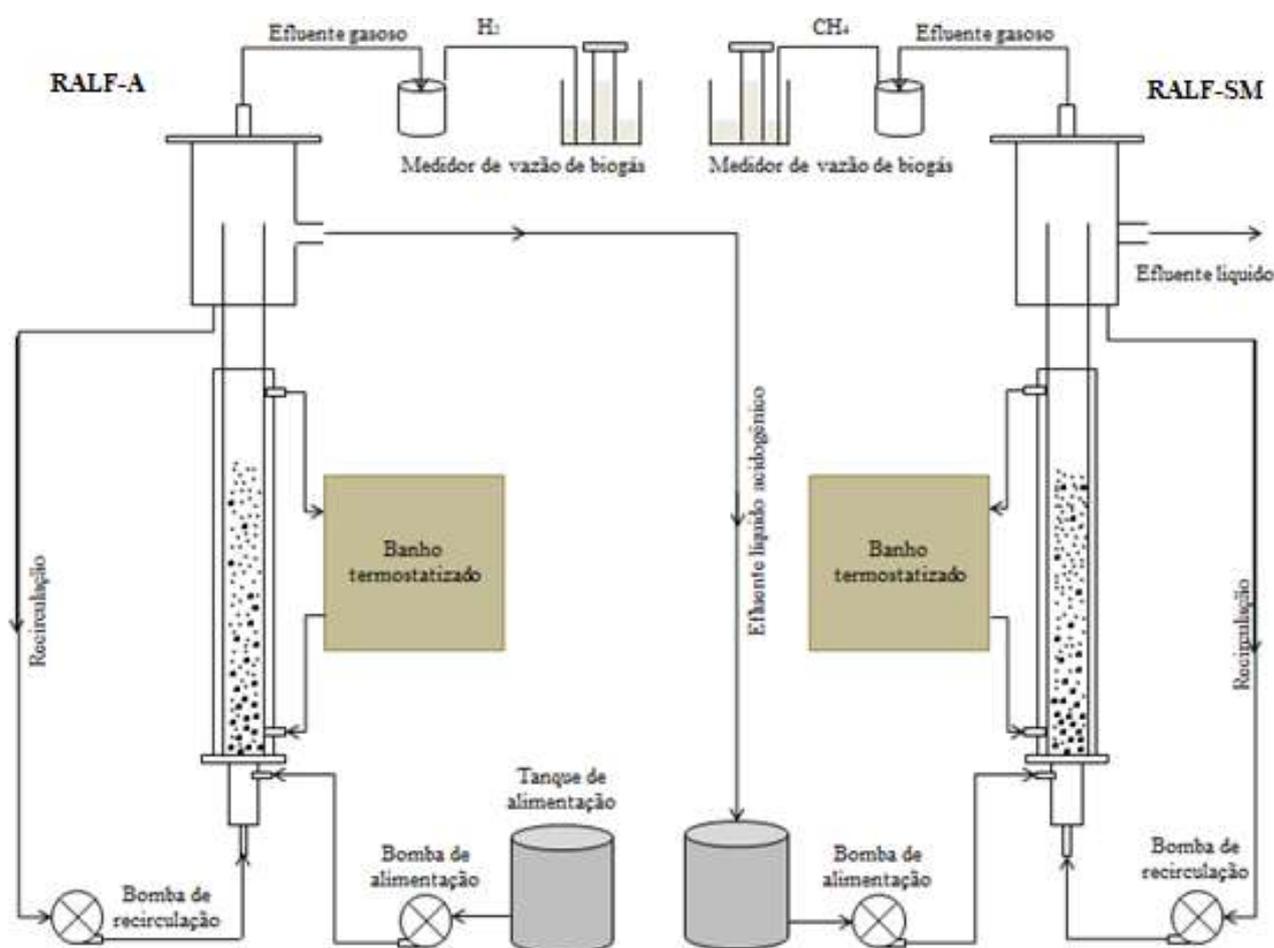


Fonte: Autoria própria.

Os reatores foram alimentados pela mistura de substratos em um barrilete (tanque de alimentação), renovado diariamente. A alimentação ocorreu de maneira ascendente,

através de uma bomba dosadora de afluente, de acordo com o tempo de detenção hidráulica de cada fase. Também foi realizada a recirculação do efluente, através de uma bomba de diafragma, com o objetivo de promover a fluidização do leito dos reatores, a qual foi ajustada uma vazão com 1,3 vezes a velocidade mínima de fluidização (vmf) (BARROS, 2009). No *headspace*, o efluente gasoso era coletado e analisado, além de ser feita a medição da vazão de biogás, enquanto o efluente líquido era coletado diariamente para análises físico-químicas. No caso do RALF-A, seu efluente era utilizado para o preparo da alimentação do RALF-SM.

Figura 8 – Reatores em duas fases: acidogênico e sequencial metanogênico



Fonte: Autoria própria.

4.2 Inóculo e material suporte

Os reatores foram inoculados com lodo granular anaeróbico de um reator anaeróbico de fluxo ascendente e manta de lodo (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket, UASB*)

destinado ao tratamento de águas residuárias de um abatedouro de aves, localizado na Avícola Dacar S/A (Tietê, SP, Brasil).

É importante destacar que, objetivando-se a produção de hidrogênio no reator acidogênico (RALF-A), a metanogênese deve ser inibida. Isso é possível submetendo-se o inóculo a um pré-tratamento térmico, conforme proposto por Kim, Han e Shin (2006). Essa técnica consiste em aquecer o lodo a 90 °C por 10 minutos e, em seguida, realizar um choque térmico por meio de banho de gelo até que se atinja a temperatura de 25 °C. Ao realizar esse procedimento, é esperado que as arqueias metanogênicas não sobrevivam à variação de temperatura, sendo eliminadas, enquanto os microrganismos responsáveis pela produção de H₂ permaneçam no meio do inóculo, sendo selecionados. Desse modo, obtém-se um inóculo propenso ao uso no reator acidogênico.

Seguindo essa lógica, objetivando-se a produção de metano, a presença de arqueias metanogênicas é necessária. Por esse motivo, o inóculo utilizado nos reatores metanogênico (RALF-M) e sequencial metanogênico (RALF-SM), que tem como objetivo a produção de metano, não foi submetido a tratamento algum.

Para a imobilização da biomassa, o material suporte utilizado nos três reatores foi pneu triturado, objeto de estudo de Niciura (2005), que se mostrou eficiente como meio suporte para a formação de biofilme. O pneu foi triturado e passou por peneira para seleção da granulometria entre 2,8 mm e 3,5 mm e densidade de 1,14 g.cm⁻³. Antes do uso, as partículas de pneu passaram por um banho de NaOH a 7,4.10⁻³ mol.L⁻¹ por aproximadamente 30 minutos. Em seguida, foram lavadas com água e secas em estufa a 40 °C. Esse processo, proposto por Barros (2009), visa eliminar os resíduos de óleo presentes no pneu. Após o tratamento, os reatores foram preenchidos em 1/3 de seu volume total com os grânulos de pneu triturado.

Na Figura 9 estão exibidas algumas partículas de pneu triturado utilizadas neste trabalho.

Figura 9 – Meio suporte e suas dimensões: pneu triturado



Fonte: Autoria própria.

4.3 Substratos

Para o presente trabalho, foram utilizados como substratos o glicerol bruto e o esgoto sanitário sintético. A glicerol utilizado, também denominado glicerina, foi coletado na Indústria Biobrotas Oleoquímica Ltda (Brotas, SP, Brasil), e suas especificações estão descritas na Tabela 8.

Tabela 8 – Caracterização do glicerol

Especificações do Glicerol	
pH	7,0 – 7,5
Teor de glicerol (%)	Mín. 99,5
Teor de água (%)	Máx. 0,5
Densidade (g.mL ⁻¹)	1,25
DQO (g.L ⁻¹)	0,93
Gravidade específica a 20 °C	1,26015
Cinzas (%)	Máx. 0,01
Teor de cloreto de sódio (%)	Máx. 0,001

Fonte: Autoria própria.

O esgoto sanitário sintético utilizado teve sua composição elaborada por Torres (1992) e continha uma proporção de 50 % de extrato de carne, 40 % de carboidratos e 10 % de lipídios. Também foram adicionados constituintes minerais normalmente encontrados no esgoto sanitário. As concentrações do substrato sintético e das soluções

de sais minerais utilizadas foram adaptadas e estão apresentadas nas Tabelas 9 e 10. Como o esgoto sanitário sintético foi preparado para manter de 500 mg DQO.L⁻¹, a composição apresentada produz 1 litro de esgoto sanitário sintético com essa concentração.

Tabela 9 – Composição do esgoto sintético

Composto orgânico		%
Proteínas	Extrato de carne	50
Carboidratos	Sacarose	40
	Amido	
	Celulose	
Lipídeos	Óleo de soja	10

Fonte: Adaptado de Torres (1992).

Tabela 10 – Composição do esgoto sintético para produção de 1 litro de meio com 500mgDQO.L⁻¹.

Componente	Quantidade	
Sacarose (mg)	38,5	
Amido (mg)	125,4	
Celulose (mg)	37,4	
Extrato de Carne (mg)	228,8	
Óleo de Soja (mg)	56,1	
NaHCO ₃ (mg)	220,0	
Detergente (gotas)	3,3	
Solução de sais (mL)	5,0	
	NaCl (mg)	250,0
	MgCl ₂ .6H ₂ O (mg)	7,0
	CaCl ₂ .2H ₂ O (mg)	4,5

Fonte: Adaptado de Torres (1992)

Sabendo-se que o esgoto sintético sofre uma degradação rápida, quando mantido em temperatura ambiente, a solução era preparada diariamente para alimentação do reator. O procedimento realizado para preparação da solução de esgoto foi dividido em etapas, com o objetivo de facilitar o processo.

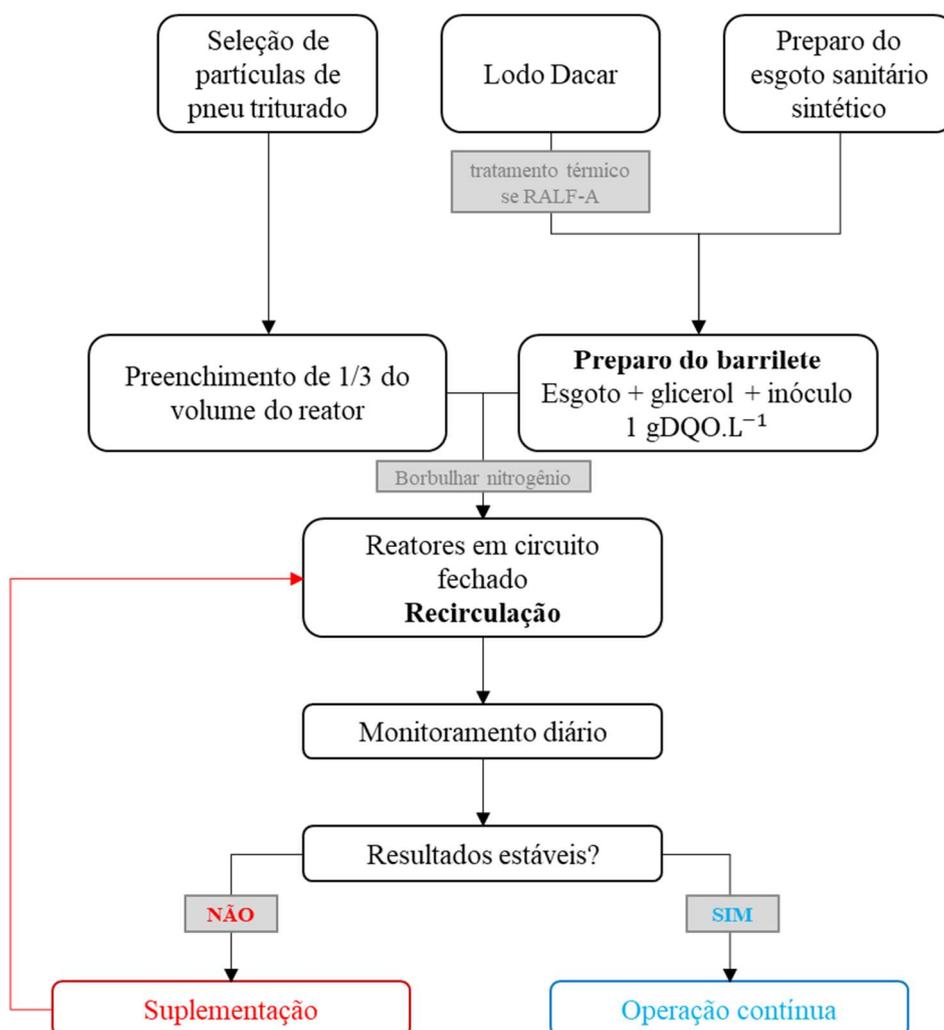
- a) Etapa 1: realizar a pesagem, em balança de precisão, de todos os componentes da solução, e separar o volume de água a ser utilizado. O detergente deve ser separado com o auxílio de um conta gotas.

- b) Etapa 2: em um béquer, misturar a sacarose, o amido e o extrato de carne com uma parte da água, previamente aquecida em banho termostático, e manter em agitação por alguns minutos. O extrato de carne é extremamente higroscópico, o que dificulta sua dissolução; a água quente facilita a mistura dele com a água, assim como o uso do agitador.
- c) Etapa 3: triturar a celulose (papel higiênico), juntamente com uma parte da água.
- d) Etapa 4: misturar em um béquer de vidro o óleo de soja e o detergente e agitar com as mãos até que se forme uma emulsão.
- e) Etapa 5: deixar uma solução de sais previamente preparada, em garrafas pet, em geladeira, para o uso diário.
- f) Etapa 6: misturar tudo (etapas 2, 3, 4 e 5) em um barrilete com o restante da água e, por último, adicionar o NaHCO_3 , para evitar que a solução forme espuma.

4.4 Operação dos reatores e condições experimentais

Inicialmente, foi realizada a inoculação dos reatores com barriletes compostos por glicerol, esgoto sanitário sintético e inóculo. Cada barrilete tinha uma concentração de $1,0 \text{ g DQO.L}^{-1}$, desses sendo $500 \text{ mg DQO.L}^{-1}$ de glicerol e $500 \text{ mg DQO.L}^{-1}$ de esgoto sintético. O inóculo foi utilizado na solução na concentração de $5 \% \text{ v.v}^{-1}$. Com o objetivo de garantir a anaerobiose do sistema e eliminar o oxigênio dissolvido no meio, gás nitrogênio foi borbulhado nos barriletes e no *headspace* dos reatores durante 10 minutos. Para viabilizar a adaptação do inóculo aos reatores, inicialmente a operação foi realizada em circuito fechado, ou seja, promovendo a recirculação do efluente, o que garantiu a adesão da biomassa ao meio suporte, além da adaptação dos microrganismos aos substratos. Nessa etapa, a concentração de matéria orgânica, o pH e a concentração de glicerol foram monitorados diariamente. Atingida a estabilidade, os reatores passaram a operar em modo contínuo. Nessa etapa, cada reator obedeceu a sua respectiva sequência de fases estabelecidas, as quais serão descritas a seguir. O procedimento de partida dos reatores está representado em modo de fluxograma na Figura 10.

Figura 10 – Fluxograma do procedimento de partida dos reatores



Fonte: Autoria própria.

A operação dos reatores e suas respectivas condições experimentais foram separadas em fases, cada qual seguindo diferentes combinações de TDH e concentração de DQO. A escolha das faixas de variação de TDH foi realizada com o objetivo de permitir a comparação entre metanogênico controle e sequencial metanogênico, além da comparação do sistema em duas fases (acidogênico – sequencial metanogênico) com o de fase única. Tais TDH foram baseados, sobretudo, nos resultados obtidos para reatores contínuos com a codigestão de esgoto sanitário e glicerol (AYABE, 2018; GARCIA, 2019) e em trabalhos já consolidados na literatura para reatores RALF com o glicerol como substrato para produção de biogás, sobretudo Simões (2017).

O RALF-CM teve sua operação dividida em seis fases. A estratégia aplicada seguiu as variações de TDH, de 8, 12, 16 e 24 h, além das variações de concentrações, de

1,0, 1,5 e 3,0 g DQO.L⁻¹. As variações nas concentrações de DQO se deram por conta da concentração do glicerol, visto que a concentração do esgoto sintético foi mantida fixa em 500 mg.DQO.L⁻¹. Na Tabela 11 estão demonstradas as condições operacionais do RALF-CM, com suas fases e respectivas TCO.

Tabela 11 – Fases operacionais do RALF-CM

Reator Controle Metanogênico – RALF-CM					
FASE	TDH (h)	DQO _{esgoto} (gDQO.L ⁻¹)	DQO _{glicerol} (gDQO.L ⁻¹)	DQO _{total} (gDQO.L ⁻¹)	TCO (gDQO.L ⁻¹ .d ⁻¹)
1	8	0,5	0,5	1,0	3,0
2	8	0,5	1,0	1,5	4,5
3	8	0,5	2,5	3,0	9,0
4	12	0,5	2,5	3,0	6,0
5	16	0,5	2,5	3,0	4,5
6	24	0,5	2,5	3,0	3,0

Fonte: Autoria própria.

A operação do RALF-A também foi dividida em fases, sendo três no total, nas quais o TDH foi mantido fixo em 2 h, havendo progressão da concentração de DQO, de 1,0, 1,5 e 3,0 g DQO.L⁻¹. Assim como no RALF-CM, as variações nas concentrações de DQO ocorreram graças à concentração de glicerol, visto que a concentração do esgoto sintético foi mantida fixa em 500 mg.DQO.L⁻¹. Na Tabela 12 estão demonstradas as condições operacionais do RALF-A, com suas fases e respectivas TCO.

Tabela 12 – Fases operacionais do RALF-A

Reator Acidogênico – RALF-A					
FASE	TDH (h)	DQO _{esgoto} (gDQO.L ⁻¹)	DQO _{glicerol} (gDQO.L ⁻¹)	DQO _{total} (gDQO.L ⁻¹)	TCO (gDQO.L ⁻¹ .d ⁻¹)
1	2	0,5	0,5	1,0	12,0
2	2	0,5	1,0	1,5	18,0
3	2	0,5	2,5	3,0	36,0

Fonte: Autoria própria.

Por sua vez, o RALF-SM foi submetido a cinco fases, nas quais a alimentação do reator ocorreu por meio do efluente acidogênico. Dessa forma, houve a variação das concentrações de DQO de acordo com a fase anterior (RALF-A). Quanto ao TDH, foram aplicadas variações de 6, 12 e 18 h. Na Tabela 13 estão demonstradas as condições operacionais do RALF-A, com suas fases e respectivas TCO.

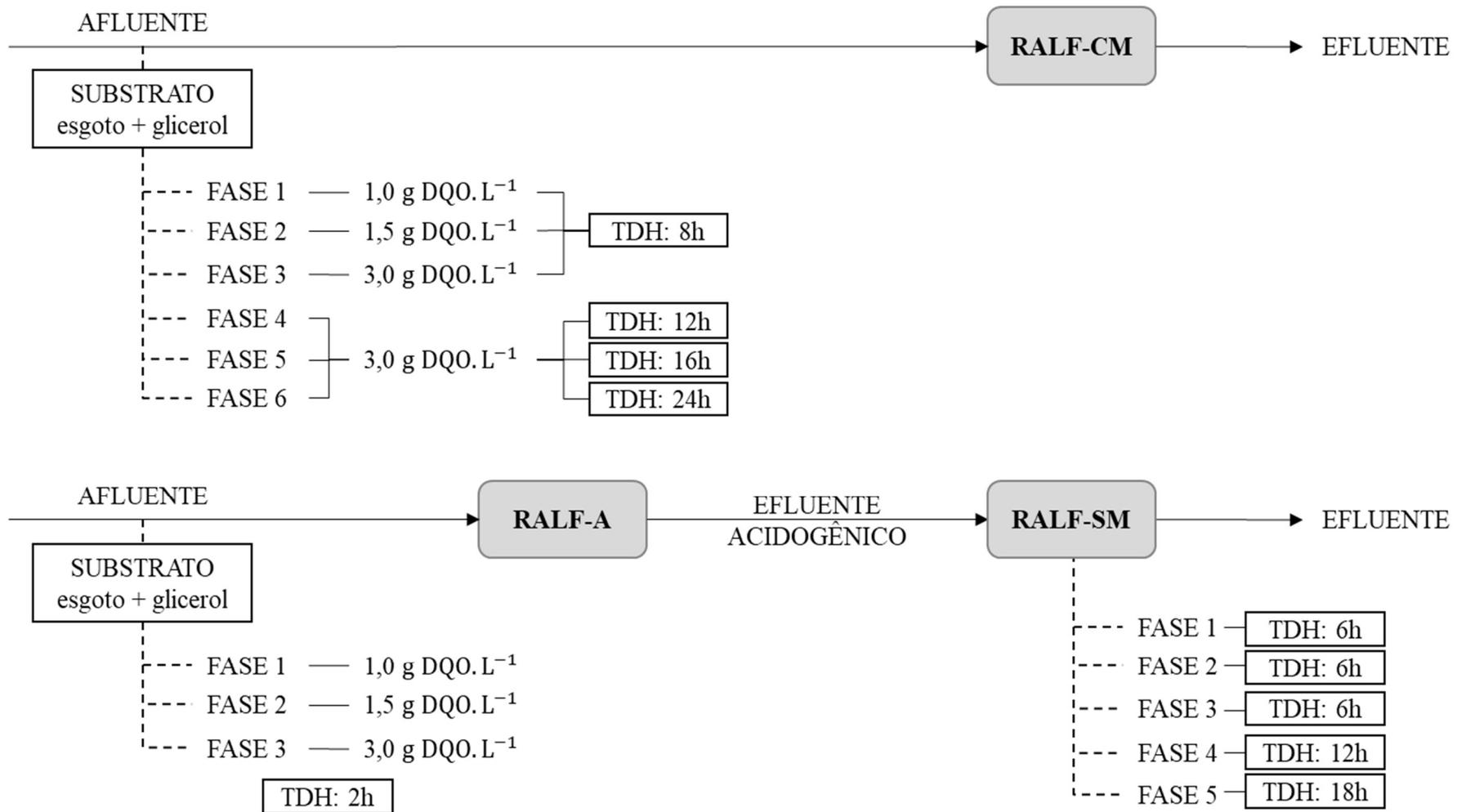
Tabela 13 – Fases operacionais do RALF-SM

Reator Sequencial Metanogênico – RALF-SM			
FASE	TDH (h)	DQO _{total} (gDQO.L ⁻¹)	TCO (gDQO.L ⁻¹ .d ⁻¹)
1	6	0,7	2,8
2	6	1,2	4,8
3	6	2,9	11,6
4	12	3,0	6,0
5	18	2,9	3,9

Fonte: Autoria própria.

Na Figura 11, está apresentado um fluxograma que explica, resumidamente, os procedimentos e condições operacionais realizados nesta pesquisa.

Figura 11 – Fluxograma experimental da operação contínua dos reatores



Fonte: Autoria própria.

4.5 Métodos Analíticos

Foram aplicados métodos analíticos com o objetivo de avaliar o desempenho dos reatores, por meio do monitoramento das amostras de afluente (coletadas na entrada), efluente (coletadas na saída), biogás e biomassa relativos a cada fase. Os parâmetros a serem analisados neste estudo, as respectivas frequências de cada um e a metodologia referente estão descritos na Tabela 14.

É importante destacar que todos os procedimentos foram realizados em triplicata, com amostras tomadas de maneira aleatória, e a média aritmética dos valores encontrados foi calculada, desprezando-se aqueles discrepantes.

Tabela 14 – Parâmetros físico-químicos, frequência amostral e metodologia das análises realizadas para monitoramento

Parâmetros	Frequência	Metodologia
DQO	3x por semana	APHA (2012)
pH	Diária	
Série de sólidos (ST, SST, SSV)	3x por semana	Ripley, Boyle e Converse (1986)
Alcalinidade	3x por semana	
Acidez volátil	3x por semana	Dilallo e Albertson (1961)
Glicerol	3x por semana	Bondioli e Della Bella (2005)
Produção volumétrica do biogás	3x por semana	Walker <i>et al.</i> (2009)
Composição de gases	3x por semana	Penteado <i>et al.</i> (2013)
Metabólitos solúveis	3x por semana	Santos <i>et al.</i> (2014)
Análise microbiana	Final de cada fase	

pH: potencial hidrogeniônico; DQO: demanda química de oxigênio.

Fonte: Autoria própria.

As análises de pH, DQO, sólidos totais (ST), sólidos suspensos totais (SST) e sólidos suspensos voláteis (SSV) seguiram a metodologia descrita no Standard Methods for Examination of Water and Wastewater da APHA (2012).

As análises de determinação de alcalinidade parcial (AP), alcalinidade intermediária (AI) e a relação AI/AP foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Ripley, Boyle e Converse (1986), a qual se baseia em titulação potenciométrica. Por sua vez, a acidez volátil (AV) seguiu a metodologia proposta por Dilallo e Albertson

(1961). Por fim, a alcalinidade total (AT) e a relação AV/AT foram calculadas a partir dos valores encontrados nas análises de alcalinidade e ácidos voláteis.

A determinação da concentração de glicerol foi realizada conforme o método proposto por Bondioli e Della Bella (2005). Segundo este método, as soluções das amostras foram preparadas e suas absorvâncias foram medidas em espectrofotômetro na região visível de 410 nm. Uma curva padrão de glicerol foi feita e as absorvâncias foram substituídas na equação gerada a partir da curva.

As coletas relativas à produção volumétrica do biogás foram feitas por meio do método proposto por Walker *et al.* (2009) de deslocamento de fluido em proveta invertida contendo solução salina acidificada.

As amostras de gás, as quais foram coletadas com o auxílio de uma seringa do tipo *gas tight* no *headspace*, tiveram a sua composição analisada por meio de cromatógrafo gasoso GC 2010 (Shimadzu®), equipado com coluna capilar Sigma-Aldrich, do modelo 24 Carboxen® 1010 Plot de 0,53 mm de diâmetro e 30 m de comprimento. O cromatógrafo possui detector de condutividade térmica para a identificação de gases H₂, N₂, CO₂ e CH₄. As seringas contendo as amostras foram injetadas no cromatógrafo e passaram pela corrida com tempo de aproximadamente seis minutos. As condições cromatográficas estão determinadas na Tabela 15.

Tabela 15 – Condições cromatográficas para análise de composição do biogás

Gás de arraste	Argônio
Temperatura do injetor	30 °C
Temperatura do detector	200 °C
Temperatura da coluna	230 °C
Fluxo do gás de arraste (Ar)	5,66 mL.min ⁻¹

Fonte: Autoria própria.

As análises para metabólitos solúveis (ácidos orgânicos e álcoois) foram realizadas seguindo o método sugerido por Santos *et al.* (2014), em cromatógrafo gasoso GC 17A (Shimadzu®), equipado com coluna capilar DB-WAX de 0,25 mm de diâmetro e 30 m de comprimento e 0,25 µm de espessura do filme. Esta análise, em específico, foi realizada com o apoio do Laboratório de Engenharia Bioquímica do Instituto Mauá de Tecnologia. As condições cromatográficas estão expostas na Tabela 16.

Tabela 16 – Condições cromatográficas para análise de metabólitos solúveis

Gás de arraste	Hidrogênio
Gás auxiliar	Nitrogênio
Fluxo do gás de arraste (H ₂)	50 mL.min ⁻¹
Temperatura do injetor	250 °C
temperatura do detector	280 °C
Razão de Split	10
Fluxo do gás auxiliar (N ₂)	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

Fonte: Autoria própria.

Por fim, para a análise da comunidade microbiana, foram coletadas amostras de biomassa dos reatores, as quais passaram por lavagem com tampão fosfato e, em seguida, foram centrifugadas a 6000 rpm. Os pellets de biomassa gerados foram mantidos em armazenamento com refrigeração a -20 °C. a partir dos pellets, fez-se a extração do DNA utilizando FastDNA SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals), seguindo os procedimentos determinados pelo próprio fabricante. Posteriormente, o DNA passa por análises microbiológicas por meio da eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE). Por fim, as amostras de DNA foram submetidas a amplificação por PCR (reação em cadeia da polimerase), para aumentar o número de cópias na biblioteca de amplicons e facilitar a detecção. Os fragmentos resultantes foram submetidos ao sequenciamento em plataforma Illumina NovaSeq6000 PE 250. Por fim, as *reads* foram mapeadas contra o banco de dados de 16S rRNA de referência.

A primeira parte da análise foi realizada com o apoio do Laboratório de Processos Biológicos (LPB) da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC/USP). O sequenciamento e o serviço de bioinformática foram realizados pela empresa ByMyCell – Genomics Made Simple (Ribeirão Preto, SP, Brasil).

Ao final de todo esse processo, foi possível realizar o sequenciamento e a identificação dos microrganismos presentes em cada reator.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção estão apresentados os resultados obtidos nesta pesquisa, referentes à operação e ao monitoramento dos reatores, seguindo os objetivos estabelecidos, como a determinação da melhor configuração dos reatores para produção de H₂ e de CH₄, considerando sua produção volumétrica e rendimento, além da degradação dos substratos em cada configuração, seja ela em fase única ou duas fases. Desse modo, os resultados serão apresentados da seguinte forma: reator controle metanogênico de fase única (RALF-CM) e, em seguida, os resultados para a configuração em duas fases, ou seja, reator acidogênico (RALF-A) e reator sequencial metanogênico (RALF-SM).

5.1 Operação em fase única: Reator Controle Metanogênico (RALF-CM)

O RALF-CM foi mantido em operação por aproximadamente 260 dias, durante os quais foi submetido a seis condições experimentais. Durante toda a operação, foram avaliados o desempenho do reator a partir da variação da TCO pelo aumento do TDH e da concentração de DQO, além dos efeitos causados na produção de metano a partir dessas variações. Os resultados foram abordados nos tópicos a seguir.

5.1.1 Desempenho do RALF-CM

As condições operacionais médias empregadas nas fases de 1 a 6, considerando pH aplicado, concentração de DQO dos substratos, os tempos de detenção hidráulica e as respectivas taxas de carregamento orgânico no RALF-CM, estão descritas na Tabela 17. A partir das condições estabelecidas e aplicadas ao reator, é possível discutir o desempenho do RALF-CM com relação às variações de pH, à remoção de DQO, à conversão do glicerol, além da análise da composição do biogás e do rendimento e da produção volumétrica de metano.

Tabela 17 – Condições operacionais aplicadas ao RALF-CM

RALF-CM				
FASE	pH	TDH (h)	DQO (gDQO.L ⁻¹)	TCO (gDQO.L ⁻¹ .d ⁻¹)
1	8,25		1,09	3,3 ± 0,3
2	7,74	8	1,68	5,1 ± 0,1
3	7,68		3,37	10,1 ± 0,4
4	7,80	12	3,48	7,0 ± 0,2
5	7,82	16	3,38	5,1 ± 0,1
6	8,29	24	3,27	3,3 ± 0,1

Fonte: Autoria própria.

A manutenção da faixa de pH adequada é de extrema importância quando se trata do processo de digestão anaeróbia. Isso ocorre pois os microrganismos que estão envolvidos nesse sistema são afetados diretamente por alterações no pH, visto que ele está relacionado com a produção de ácidos voláteis e com a alcalinidade do meio, sendo, conseqüentemente, responsável por manter o equilíbrio entre as populações ali presentes (PEREIRA; CAMPOS; MONTERANI, 2009; SOARES; FEIDEN; TAVARES, 2017). Dessa forma, buscando o desenvolvimento máximo da generalidade dos organismos envolvidos e visando a produção de metano ao final do processo, o valor de pH desejado para manter o reator metanogênico em pleno funcionamento encontra-se próximo à faixa da neutralidade (CAMPOS *et al.*, 2006). Na literatura, alguns autores apresentam variações quanto à faixa de pH ótima. Para Chernicharo (2007), a faixa de pH ideal está entre 6,5 e 8,0, muito próxima dos valores determinados por Speece (1996), entre 6,5 e 8,3. Zhu *et al.* (2008), por sua vez, indica que os melhores dados para produção de metano estão entre pH de 6,8 e 7,5. Para Van Haandel (1994), a faixa ideal de pH para sistemas anaeróbios varia de 6,3 a 7,8.

O pH do substrato utilizado na alimentação dos reatores, contendo esgoto sintético e glicerol, preparado diariamente, obteve média de 7,35. No entanto, percebeu-se ao longo da pesquisa, a necessidade de adicionar NaHCO₃ ao barrilete de alimentação, visto que os valores de pH do efluente apresentaram-se abaixo do pH desejado para o reator metanogênico (limite mínimo de 6,3). Isso pode ser explicado devido ao fato de a degradação ocorrer de maneira rápida, produzindo ácidos orgânicos inicialmente, o que pode indicar uma baixa capacidade de tamponamento do substrato.

Seguindo o que foi proposto por Mockaitis *et al.* (2006), a máxima concentração de bicarbonato de sódio afluente obedeceria a uma proporção de 50% mg NaHCO₃/mg

DQO, ou seja, para 1000 mg DQO.L⁻¹ a proporção máxima a ser utilizada seria de 500 mg NaHCO₃.L⁻¹. Já para Costa (2017), a proporção máxima de alcalinizante a ser adicionada segue a relação de 1,0 gNaHCO₃.gDQO⁻¹. Na Fase 1 foram empregados 0,38 g NaHCO₃.L⁻¹ e, à medida em que as concentrações de DQO aplicada foram aumentando, foi necessário o aumento também da quantidade de NaHCO₃. Desse modo, na Fase 2 foram adicionados 0,6 g NaHCO₃.L⁻¹. A partir da Fase 3, no entanto, os valores de pH continuaram a cair mesmo com a suplementação de bicarbonato de sódio, provavelmente por conta do aumento do acúmulo de ácidos voláteis no reator. Por esse motivo, foram adicionados 1,75 g NaHCO₃.L⁻¹, e nas Fases 4, 5 e 6 foram adicionados 1,87 g NaHCO₃.L⁻¹. Como forma de tentar minimizar o acúmulo de ácidos voláteis, o tempo de ciclo TDH também foi aumentado nas últimas três fases (de 12 a 16 e 24 h). No presente trabalho, portanto, os valores adicionados de bicarbonato de sódio variaram entre 0,35 g NaHCO₃.g DQO⁻¹_{aflu} e 0,57 g NaHCO₃.g DQO⁻¹_{aflu}.

A partir destas quantidades de NaHCO₃ acrescentadas ao substrato, foi possível controlar os valores de pH de entrada e saída, obtendo-se os valores médios de pH registrados na Tabela 16. Verifica-se, dessa forma, que a faixa de valores de pH encontrada no presente estudo, entre 7,68 e 8,29, está em concordância com a faixa definida por Speece (1996) e por Chernicharo (2007), e acima das demais referências citadas.

Castro (2018), operou um biorreator anaeróbico de leito fixo ordenado de fluxo ascendente contínuo (ABFSB) em condições mesofílicas (30 °C) no tratamento de lixiviado de aterro e glicerol. De maneira semelhante ao ocorrido ao longo deste trabalho, o autor observou a necessidade de adicionar bicarbonato de sódio ao efluente, em virtude da acidificação do sistema e consequente inibição da atividade metanogênica. Dessa forma, o Castro (2018) optou por adicionar 3,55 g NaHCO₃.g DQO⁻¹_{aflu}, ao observar a diminuição do pH para valores inferiores a 5,5, durante o início da operação do reator. Após o ocorrido, o reator mostrou-se estável para as próximas etapas, apresentando pH por volta de 8,0. Com o aumento da TCO aplicada ao reator, de 2 g DQO.L⁻¹.d⁻¹ para 11,6 g DQO.L⁻¹.d⁻¹, o pH demonstrou aumentos, apresentando valores muito superiores a 8,0, chegando em alguns casos a 9,0. Desse modo, o autor reduziu gradualmente a adição de NaHCO₃, até chegar à concentração mínima necessária de suplementação de alcalinidade de 0,28 g NaHCO₃.g DQO⁻¹_{aflu}, valor próximo ao adicionado neste trabalho de 0,36 g NaHCO₃.g DQO⁻¹_{aflu} na Fase 2, a qual apresentou maior estabilidade.

Simões (2017) operou um reator anaeróbio de leito fluidificado mesofílico (30 °C), utilizando glicerol bruto como substrato, com TDH fixo de 24 h. Em seu trabalho, o pH efluente variou de 7,94 a 8,26, apresentando uma faixa próxima à obtida neste trabalho. A autora justifica os valores de pH ligeiramente superiores a 8,00 devido à dosagem de tampão NaHCO_3 , o qual foi utilizado com o propósito de controlar os ácidos graxos voláteis no sistema e, assim, evitar a diminuição do parâmetro pH.

A adição do tampão NaHCO_3 como fonte externa de alcalinidade também se mostrou necessária no trabalho de Logan *et al.* (2023), em reatores anaeróbios de fluxo ascendente (UASB) tratando água residuária sintética – contendo acetato, lactato, glicose e solução de nutrientes – e glicerol. Os autores suplementaram, durante todas as fases, o substrato com 2 g $\text{NaHCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$. Essa suplementação foi responsável por manter o efluente na faixa de pH de 7,5 a 8,5, não havendo o acúmulo de ácidos graxos voláteis, de acordo com os autores.

Conforme observado, a suplementação de bicarbonato de sódio se faz necessária neste tipo de substrato contendo glicerol, e pode contribuir para a manutenção da estabilidade do sistema anaeróbio, demonstrando uma relação direta com o controle de pH e, conseqüentemente, com a presença de ácidos graxos voláteis. Em outras palavras, a presença de ácidos voláteis em acúmulo durante o processo sugere uma instabilidade, visto que eles possivelmente estão sendo produzidos pelos microrganismos acidogênicos em menor proporção do que estão sendo convertidos em metano.

5.1.1.1 Remoção de DQO

A remoção de matéria orgânica no RALF-CM referente a cada uma das TCO aplicadas está apresentada na Tabela 18, na qual também estão expostos os valores de DQO afluente e efluente.

Tabela 18 – Eficiência de remoção de DQO no RALF-CM

RALF-CM				
FASE	TCO (gDQO.L ⁻¹ .d ⁻¹)	DQO		Eficiência de remoção (%)
		Afluente (g.L ⁻¹)	Efluente (g.L ⁻¹)	
1	3,3	1,09 ± 0,09	0,29 ± 0,04	74
2	5,1	1,68 ± 0,05	0,42 ± 0,10	75
3	10,1	3,37 ± 0,12	1,84 ± 0,14	46
4	7,0	3,48 ± 0,08	2,12 ± 0,15	39
5	5,1	3,38 ± 0,10	2,03 ± 0,09	40
6	3,3	3,27 ± 0,06	1,28 ± 0,26	61

Fonte: Autoria própria.

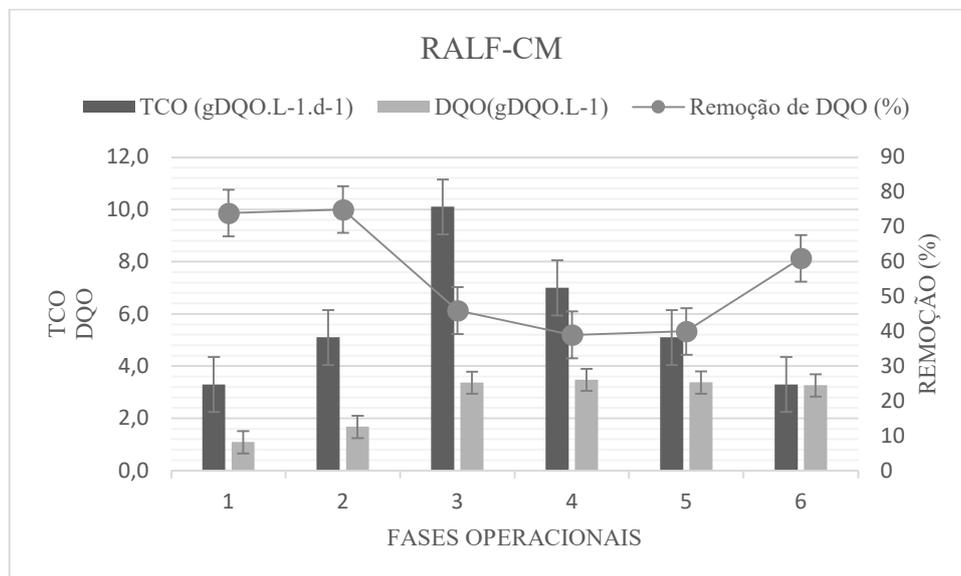
A princípio, durante as duas primeiras fases, mesmo com o incremento da DQO de 1,09 g DQO.L⁻¹ para 1,68 g DQO.L⁻¹ – o que causou o aumento da TCO de 3,3 g DQO.L⁻¹.d⁻¹ para 5,1 g DQO.L⁻¹.d⁻¹ – observa-se que a remoção de DQO se manteve estável e elevada, com valores médios de 74 % e 75 %, respectivamente. No entanto, verifica-se que o acréscimo para 10,1 g DQO.L⁻¹.d⁻¹, com o aumento da DQO para 3,37 g DQO.L⁻¹, mantendo-se o TDH em 8 h, causou uma diminuição na capacidade de remoção de matéria orgânica, cuja eficiência decresceu de 75% para 46%.

Posteriormente, houve o incremento do TDH de 8h para 12h e 16h, como tentativa de recuperar a estabilidade do reator. Entretanto, a capacidade de remoção de matéria orgânica pelo RALF-CM continuou a cair, atingindo 39 % na Fase 4. Observa-se que, mesmo que a TCO aplicada tenha sido a mesma da Fase 2 (5,1 g DQO.L⁻¹.d⁻¹), a adição de maiores quantidades de substrato ao afluente não foi suportada pelo reator com o TDH de 16 h. Com relação às diferenças entre as Fases 2 e 5, provavelmente o consórcio microbiano permaneceu por muito tempo em condições desfavoráveis, o que levou a mudanças e a um possível desbalanceamento na digestão anaeróbia.

Somente com o aumento do TDH para 24 h, durante a Fase 6, foi possível atingir uma nova estabilidade do reator, recuperando-se a capacidade de remoção de DQO para 61%. Ainda assim, comparando-se os valores iguais de TCO de 3,3 g DQO.L⁻¹.d⁻¹, nas Fases 1 e 6, entende-se que o reator não reagiu bem ao aumento da carga orgânica. Com isso, é possível aferir que, para a codigestão de esgoto sanitário e glicerol em reator de fase única, incrementos gradativos de DQO na alimentação do reator promoveram uma sobrecarga, causando desequilíbrio no meio.

Na Figura 12 encontram-se as comparações entre as TCO e DQO aplicadas em cada fase e as suas respectivas remoções de matéria orgânica.

Figura 12 – TCO aplicada, DQO afluente e remoção de DQO nas fases de 1 a 6



Fonte: Autoria própria.

Ayabe (2018), em um reator UASB metanogênico a 25 °C, alimentado com esgoto sanitário e glicerol, obteve resultados mais expressivos do que os atingidos pelo presente trabalho. Ayabe (2018) analisou o aumento da TCO, de 1,74 kg DQO.m⁻³.d⁻¹ a 6,92 kg DQO.m⁻³.d⁻¹, em um TDH fixo de 8 h. Para a carga aplicada de 5,24 kg DQO.m⁻³.d⁻¹, o reator atingiu a remoção máxima de 90 % de matéria orgânica, valor consideravelmente superior ao atingido pelo RALF-CM, de 76 % para TCO semelhante de 5,1 kg DQO.m⁻³.d⁻¹. O reator estudado por Ayabe (2018) passou a apresentar sinais de sobrecarga orgânica na TCO de 6,92 kg DQO.m⁻³.d⁻¹.

Valores médios de remoção análogos foram encontrados por Garcia (2019), ao operar um reator UASB a 25 °C, utilizando esgoto sanitário pré tratado e glicerol, com TDH de 8 h, variando a TCO aplicada de 0,72 kg DQO.m⁻³.d⁻¹ a 2,48 kg DQO.m⁻³.d⁻¹. A TCO máxima suportada pelo reator foi de 2,48 kg DQO.m⁻³.d⁻¹, apresentando 76 % de eficiência na remoção da matéria orgânica. Com a carga máxima, o sistema apresentou sinais de sobrecarga, como acúmulo de ácidos e queda de pH. Dessa forma, apesar dos resultados de remoção semelhantes, o reator do estudo suportou valores de TCO inferiores ao RALF-CM, de 5,1 kg DQO.m⁻³.d⁻¹.

Logan *et al.* (2023), em um reator UASB controle, contendo água residuária sintética (glicose, acetato e lactato) e glicerol, encontraram resultados superiores aos do RALF-CM. Operando com um TDH de 48 h, DQO aplicada de 3 g DQO.L⁻¹ e TCO de 1,5 g DQO.L⁻¹.d⁻¹, os autores atingiram valores de remoção de matéria orgânica equivalentes a 98 %. A discrepância nos resultados pode ser explicada pelo elevado tempo de detenção hidráulica aplicado no estudo de Logan *et al.* (2023). No presente trabalho, ao avaliar as remoções de DQO do RALF-CM e analisar a tendência de crescimento nas porcentagens, de 39 % para 61 %, com o aumento do TDH de 12 h para 24 h, é possível observar a influência do tempo de detenção hidráulica na eficiência do reator. Assim, o artigo dos autores citados corrobora com o fato observado no presente trabalho, de que elevados TDH contribuem para a remoção de DQO, pelo fato de permitirem um contato maior e por mais tempo entre os microrganismos e os substratos.

5.1.1.2 Conversão de glicerol

Com relação à conversão de glicerol, os valores médios das concentrações afluente e efluente e as conversões alcançadas pelo reator ao longo das fases do RALF-CM estão demonstradas na Tabela 19.

Tabela 19 – Concentrações afluente e efluente e conversão do glicerol no RALF-CM

FASE	RALF-CM		Conversão (%)
	Glicerol		
	Afluente (g.L ⁻¹)	Efluente (g.L ⁻¹)	
1	0,53 ± 0,05	0,04 ± 0,00	92,8
2	0,89 ± 0,09	0,03 ± 0,01	96,2
3	2,50 ± 0,05	0,04 ± 0,00	98,4
4	2,59 ± 0,06	0,04 ± 0,01	98,3
5	2,60 ± 0,09	0,03 ± 0,01	98,7
6	2,54 ± 0,13	0,05 ± 0,01	98,1

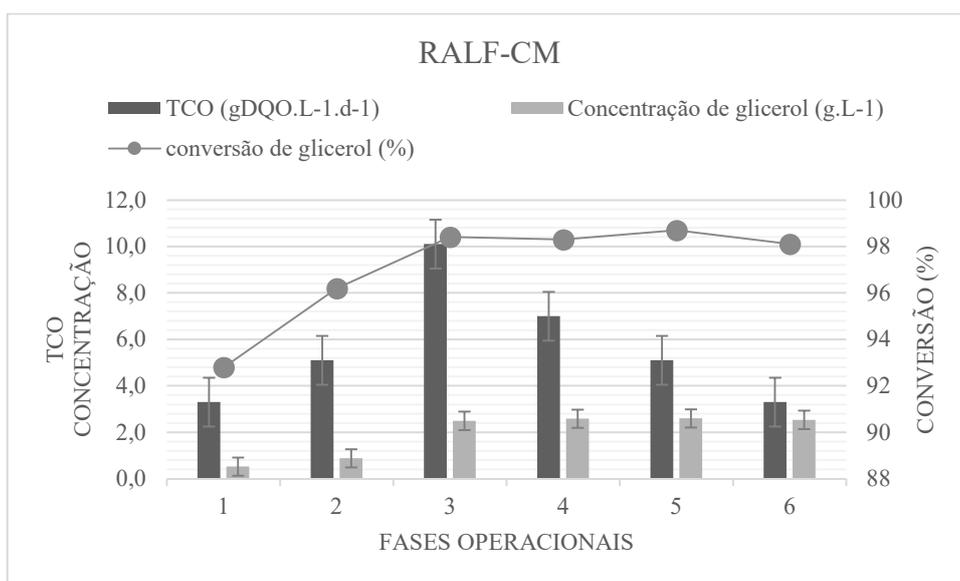
Fonte: Autoria própria.

O RALF-CM apresentou um aproveitamento elevado do glicerol adicionado à alimentação, com resultados de conversão acima de 92 % durante todas as fases. Mesmo com o aumento progressivo da carga orgânica ao longo do experimento, a remoção média do glicerol manteve-se elevada, atingindo 98,7 % com 2,60 g_{gli}.L⁻¹ afluente. Isso ocorreu

pelo fato de o glicerol utilizado apresentar boa biodegradabilidade, ou seja, ser um substrato de simples degradação para as condições a que foi submetido. Além disso, a partir da eficiência dos resultados, pode-se afirmar que houve uma adaptação favorável dos microrganismos existentes na biomassa ao meio do reator.

Na Figura 13 encontram-se as comparações entre as TCO e concentrações de glicerol aplicadas em cada fase e as suas respectivas conversões.

Figura 13 – TCO aplicada, concentração de glicerol afluyente e conversão de glicerol nas fases de 1 a 6



Fonte: Autoria própria.

As conversões de glicerol elevadas também foram discutidas em outros trabalhos da literatura, demonstrando resultados em acordo com os deste estudo. Simões (2017), utilizando RALF a 30 °C para digestão anaeróbia de glicerol e meio nutricional, verificou conversões de glicerol acima de 95 % em todas as fases. Em sua pesquisa, a autora também observou o aumento na capacidade de conversão do glicerol com o incremento da carga, de 0,95 g_{gli}.L⁻¹ afluyente na primeira fase para 6,80 g_{gli}.L⁻¹ afluyente na última fase. Para a maior concentração de glicerol aplicada, o reator apresentou conversão de 99,4 %.

Conversões elevadas de glicerol, de 95 % e 94 % também foram encontradas por Vlassis *et al.* (2013) em um reator CSTR digerindo glicerol puro contendo uma solução de nutrientes, sob condições mesofílicas (35 °C). Os resultados foram obtidos com concentrações de 5,0 g DQO.L⁻¹ e 7,5 g DQO.L⁻¹, respectivamente.

Ao contrário dos trabalhos citados e dos resultados obtidos por este estudo, Sawasdee, Haosagul e Pisutpaisal (2019) descreveram a degradação do glicerol, como único substrato, em 54 %. Os testes foram feitos em batelada, em temperatura mesofílica, com 5,2 g DQO.L⁻¹. Os mesmos autores também realizaram testes considerando a codigestão de glicerol e glicose, em proporção 1:1, obtendo uma conversão de glicerol de 40 %, enquanto a remoção da glicose superou 90 %. Neste caso é perceptível o fato de a glicose, em codigestão com o glicerol, ser um substrato mais favorável para a microbiota e mais passível de conversão em energia. Em comparação com o presente trabalho, em que foi analisada a codigestão de glicerol e esgoto sanitário, percebe-se o favorecimento do glicerol devido às elevadas conversões atingidas. Isto corrobora com o fato, citado anteriormente, de que o glicerol é um substrato com elevado poder de digestibilidade e, portanto, com potencial para gerar biogás.

5.1.1.3 Composição do biogás

Para o RALF-CM, em todas as fases, o biogás produzido foi composto por CH₄ e CO₂, indicativo do processo anaeróbico e da presença de organismos metanogênicos no reator. A composição média de metano no biogás produzido pelo RALF-CM em função da variação da TCO está exibida na Tabela 20.

Tabela 20 - Composição do biogás no RALF-CM nas fases de 1 a 6

RALF-CM		
FASE	TCO (g DQO.L ⁻¹ .d ⁻¹)	CH ₄ no biogás (%)
1	3,3	76,6
2	5,1	70,3
3	10,1	51,4
4	7,0	54,8
5	5,1	63,2
6	3,3	65,8

Fonte: Autoria própria.

Verifica-se que a Fase 1, cuja TCO aplicada foi de 3,3 g DQO.L⁻¹.d⁻¹, obteve 76,6 % de CH₄ no biogás, a porcentagem máxima de metano atingida ao longo da operação. Na Fase 2, com o aumento da TCO para 5,1 g DQO.L⁻¹.d⁻¹, constatou-se um decréscimo

na porcentagem de metano para 70,3 %. Ainda assim, apresentou-se como um valor considerado satisfatório para a composição do biogás.

Entretanto, com a aplicação da TCO máxima de 10,1 g DQO.L⁻¹.d⁻¹, foi possível verificar uma queda significativa na porcentagem de CH₄, para 51,4 %, menor valor obtido ao longo da operação. Essa diminuição foi percebida juntamente com uma queda na capacidade de remoção de matéria orgânica e com a presença de ácidos voláteis no sistema, fatos que são indícios do desequilíbrio da digestão anaeróbia pelo aumento da carga orgânica.

Conforme a TCO aplicada foi reduzida, devido ao aumento do TDH, os resultados obtidos de porcentagem de metano voltaram a crescer. Desse modo, as porcentagens verificadas para as Fases 4, 5 e 6 foram 54,8 %, 63,2 % e 65,8 %, respectivamente.

A porcentagem da composição de metano produzida a partir da digestão anaeróbia encontra-se na faixa de 50 % a 75 %, de acordo com valores usualmente encontrados na literatura (ANUKAM *et al.*, 2019). Essa informação corrobora com os resultados obtidos para o RALF-CM, que variaram de 51,4 % a 76,6 %. Isso demonstra que, mesmo nas Fases 3 e 4 que apresentaram as menores porcentagens, não obstante o reator tenha começado a apresentar sinais de desequilíbrio pelo aumento da carga aplicada nas fases citadas, a composição do biogás apresenta resultados dentro da margem aceitável.

No trabalho realizado por Boonsawang *et al.* (2014), que analisaram água residuária do biodiesel contendo glicerol no processo anaeróbio de fase única, foram obtidos 59,7 % de metano no biogás produzido pelo reator metanogênico. Os autores aplicaram uma TCO de 8,8 g DQO.L⁻¹.d⁻¹, e obtiveram uma porcentagem proporcional ao que foi encontrado nas análises do RALF-CM nas fases com TCO aplicada semelhante. Em ambos os estudos, elevados valores de TCO apresentaram menores porcentagens de CH₄.

Ayabe (2018), por sua vez, obteve resultados divergentes ao do presente estudo. Com o aumento da TCO aplicada (de 1,74 g DQO.L⁻¹.d⁻¹ a 6,92 g DQO.L⁻¹.d⁻¹), o reator produziu uma maior quantidade de biogás com predominância de metano, atingindo valores acima de 95 %, tanto quando o reator estava estável quanto instável. Esse resultado é incomum e está acima dos valores que geralmente são observados em reatores anaeróbios. O que ocorreu, neste caso, segundo o autor, foi uma provável atividade homoacetogênica no reator, quando bactérias homoacetogênicas consomem o CO₂ produzido, fato que teve papel fundamental no predomínio incomum de CH₄ no biogás. O mesmo ocorreu com Garcia (2019), em reator UASB tratando mistura de esgoto

sanitário e glicerol. A autora obteve média de 92 % de metano no biogás produzido e, em alguns momentos, não foi detectada a presença de gás carbônico. Neste estudo, Garcia (2019) também elucida a possibilidade do consumo de CO₂ por bactérias homoacetogênicas.

Takeda, Gotardo e Gomes (2020), em seu estudo envolvendo a codigestão anaeróbia de lixiviado e glicerol em batelada, obtiveram resultados de porcentagens de metano entre 65,4 % e 78,9 %, faixa próxima a do RALF-CM. Operando com um TDH de 25 dias, a melhor fase do ensaio ocorreu com concentração do substrato de 14,7 g DQO.L⁻¹, gerando biogás composto por 74,7 % de CH₄. Neste caso, é válido analisar que o TDH escolhido foi maior do que o aplicado no presente trabalho e, conseqüentemente, a TCO aplicada foi menor (cerca de 0,6 g DQO.L⁻¹.d⁻¹). Este fato pode reafirmar que menores valores de TCO apresentam maiores porcentagens de metano no biogás produzido.

5.1.1.4 Rendimento e produção volumétrica de metano no RALF-CM

O rendimento de metano específico de cada fase foi calculado a partir do volume de CH₄ produzido por unidade de massa de DQO consumida. Os resultados obtidos para rendimento de metano referente ao biogás produzido pelo RALF-CM podem ser visualizados na Tabela 21.

Tabela 21 – Rendimento de metano no RALF-CM nas fases de 1 a 6

RALF-CM		
FASE	TCO (g DQO.L ⁻¹ .d ⁻¹)	MY (mL CH ₄ .g DQO ⁻¹ _{cons})
1	3,3	167,6 ± 33,0
2	5,1	169,3 ± 25,6
3	10,1	124,3 ± 16,3
4	7,0	93,9 ± 27,5
5	5,1	0
6	3,3	116,4 ± 11,1

Fonte: Autoria própria.

Levando-se em consideração que o rendimento teórico de metano é de 350 mL CH₄.g DQO⁻¹_{cons}, sob condições normais de temperatura e pressão, todas as fases obtiveram rendimento médio abaixo do esperado.

O maior rendimento de metano verificado no RALF-CM foi de 169,3 mL CH₄.g DQO⁻¹_{cons}, ocorrido na Fase 2 com TCO de 5,1 g DQO.L⁻¹.d⁻¹ (para 1,5 g DQO.L⁻¹ e TDH de 8 h). Este primeiro acréscimo de matéria orgânica pelo glicerol no substrato (de 1,0 g DQO.L⁻¹ para 1,5 g DQO.L⁻¹) favoreceu o rendimento de metano, fato que também pode ser percebido com relação à remoção de DQO na mesma fase (75 %). A partir do próximo incremento de DQO na Fase 3 com TCO de 10,1 g DQO.L⁻¹.d⁻¹, o rendimento decaiu para 124,3 mL CH₄.g DQO⁻¹_{cons}, e, posteriormente, para 93,9 mL CH₄.g DQO⁻¹_{cons} na Fase 4.

Como consequência ao decaimento, a Fase 5 apresentou o pior resultado para produção de biogás, chegando a 0,0 no rendimento e na produção volumétrica. Embora a composição do biogás demonstrasse a existência de CH₄ e CO₂ apenas, os valores resultantes das análises no cromatógrafo gasoso não foram suficientes para quantificar o rendimento nesta fase. A Fase 5 também apresentou um dos valores mais baixos para eficiência de remoção de DQO no experimento, de 40%.

Em contrapartida, a Fase 6, que contou com o aumento do TDH para 24 h, apresentou um rendimento de 116,4 mL CH₄.g DQO⁻¹_{cons}, demonstrando que o reator voltou a se estabilizar com o maior tempo de detenção, melhora também sentida na eficiência da remoção de DQO (61%).

Tabela 22 – Produção volumétrica de metano obtida nas fases de 1 a 6 no RALF-CM

RALF-CM			
FASE	TCO (gDQO.L ⁻¹ .d ⁻¹)	PVM (mL CH ₄ .L ⁻¹ .h ⁻¹)	PVM (L CH ₄ .d ⁻¹)
1	3,3	20,2 ± 4,7	0,49
2	5,1	30,5 ± 4,4	0,73
3	10,1	22,9 ± 3,2	0,55
4	7,0	12,2 ± 1,1	0,24
5	5,1	0	0
6	3,3	15,1 ± 1,8	0,36

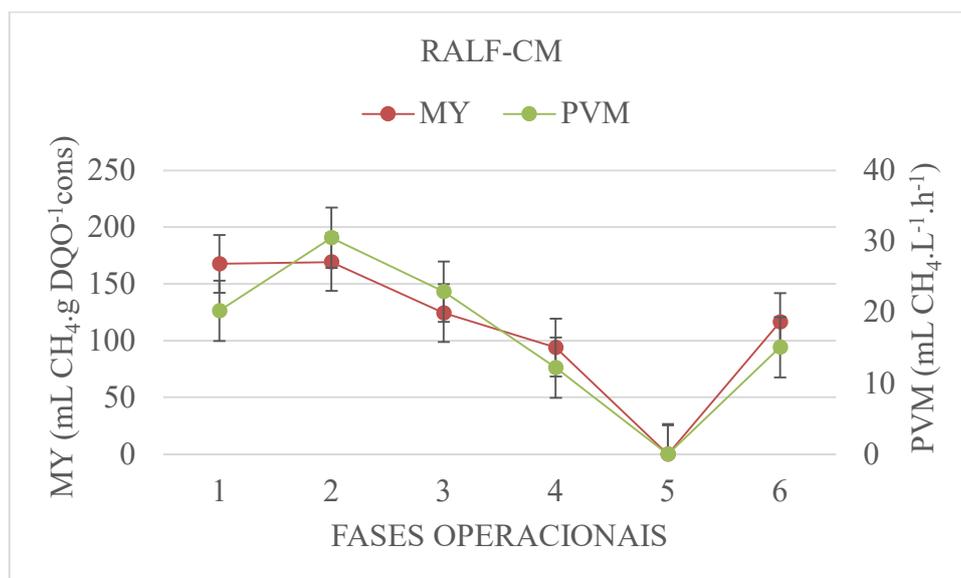
Fonte: Autoria própria.

Na Tabela 22 estão demonstrados os resultados para produção volumétrica de metano. Nela é possível perceber que a produtividade volumétrica também apresentou os

melhores resultados para a Fase 2, de $30,5 \text{ mL CH}_4 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, seguindo os resultados de melhor rendimento de metano. Pode-se perceber que a estratégia de aumentar a concentração de DQO afluente para $1,5 \text{ DQO} \cdot \text{L}^{-1}$, mantendo-se o TDH de 8h, beneficiou a produção de metano no RALF, enquanto o aumento da matéria orgânica a partir do acréscimo de glicerol acima de $3,0 \text{ DQO} \cdot \text{L}^{-1}$ comprometeu o comportamento do reator, possivelmente o levando ao colapso. Assim, o comportamento de declínio, nas Fases 4 e 5, observado a partir dos resultados de rendimento de metano, repetiu-se para a produção volumétrica, voltando a aumentar com o incremento do TDH para 24 h e consequente diminuição da TCO para $3,3 \text{ g DQO} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$.

Os resultados para comparação de rendimento e produção volumétrica de biogás para o RALF-CM estão apresentados na Figura 14.

Figura 14 – Rendimento e produção volumétrica de biogás para as fases de 1 a 6 no RALF-CM



Fonte: Autoria própria.

Em trabalho similar tratando uma mistura de esgoto sanitário e glicerol, Ayabe (2018) também apresentou resultados de rendimento de metano abaixo do teórico. Para a melhor condição de codigestão alcançada no estudo, com TCO de $5,68 \text{ g DQO} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, o autor obteve rendimento de $66,64 \text{ mL CH}_4 \cdot \text{g DQO}^{-1} \cdot \text{cons}$, valor consideravelmente abaixo do obtido pelo RALF-CM na Fase 2 ($169,3 \text{ mL CH}_4 \cdot \text{g DQO}^{-1} \cdot \text{cons}$), em condições aproximadas.

O mesmo foi observado por Garcia (2019), também trabalhando com esgoto sanitário e glicerol. Os melhores resultados, referentes à TCO de 2,09 g DQO.L⁻¹.d⁻¹, indicavam rendimento de metano de 75 mL CH₄.g DQO⁻¹_{cons} e produção volumétrica de 126 mL CH₄.L⁻¹.d⁻¹. Ambos os resultados também estão abaixo dos encontrados para o RALF-CM na Fase 1 (rendimento de 167,6 mL CH₄.g DQO⁻¹_{cons} e produção volumétrica de 484,8 mL CH₄.L⁻¹.d⁻¹), com valor de TCO e TDH semelhantes.

Os baixos valores observados nos três estudos envolvendo os mesmos cossustratos podem indicar que houve perda de metano dissolvido no efluente do reator. Isso ocorre por se tratar de uma água residuária diluída. Segundo Lobato, Chernicharo e Souza (2012), o esgoto sanitário pode apresentar uma elevada fração de metano dissolvida quando é submetido a um processo de tratamento anaeróbio, sendo que a porcentagem de CH₄ dissolvido perdido em reatores UASB pode variar de 22 % a 46 %. Entretanto, em reatores RALF, que possuem um elevado nível de agitação devido à fluidização, essa talvez não seja a justificativa para os resultados abaixo do teórico.

5.2 Operação em duas fases: Reator Acidogênico (RALF-A)

O RALF-A foi mantido em operação por aproximadamente 170 dias, durante os quais foi submetido a três condições experimentais. Durante toda a operação, foram avaliados o desempenho do reator a partir da variação da TCO pelo aumento da concentração, visto que o TDH se manteve constante em 2 h. Também foram avaliados os efeitos causados na produção de hidrogênio a partir dessa variação. Os resultados foram abordados nos tópicos a seguir.

5.2.1 Desempenho do RALF-A

As condições operacionais médias empregadas nas fases de 1 a 3 no RALF-A, considerando o pH aplicado, a concentração de DQO dos substratos e as respectivas taxas de carregamento orgânico, estão descritas na Tabela 23.

Tabela 23 – Condições operacionais aplicadas ao RALF-A

RALF-A			
FASE	pH	DQO (gDQO.L ⁻¹)	TCO (gDQO.L ⁻¹ .d ⁻¹)
1	4,25	1,16	14,0 ± 0,9
2	3,98	1,74	20,9 ± 0,6
3	4,00	3,44	41,2 ± 1,5

Fonte: Autoria própria.

De acordo com a literatura estudada, o valor de pH desejado para manter o reator acidogênico em pleno funcionamento para produção de hidrogênio, está na faixa de 4,5 a 6,0 (MOTA *et al.*, 2018). Durante toda a operação, o pH afluente foi submetido a correção com solução de HCl 30%, visto que o pH dos substratos apresentava média de 7,35. Desse modo, após a correção com ácido clorídrico, o pH do afluente foi conservado com média de 4,97, para que o meio reacional fosse mantido com o pH de 4,0 a 4,5, conforme observado nos valores do pH efluente apresentados na Tabela 21. Também é possível observar que o reator se manteve na referida faixa de pH mesmo com o aumento da TCO de 14,0 g DQO.L⁻¹.d⁻¹ para 41,2 g DQO.L⁻¹.d⁻¹, referente ao aumento na concentração de glicerol e, conseqüentemente, aumento da concentração de DQO.

5.2.1.1 Remoção de DQO

No que se refere à remoção de matéria orgânica no RALF-A, é possível verificar, na Tabela 24, as porcentagens de eficiência de remoção, assim como os valores de DQO afluente e efluente.

Tabela 24 – Remoção de DQO no RALF-A

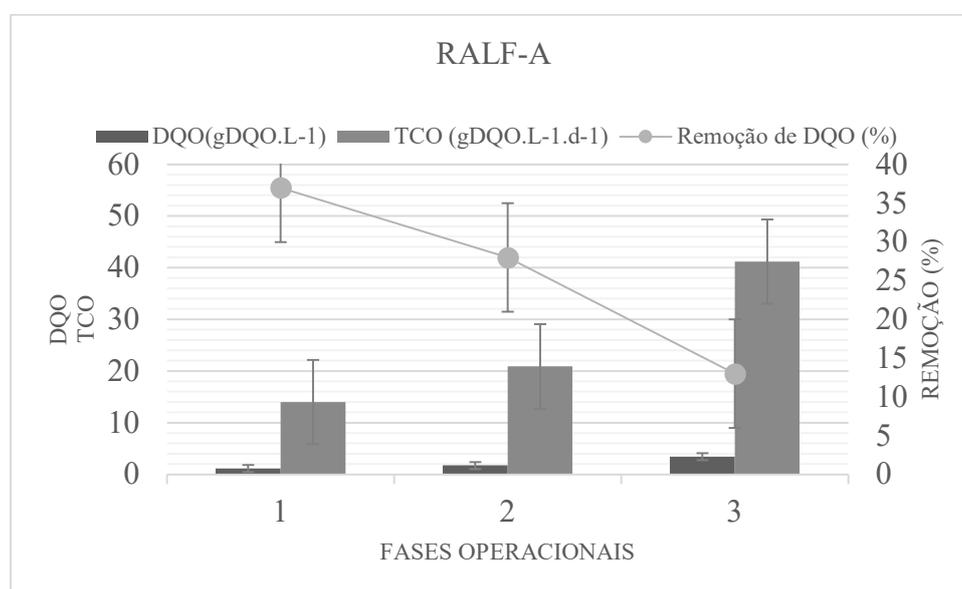
RALF-A				
FASE	TCO (gDQO.L ⁻¹ .d ⁻¹)	DQO		Eficiência de remoção (%)
		Afluente (g.L ⁻¹)	Efluente (g.L ⁻¹)	
1	14,0	1,16 ± 0,07	0,73 ± 0,04	36
2	20,9	1,74 ± 0,05	1,26 ± 0,02	28
3	41,2	3,44 ± 0,13	2,99 ± 0,05	13

Fonte: Autoria própria.

A partir da Tabela 24, observa-se que a remoção de DQO se manteve baixa, com valores entre 13 % e 36 %. Percebe-se que houve uma queda na remoção de matéria orgânica quando houve aumento na carga orgânica aplicada ao reator. Inicialmente, na Fase 1, quando a TCO aplicada foi de 14 gDQO.L⁻¹.d⁻¹, o RALF-A apresentou média de remoção de 36%. Para a TCO aplicada de 20,9 gDQO.L⁻¹.d⁻¹, a média de remoção foi de 28 %, enquanto para a TCO de 41,2 gDQO.L⁻¹.d⁻¹, a eficiência foi de 13 %.

Na Figura 15 encontram-se as comparações entre as TCO e DQO aplicadas em cada fase e as suas respectivas remoções de matéria orgânica.

Figura 15 – TCO aplicada, DQO afluente e remoção de DQO nas fases de 1 a 3



Fonte: Autoria própria.

Peixoto (2011) estudou o potencial de produção de hidrogênio, em reatores em batelada, a partir da digestão de águas residuárias, como glicerol e esgoto sanitário. As concentrações de matéria orgânica aplicadas aos reatores de esgoto sanitário e glicerol foram, respectivamente, 262 mg DQO.L⁻¹ e 368 mg DQO.L⁻¹. No decorrer da fase acidogênica, com pH de 5,5, o esgoto sanitário apresentou remoção de DQO de 14,8 %, enquanto o estudo a partir de glicerol apresentou remoção de DQO de 12,6 %. As baixas porcentagens de eficiência de remoção de matéria orgânica corroboram para os resultados obtidos por este trabalho.

Simões (2017), por sua vez, operou um reator anaeróbico de leito fluidificado – assim como no presente trabalho – mesofílico, em fase acidogênica, tratando glicerol. A concentração de DQO aplicada ao reator foi de 12,44 g DQO.L⁻¹ em um TDH de 0,5 h. o

valor médio de remoção de matéria orgânica observado pela autora foi de 5,9 %. Segundo Simões (2017), baixos valores de remoção de DQO são satisfatórios para um reator acidogênico em operação de reatores sequenciais, posto que, dessa forma, o reator metanogênico sequencial passa a ter elevada disponibilidade de matéria orgânica para ser consumida.

O mesmo também pôde ser observado por Adames (2022) operando reator anaeróbio horizontal de leito fixo mesofílico, em fase acidogênica com pH de 5,55, a partir de glicerol e esgoto sanitário. O autor aplicou uma concentração de matéria orgânica elevada, quando comparado ao presente estudo, de 15,6 g DQO.L⁻¹, em um TDH de 24 h. Ao final da pesquisa, o reator apresentou 13,79 % de eficiência de remoção de DQO.

Desse modo, os baixos valores de remoção de DQO encontrados no presente trabalho são coerentes quando se leva em consideração que, em reatores acidogênicos, a matéria orgânica permanece no meio. Isso ocorre porque, nesse tipo de reator, os substratos são convertidos em H₂, CO₂ e em metabólitos solúveis, restando a etapa de conversão da matéria orgânica para a fase metanogênica. Por esse motivo, os trabalhos que visam produção de hidrogênio e metabólitos na literatura não apresentam valores de eficiência de remoção de DQO expressivos.

5.2.1.2 Conversão de glicerol

As conversões médias de glicerol estão apresentadas na Tabela 25, acompanhadas dos valores médios das concentrações afluyente e efluyente de glicerol observadas durante as fases operacionais do RALF-A.

Tabela 25 - Concentrações afluyente e efluyente e conversão do glicerol no RALF-A

FASE	RALF-A		Conversão (%)
	Glicerol		
	Afluyente (g.L ⁻¹)	Efluyente (g.L ⁻¹)	
1	0,58 ± 0,02	0,07 ± 0,02	88
2	1,16 ± 0,04	0,28 ± 0,07	76
3	2,72 ± 0,09	1,65 ± 0,22	40

Fonte: Autoria própria.

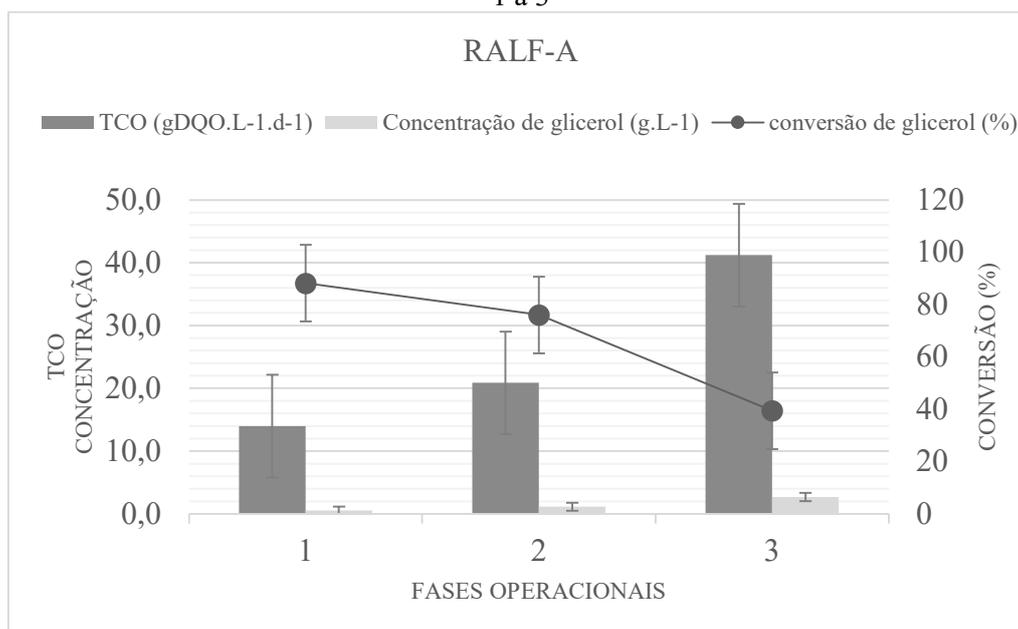
Percebe-se que o aumento da TCO refletiu no consumo de glicerol, que caiu a cada fase, reduzindo de 88% para 40% da Fase 1 para a Fase 3. Uma das possíveis causas para este comportamento tem relação com um mecanismo denominado inibição por retroalimentação. Esse processo ocorre quando o substrato, em excesso, eleva a concentração deste produto, passando a agir como um inibidor alostérico, ou seja, acaba diminuindo a velocidade da via metabólica (EDWARDS, 1970). Neste caso, em específico, foi observada a conversão incompleta do glicerol possivelmente como consequência do aumento excessivo de substrato.

Comportamento semelhante foi observado por Paranhos (2016), analisando a produção de hidrogênio a partir de glicerol bruto em reator anaeróbico de leito fluidificado. A autora verificou que, em altas concentrações de glicerol, a conversão deste substrato era muito baixa. Tendo aplicado $12,2 \text{ g}_{\text{glicerol}} \cdot \text{L}^{-1}$, em TDH de 36 h, o reator apresentou consumo de glicerol de 39,8 %, valor ainda menor do que os encontrados no presente trabalho. Por esse motivo, Paranhos (2016) justifica o comportamento dos reatores, com conversões de substrato muito baixas, com o possível efeito de inibição por retroalimentação.

Simões (2017) também obteve baixos valores de conversão de glicerol, em reator anaeróbico de leito fluidificado acidogênico mesofílico. A autora aplicou uma concentração de glicerol de $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ em TDHs que variaram de 8 h a 0,5 h. ao longo do estudo, o reator apresentou conversões de glicerol entre 38,3 % e 47,6 %. Tais resultados são condizentes com a porcentagem de glicerol consumida neste trabalho, com o aumento da concentração do substrato. Simões (2017) também atribuiu a baixa conversão de glicerol ao possível efeito de inibição por substrato, ou inibição por retroalimentação do produto, e indicou que determinadas concentrações de glicerol podem levar a este comportamento.

A Figura 16 mostra a concentração de glicerol afluyente e a sua conversão para as três fases do RALF-A.

Figura 16 - TCO aplicada, concentração de glicerol afluyente e conversão de glicerol nas fases de 1 a 3



Fonte: Autoria própria.

Outro fator a ser levado em consideração é o TDH adotado de 2 h. Este pode ter sido um TDH baixo para que ocorresse um consumo adequado do glicerol, ao ser utilizado em uma concentração muito elevada, em um curto espaço de tempo. Este comportamento também foi percebido por Paranhos (2016), que analisou a variação do TDH de 12 h, 20 h, 28 h e 36 h, para a mesma concentração de glicerol afluyente de 12,2 g DQO.L⁻¹. Os melhores resultados foram obtidos para o TDH de 36 h. Com a elevada concentração de glicerol, o maior TDH favoreceu o consumo e, por isso, apresentou os melhores resultados, visto que proporcionou o aumento no tempo de contato entre substrato e meio.

5.2.1.3 Composição do biogás

Para o RALF-A, o biogás produzido foi composto por H₂ e CO₂. Este fato confirma a eficiência do tratamento térmico do lodo, realizado no início do experimento, assim como evidencia o efeito da faixa de pH utilizada, ambos visando a supressão da metanogênese. O pH ácido da alimentação, mantido na faixa de 4,0 a 4,5 contribuiu para a produção de H₂ e ausência de CH₄ no biogás, indicando que não foi identificada a presença de arqueias metanogênicas, as quais foram inibidas, uma vez que a faixa ácida não era favorável para a metanogênese.

A composição média de hidrogênio no biogás produzido pelo RALF-A em função da variação da TCO está apresentada na Tabela 26.

Tabela 26 – Composição do biogás no RALF-A nas fases de 1 a 3

RALF-A		
FASE	TCO (g DQO.L ⁻¹ .d ⁻¹)	% H ₂ no biogás (%)
1	14,0	0
2	20,9	75,7
3	41,2	66,7

Fonte: Autoria própria.

A Fase 1, correspondente a TCO de 14 g DQO.L⁻¹.d⁻¹ com DQO de 1 g DQO.L⁻¹ no TDH de 2 h, demonstra em seus resultados que não houve produção de biogás, portanto não existem resultados de composição para essa fase. Isso ocorreu possivelmente pela baixa concentração de matéria orgânica disponível, que não pôde ser convertida satisfatoriamente em metabólitos solúveis e biogás. Durante a Fase 2, com o aumento da TCO para 20,9 g DQO.L⁻¹.d⁻¹, o biogás produzido apresentou sua melhor composição, com 75,7 % de hidrogênio. Na Fase 3, com TCO de 41,2 g DQO.L⁻¹.d⁻¹, a porcentagem de hidrogênio no biogás se manteve elevada, em 66,7 %, mesmo com o dobro da carga orgânica.

Simões (2017), avaliou a produção de biogás a partir de glicerol, na concentração de 12,44 g DQO.L⁻¹, em reator anaeróbio de leito fluidificado, encontrou 69,2 % de hidrogênio na composição do biogás produzido. A autora avaliou a variação do TDH de 8 h a 0,5 h, obtendo os melhores resultados para o menor tempo. O resultado corrobora com os valores encontrados pela presente pesquisa. Simões (2017) considerou o conteúdo de H₂ encontrado elevado e satisfatório, comprovando que o glicerol pode ser um substrato com potencial para produção de hidrogênio.

Adames (2022), no entanto, obteve resultados menos expressivos do que este trabalho. O autor analisou a produção de hidrogênio a partir da codigestão de glicerol e esgoto sanitário em reator anaeróbio horizontal de leito fixo. Com uma concentração de 15,6 g DQO.L⁻¹, o reator obteve a máxima porcentagem de hidrogênio de 40,7 %, com média de 16,3 % durante toda a fase acidogênica. Adames (2022) atribuiu os resultados ao elevado valor de concentração de glicerol aplicado, devido a seu elevado potencial de

toxicidade. Desse modo, os valores para composição do biogás são consideravelmente menores do que aqueles encontrados pelo presente estudo.

5.2.1.4 Rendimento e produção volumétrica de metano no RALF-A

O rendimento de hidrogênio específico para cada fase foi calculado a partir da massa molecular de H₂ produzido por unidade de massa de DQO aplicada. Os resultados obtidos para rendimento e produção volumétrica de hidrogênio referentes ao biogás produzido pelo RALF-A podem ser visualizados na Tabela 27.

Tabela 27 – Rendimento de hidrogênio no RALF-A nas fases de 1 a 3

RALF-A			
FASE	TCO (g DQO.L ⁻¹ .d ⁻¹)	HY (mmol H ₂ .g DQO ⁻¹ _{add})	PVH (mL H ₂ .L ⁻¹ .h ⁻¹)
1	14,0	0	0
2	20,9	1,49 ± 0,46	31,2 ± 10,0
3	41,2	0,47 ± 0,17	19,6 ± 6,8

Fonte: Autoria própria.

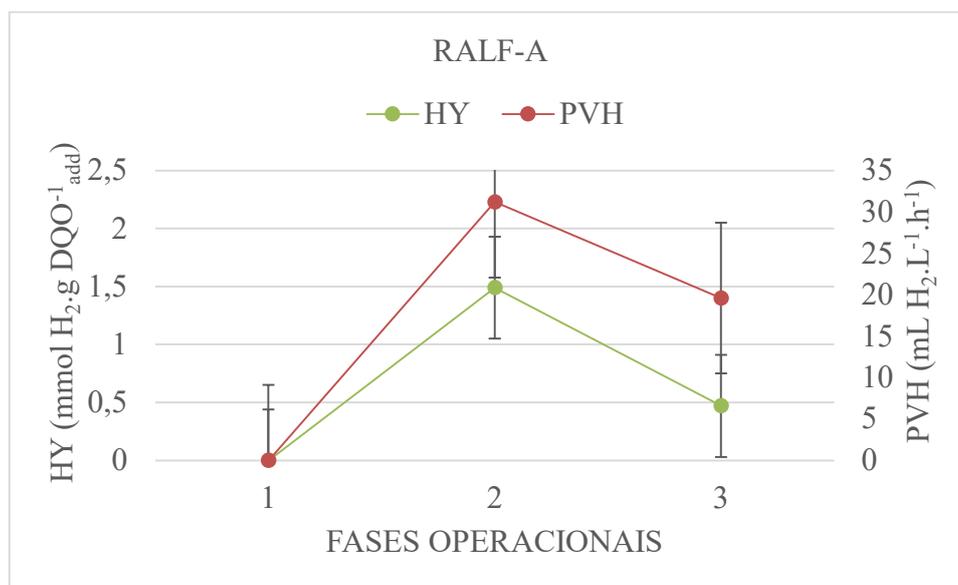
Confirmando o que foi explicitado no item anterior, os resultados da Fase 1, correspondente a TCO de 14 g DQO.L⁻¹.d⁻¹, demonstram que não houve produção de biogás. Isso ocorreu possivelmente pela baixa concentração de matéria orgânica, tendo aumentado o rendimento e a produção de H₂ com o aumento da TCO para 20,9 g DQO.L⁻¹.d⁻¹. Essa é uma tendência que pôde ser observada também em outros trabalhos, nos quais aumentos gradativos da carga orgânica favoreceram o rendimento de hidrogênio.

Dessa forma, na Fase 2, o RALF-A obteve seu rendimento máximo de 1,49 mmol H₂.g DQO⁻¹_{add}, com 75,7 % de hidrogênio na composição do biogás produzido. Nessa mesma fase, o reator também apresentou sua melhor produção volumétrica de hidrogênio (PVH), com 31,2 mL H₂.L⁻¹.h⁻¹ (1,2 mmol H₂.L⁻¹.h⁻¹).

No entanto, o contínuo aumento da TCO, para 41,2 gDQO.L⁻¹.d⁻¹ na Fase 3 do reator causou o decaimento de 68% no rendimento de H₂ e de 37 % na produção volumétrica, o que também pode ser verificado em outros trabalhos da literatura.

Os resultados para comparação de rendimento e produção volumétrica de biogás para o RALF-A estão apresentados na Figura 17.

Figura 17 – Rendimento e produção volumétrica de biogás para as fases de 1 a 3 no RALF-A



Fonte: Autoria própria.

Peixoto (2011), realizou um estudo com o objetivo de avaliar a produção de hidrogênio a partir de águas residuárias. Ao analisar um sistema fermentativo, em reatores em batelada, utilizando esgoto sanitário com concentração de 262 mg DQO.L⁻¹, o autor também atestou produção nula de hidrogênio durante toda a etapa de monitoramento. O mesmo ocorreu com reatores em batelada analisando a produção de hidrogênio a partir do glicerol, contendo 368 mg DQO.L⁻¹. Peixoto (2011) afirmou que a baixa concentração de carboidratos, além da baixa concentração de matéria orgânica utilizada, em ambos substratos pode ter sido um fator limitante para a produção de biogás, visto que este composto é amplamente utilizado no processo de fermentação para produção de H₂. Vale ressaltar que as concentrações de carboidrato detectadas nos substratos do presente estudo também foram insignificantes, o que pode ter colaborado para as baixas produções de biogás.

No caso do estudo de Paranhos (2016), foi realizado um estudo comparando os resultados entre dois tipos de glicerol, bruto (82,6 %) e puro (91,5 %), em concentrações diferentes de 25 g DQO.L⁻¹ e 12,2 g DQO.L⁻¹, respectivamente. A autora utilizou reatores anaeróbios de leito fluidificado mesofílicos, com pH de 4,5, visando a produção de hidrogênio. Para o reator operando com glicerol bruto, não houve produção de hidrogênio em nenhuma das fases de operação. No caso do reator operando com glicerina pura, no TDH de 20 h, foi obtida a produção de hidrogênio com rendimento de 0,078 mol H₂.mol glicerol⁻¹ consumido. O biogás obteve 34,2 % de hidrogênio em sua composição, e a produção

volumétrica de H_2 foi de $0,57 \text{ mmol } H_2.L^{-1}.h^{-1}$. Paranhos (2016) concluiu que seria necessário encontrar um equilíbrio entre a concentração de matéria orgânica e o tempo que o substrato tem em contato com os microrganismos, para que possam fermentar a matéria e produzir, com eficiência, o biogás. A carga extremamente elevada de 25 g DQO.L^{-1} não favoreceu o processo, enquanto que a estratégia de reduzir pela metade a carga orgânica ($12,2 \text{ g DQO.L}^{-1}$) demonstrou-se eficaz para o processo e produção de H_2 . No caso do presente estudo, o aumento da carga passou a apresentar queda no rendimento e produção de hidrogênio.

Simões (2017), por sua vez, também utilizando RALF com glicerol em fase acidogênica, obteve resultados mais expressivos que aqueles obtidos por este trabalho. A autora verificou, na concentração de $12,44 \text{ g DQO.L}^{-1}$ e TDH de $0,5 \text{ h}$, a máxima produção volumétrica de hidrogênio de $1,90 \text{ L } H_2.L^{-1}.h^{-1}$, e o máximo rendimento de $0,28 \text{ mol } H_2.mol \text{ glicerol}^{-1}_{consumido}$. No caso de Simões (2017), ficou comprovado que a diminuição do TDH (de 8 h para $0,5 \text{ h}$) favoreceu o metabolismo dos microrganismos e, conseqüentemente, a produção de biogás.

Adames (2022), analisando a produção de hidrogênio a partir da codigestão de glicerol e esgoto sanitário, com uma concentração de $15,6 \text{ g DQO.L}^{-1}$, em reator anaeróbio horizontal de leito fixo, também obteve resultados mais expressivos do que o presente estudo. Com o TDH de 24 h e $1,5 \%$ de glicerol, o autor obteve produção volumétrica média de $44,7 \text{ L } H_2.m^{-3}.d^{-1}$. Segundo Adames (2022), a menor concentração de glicerol na alimentação do reator apresentou melhores resultados, provavelmente devido à potencial toxicidade do deste substrato.

5.2.2 Metabólitos solúveis no RALF-A

As análises para metabólitos solúveis nas amostras do RALF-A, demonstraram que, a partir dos dados de ácidos voláteis produzidos no reator, na faixa de dezena de $mg.L^{-1}$, não é possível detectar ácidos intermediários, como ácido acético, propiônico, butírico e valérico. No entanto, apesar de não terem sido detectados ácidos intermediários, foi possível a detecção de etanol, conforme também demonstra a Tabela 28, na qual também estão dispostos os valores de AVT produzidos em cada fase.

Tabela 28 – Concentração de ácidos voláteis no RALF-A

RALF-A		
FASE	AVT (mg.L ⁻¹)	Etanol (mg.L ⁻¹)
1	26,5	159
2	20,0	456
3	32,9	368

Fonte: Autoria própria.

É sabido que uma das rotas possíveis para o glicerol, a partir da fermentação, é a produção de etanol. Neste caso, é possível que os microrganismos tenham desviado a rota para o Etanol, não tendo seguido as demais rotas possíveis para a fermentação do glicerol. Dessa forma, a concentração encontrada para o etanol na Fase 1 foi de 159 mg.L⁻¹, na Fase 2 foi de 456 mg.L⁻¹ e na Fase 3 foi de 368 mg.L⁻¹. Assim como para os demais parâmetros obtidos para o RALF-A, o melhor resultado para metabólitos solúveis foi encontrado com TCO de 20,9 gDQO.L⁻¹.d⁻¹.

Com o objetivo de averiguar a parcela de DQO destinada à produção de etanol, a fim de se confirmar a rota tomada pela fermentação do glicerol, foi realizado o balanço de DQO para a condição com melhor resultado (Fase 2), apresentado na Tabela 29.

Tabela 29 – Balanço de DQO da Fase 2 do RALF-A

RALF-A	
Fase	2
DQO _{Eex} (gDQO.L ⁻¹)	1,260
Glicerol efluente (g.L ⁻¹)	0,280
Glicerol efluente (gDQO.L ⁻¹)	0,260
SSV efluente (g.L ⁻¹)	0,025
SSV efluente (gDQO.L ⁻¹)	0,034
Etanol (g.L ⁻¹)	0,456
Etanol (gDQO.L ⁻¹)	0,952
DQO _{Eeq} (gDQO.L ⁻¹)	1,246
DQO _{Eex} - DQO _{Eeq} (gDQO.L ⁻¹)	0,014
DQO _{Eex} - DQO _{Eeq} (%)	1,14

Fonte: Autoria própria.

A DQOE_{ex} foi definida como sendo a DQO medida no efluente, enquanto a DQOE_{eq} representa a soma das DQO equivalentes de cada composto do efluente, sendo eles o glicerol, SSV e etanol). Dessa forma, realizando o balanço de DQO a partir da diferença entre a DQOE_{ex} e a DQOE_{eq}, percebe-se que a parcela de DQO não identificada foi correspondente a 1,14%, resultado que confirma que a rota de produção de etanol foi priorizada, sendo o único metabólito solúvel encontrado no efluente do reator.

Em outros estudos descritos na literatura, a partir de glicerol, também foram relatados a produção de etanol. Este foi o caso de Paranhos (2016) que, a partir do processo de fermentação do glicerol em reator anaeróbico de leito fluidificado, obteve a máxima produção de etanol com o TDH de 36 h. A autora atingiu a concentração de etanol de 408,7 mg.L⁻¹, valor semelhante ao encontrado pelo presente trabalho. No entanto, Paranhos (2016) percebeu a redução da produção de etanol e o aumento da produção de 1,3-propanodiol, demonstrando uma mudança na rota metabólica dos microrganismos após a diminuição do TDH.

Rodrigues *et al.* (2020) estudaram a codigestão de glicerol e esgoto sanitário em reatores em batelada e observaram a mudança da rota metabólica do glicerol para produção de hidrogênio e a geração de ácidos voláteis e álcoois, a partir da diminuição do pH ao longo do experimento. Os autores encontraram uma concentração de etanol de 187,38 mg.L⁻¹. No entanto, foram observados uma grande variedade de outros metabólitos como ácidos butírico, acético, propiônico e capróico. Vale ressaltar que as concentrações de matéria orgânicas aplicadas pelos autores foram aumentando, da ordem de 20 gDQO.L⁻¹ a 320 gDQO.L⁻¹, faixa bem acima das concentrações de DQO aplicadas neste trabalho.

Adames (2022) também demonstrou a produção de etanol a partir de glicerol e esgoto sanitário, durante a fase acidogênica de seus reatores anaeróbios horizontais de leito fixo, operando em série. Devido a uma fase inicial de fermentação, o autor obteve a concentração máxima de 254 mg.L⁻¹ de etanol, além da produção de outros metabólitos como ácido propiônico, ácido valérico e 1,3-propanodiol.

5.3 Operação em duas fases: Reator Sequencial Metanogênico (RALF-SM)

O RALF-SM foi mantido em operação por aproximadamente 260 dias, durante os quais foi submetido a cinco condições experimentais. Durante toda a operação, foram

avaliados os desempenhos do reator a partir da variação da TCO pelo aumento da concentração e do TDH, além dos efeitos causados na produção de metano a partir dessas variações. Os resultados foram abordados nos tópicos a seguir.

5.3.1 Desempenho do RALF-SM

As condições operacionais médias empregadas nas fases de 1 a 5 no RALF-SM, considerando pH aplicado, concentração de DQO dos substratos, os tempos de detenção hidráulica e as respectivas taxas de carregamento orgânico estão descritas na Tabela 30.

Tabela 30 – Condições operacionais aplicadas ao RALF-SM

RALF-SM				
FASE	pH	TDH (h)	DQO (gDQO.L ⁻¹)	TCO (gDQO.L ⁻¹ .d ⁻¹)
1	8,22		0,69	2,8 ± 0,2
2	8,05	6	1,17	4,7 ± 0,2
3	7,65		2,97	11,9 ± 0,2
4	8,10	12	2,97	5,9 ± 0,3
5	8,11	18	2,91	3,9 ± 0,2

Fonte: Autoria própria.

O RALF-SM foi alimentado com o efluente do reator acidogênico, RALF-A, para tornar possível o estudo da digestão anaeróbia em duas fases. Assim, os valores apresentados na Tabela 30 para DQO_{afllu} são advindos do processo do reator anterior (RALF-A).

Conforme discutido anteriormente, no tópico 5.1.1 sobre o desempenho do RALF-CM, a faixa de pH desejada para manter o reator metanogênico em pleno funcionamento, de acordo com o indicado pela literatura, é de 6,3 a 7,8 para Van Haandel (1994), de 6,5 a 8,3 para Speece (1996), de 6,5 a 8,0 para Chernicharo (2007) e de 6,8 a 7,5 para Zhu *et al.* (2008). O pH do substrato utilizado na alimentação dos reatores, efluente do RALF-A, obteve média de 4,08. Assim, para que o efluente acidogênico pudesse ser utilizado como alimentação para o reator metanogênico, foi necessária a adição de um alcalinizante ao barrilete de alimentação.

Da mesma forma como ocorreu no RALF-CM, o alcalinizante utilizado foi o bicarbonato de sódio. Na fase inicial, foi adicionado NaHCO₃ na concentração 0,38 g NaHCO₃.L⁻¹. A partir da Fase 2, com o aumento da concentração de DQO aplicada,

tornou-se necessário também o aumento da concentração de bicarbonato. Assim, na Fase 2 a alimentação foi suplementada em 0,56 g $\text{NaHCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$. Na Fase 3, esse valor passou para 2 g $\text{NaHCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$. Na Fase 4, foi possível diminuir o valor da concentração de bicarbonato da fase anterior para 1,25 g $\text{NaHCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ e, na Fase 5, esse valor passou para 1 g $\text{NaHCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$.

A partir destas quantidades de NaHCO_3 acrescentadas ao substrato, foi possível controlar os valores de pH de entrada e saída, obtendo-se os valores médios de pH registrados na Tabela 30, anteriormente apresentada.

Peixoto (2011) operou reatores sequenciais em batelada, analisando o comportamento de diferentes águas residuárias, dentre elas glicerol e esgoto sanitário. Em ambos os experimentos, os reatores acidogênicos foram mantidos com pH de 5,5. Ao iniciar a etapa metanogênica, a fase líquida dos reatores acidogênicos teve seu pH ajustado para 7,0 por meio de alcalinizante. Desse modo, seria possível garantir as condições necessárias para a metanogênese. O mesmo ocorreu ao longo do presente estudo, fazendo-se necessária a correção do pH do efluente acidogênico para alimentação do reator metanogênico.

Adames (2022), em seu estudo utilizando reatores anaeróbios horizontais de leito fixo a 37 °C, alimentados com esgoto sanitário e glicerol, manteve o pH do reator metanogênico sequencial sempre acima de 6,5, durante toda a operação, com média de 8,31. Este valor de pH é semelhante aos valores médios encontrados para as fases do RALF-SM do presente estudo.

5.3.1.1 Remoção de DQO

Com relação a TCO aplicada nas fases de operação do RALF-CM, é possível verificar, na Tabela 31, a influência gerada na remoção de matéria orgânica, estando apresentados os valores de DQO afluente e efluente e as porcentagens de eficiência de remoção.

Tabela 31 – Eficiência de remoção de DQO no RALF-SM

FASE	RALF-SM			
	TCO (gDQO.L ⁻¹ .d ⁻¹)	DQO		Eficiência de remoção (%)
		Afluente (g.L ⁻¹)	Efluente (g.L ⁻¹)	
1	2,8	0,69 ± 0,05	0,21 ± 0,03	70
2	4,7	1,17 ± 0,04	0,29 ± 0,04	75
3	11,9	2,97 ± 0,05	1,98 ± 0,08	33
4	5,9	2,97 ± 0,16	1,80 ± 0,06	39
5	3,9	2,91 ± 0,12	2,04 ± 0,09	30

Fonte: Autoria própria.

Na Fase 1, na qual foram empregados 2,8 g DQO.L⁻¹.d⁻¹, o reator RALF-SM apresentou uma eficiência satisfatória com média de 70 % de remoção de matéria orgânica. Durante a Fase 2, com o aumento da TCO aplicada, de 4,7 g DQO.L⁻¹.d⁻¹, o reator respondeu positivamente, tendo apresentado 75 % de remoção de DQO.

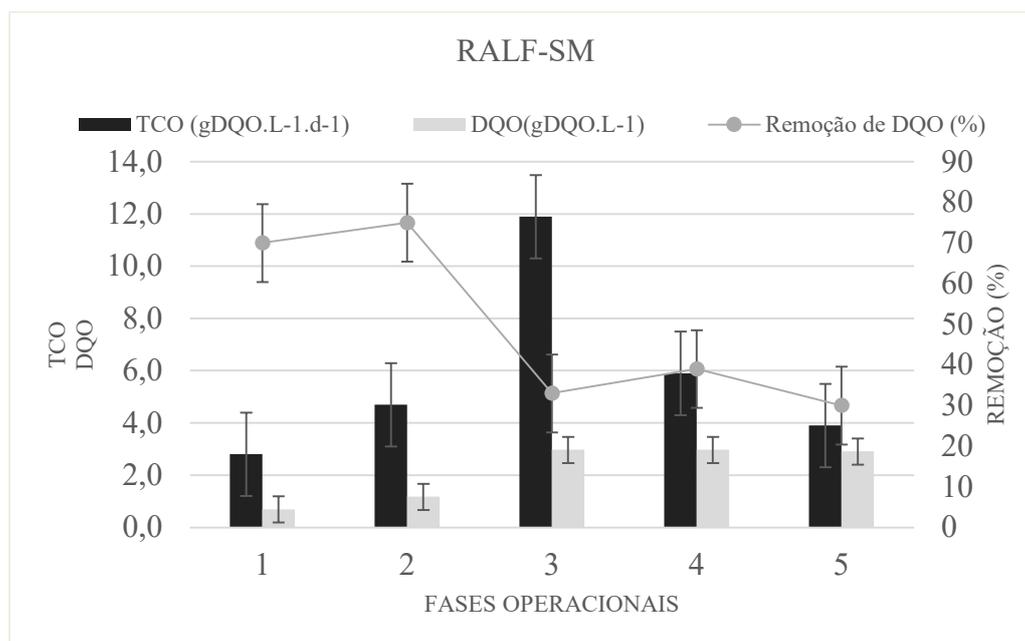
Verifica-se que o acréscimo de TCO de 4,7 g DQO.L⁻¹.d⁻¹ para 11,9 g DQO.L⁻¹.d⁻¹, com o aumento da DQO de 1,17 gDQO.L⁻¹ para 2,97 g DQO.L⁻¹, mantendo-se o TDH em 6 h, causou uma diminuição na capacidade de remoção de matéria orgânica, de 75% para 33%. Posteriormente, mesmo com o aumento do TDH de 6h para 12h e 18h, como tentativa de recuperar a estabilidade do reator, a capacidade de remoção de matéria orgânica pelo RALF-SM continuou a cair, atingindo 30%. Isso pode ter acontecido por acúmulo de maiores concentrações de ácidos voláteis, a partir da Fase 3, causando as baixas remoções de DQO percebidas.

Observa-se que, mesmo que as TCOs aplicadas nas Fase 4 e 5 tenham sido próximas às das fases 1 e 2 anteriores, a adição de maiores quantidades de substrato ao afluente não foi suportada pelo reator com o TDH de 18 h.

Dessa forma, assim como no reator metanogênico RALF-CM, é possível aferir que, para a codigestão de esgoto sanitário e glicerol, tanto em etapa única quanto em duas etapas, aumentos gradativos na alimentação do reator acabaram por promover uma sobrecarga, causando desequilíbrio no meio.

Na Figura 18 encontram-se as comparações entre as TCO e DQO aplicadas em cada fase e as suas respectivas remoções de matéria orgânica.

Figura 18 – TCO aplicada, DQO afluente e remoção de DQO nas fases de 1 a 5



Fonte: Autoria própria.

Peixoto (2011) estudando um sistema anaeróbio de duas fases, em batelada, utilizando glicerol como substrato, apresentou resultados de remoção de matéria orgânica de 61,1 % para a fase metanogênica. O autor também analisou o sistema anaeróbio em duas etapas, em batelada, utilizando esgoto sanitário como substrato. No entanto, o segundo apresentou valores de remoção bem abaixo do primeiro, de 41,9 %. Ao contrário do esgoto, o glicerol é altamente biodegradável, possuindo compostos prontamente disponíveis para serem utilizados pelas arqueias metanogênicas. Por esse motivo, a eficiência na remoção de matéria orgânica do esgoto sanitário se apresentou abaixo da eficiência de remoção do glicerol. Este fato corrobora para a escolha do presente trabalho em utilizar o glicerol como cossubstrato do esgoto sanitário, aumentando o potencial de biodegradabilidade e, conseqüentemente, as chances de produção de biogás.

No estudo de Adames (2022), tratando esgoto sanitário e glicerol em RAHLF sequenciais, ao aumentar a concentração de DQO pelo aumento da porcentagem de glicerol, ao longo das três fases aplicadas, também foi percebida a diminuição da eficiência na remoção de matéria orgânica pelo reator metanogênico. Com 1,5 % (v/v) de glicerol aplicado, a remoção de matéria orgânica a etapa metanogênica foi de 98,16. Ao aumentar o percentual de glicerol aplicado para 2 % (v/v), o reator metanogênico sequencial apresentou 75,68 % de remoção de DQO. Por fim, com o aumento para 3 %

(v/v), a eficiência de remoção de matéria orgânica caiu para 37,78%, valor similar ao encontrado para o RALF-SM após o aumento da carga aplicada.

5.3.1.2 Conversão de glicerol

As conversões médias de glicerol alcançadas pelo reator RALF-SM e os valores médios das concentrações afluyente e efluyente, ao longo das fases 1 a 5, estão apresentadas na Tabela 32.

Tabela 32 – Concentrações afluyente e efluyente e conversão do glicerol no RALF-SM

FASE	RALF-SM		Conversão (%)
	Afluyente (g.L ⁻¹)	Efluyente (g.L ⁻¹)	
1	0,05 ± 0,02	0,04 ± 0,01	31
2	0,18 ± 0,12	0,04 ± 0,00	77
3	1,60 ± 0,17	0,05 ± 0,01	97
4	1,52 ± 0,18	0,04 ± 0,01	98
5	1,59 ± 0,22	0,05 ± 0,00	97

Fonte: Autoria própria.

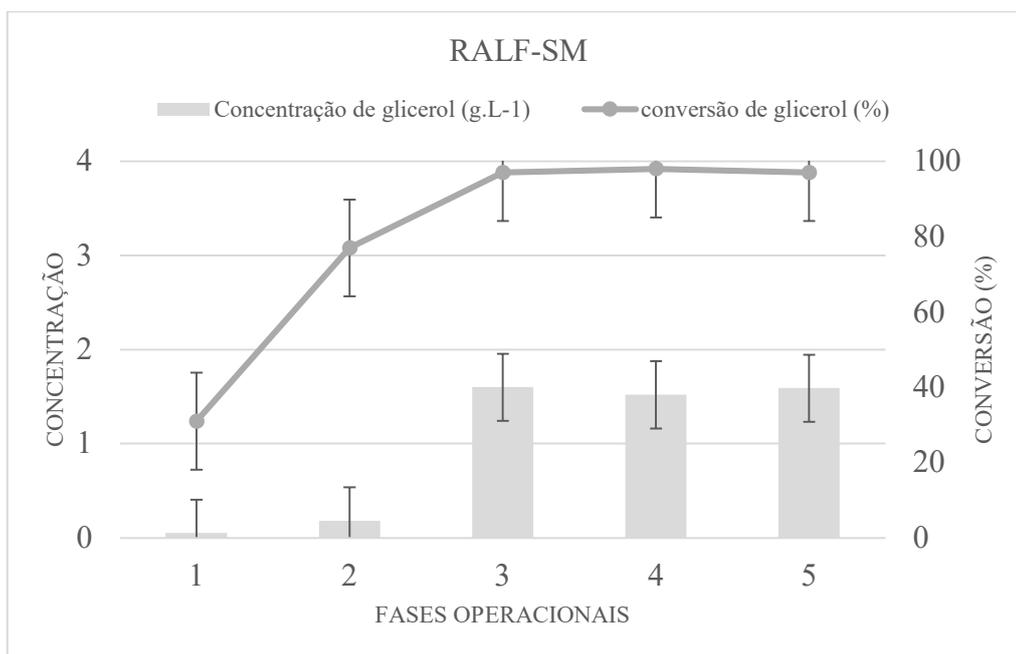
A partir dos valores de conversão de glicerol apresentados na Tabela 32, é possível perceber que, tanto para a Fase 1 quanto para a Fase 2, as porcentagens resultantes do consumo de glicerol foram baixas (31% e 77%, respectivamente) quando comparadas às demais fases, que apresentaram conversões acima de 97%. No entanto, ao visualizar os valores das concentrações afluentes ao reator na Fase 1 e na Fase 2, percebe-se que estas foram muito baixas, visto que a maior parte da conversão do glicerol ocorreu ainda na fase acidogênica correspondente, no RALF-A. A Fase 1 do RALF-A consumiu 88% de glicerol, sendo sucedida pela Fase 1 do RALF-SM, que consumiu 31% do restante. O processo como um todo, na Fase 1, apresentou um consumo total de 93%. A Fase 2 do RALF-A consumiu 76% do glicerol, sendo sucedida pela Fase 2 do RALF-SM, que consumiu 77% do glicerol restante. Assim, na Fase 2, o processo como um todo apresentou um consumo total de 97% do glicerol aplicado.

Além disso, analisando-se os valores encontrados de glicerol efluyente ao reator RALF-SM, percebe-se que, para todas as fases, as concentrações foram de 0,04 g.L⁻¹ a 0,05 g.L⁻¹. Isso demonstra que o glicerol não teve dificuldades em ser convertido,

independente da TCO aplicada. O mesmo ocorre quando se analisa os valores efluentes para o RALF-CM, cujas concentrações de glicerol foram de 0,03 g.L⁻¹ a 0,05 g.L⁻¹. Assim, a adoção do processo de codigestão em uma etapa ou em duas etapas não interferiu no consumo do glicerol como substrato, visto que foram encontradas remoções acima de 92%, tanto no RALF-CM quanto no processo RALF-A + RALF-SM.

A Figura 19 mostra a concentração de glicerol afluyente e a sua conversão para as três fases do RALF-A.

Figura 19 – Concentração de glicerol afluyente e conversão de glicerol nas fases de 1 a 5



Fonte: Autoria própria.

Observando-se o trabalho de Adames (2022), o qual também tratou da codigestão de esgoto sanitário e glicerol, em duas fases, em reatores anaeróbios horizontais de leito fixo, percebe-se que, na fase metanogênica, o reator apresentou conversão de glicerol de 90 % para 1,5 % de glicerol (v/v). Ao final das três fases estudadas, após o processo acidogênico e metanogênico, todo o glicerol aplicado foi consumido, resultando valores menores que 0,01 g.L⁻¹ de glicerol. Portanto, assim como no presente estudo, todo o glicerol foi convertido, corroborando com o fato de que este substrato não apresenta dificuldades em ser consumido, devido a sua elevada degradabilidade.

5.3.1.3 Composição do biogás

Para o RALF-SM, em todas as fases, o biogás produzido foi composto por CH₄ e CO₂. Este fato é indicativo do processo anaeróbio e da presença de organismos metanogênicos no reator. A composição média de metano no biogás produzido pelo RALF-SM em função da variação da TCO está exibida na Tabela 33.

Tabela 33 - Composição do biogás no RALF-SM nas fases de 1 a 5

RALF-SM		
FASE	TCO (g DQO.L ⁻¹ .d ⁻¹)	CH ₄ no biogás (%)
1	2,8	82,8
2	4,7	77,0
3	11,9	58,5
4	5,9	64,3
5	3,9	61,5

Fonte: Autoria própria.

Verifica-se que a porcentagem máxima de metano obtida ao longo da operação foi de 82,8 %, durante a Fase 1, cuja TCO aplicada foi de 2,8 g DQO.L⁻¹.d⁻¹. Com o aumento da TCO para 4,7 g DQO.L⁻¹.d⁻¹ na Fase 2, foi possível perceber um decréscimo na porcentagem de metano no biogás para 77,0 %. Não obstante, este valor ainda se mostrou satisfatório para a composição do biogás.

No entanto, ao aumentar a TCO aplicada para 11,9 g DQO.L⁻¹.d⁻¹ durante a Fase 3, o RALF-SM apresentou uma queda significativa na porcentagem de metano no biogás, atingindo o valor de 58,5 %, o menor encontrado para este reator. Essa queda ocorreu em conjunto com uma diminuição na capacidade de remoção de matéria orgânica, o que pode ser indicativo do desequilíbrio do processo da digestão anaeróbia devido ao aumento da carga orgânica.

À medida que a TCO foi reduzida, na Fase 4, para 5,9 g DQO.L⁻¹.d⁻¹, em razão do aumento do TDH para 12 h e manutenção da faixa de DQO aplicada, a porcentagem de metano voltou a subir, atingindo o valor de 64,3 %. Por fim, na Fase 5, com a TCO de 3,9 g DQO.L⁻¹.d⁻¹, com a mesma DQO e o aumento do TDH para 18 h, o valor de CH₄ encontrado no biogás não apresentou grandes mudanças, sendo equivalente a 61,5 %.

Ainda que os valores de porcentagem de metano no biogás tenham apresentado uma queda ao longo da operação, eles se encontram dentro da faixa de 50 % a 75 % (ANUKAM *et al.*, 2019), discutida no item 5.1.1.4 do RALF-CM. Este fato demonstra que mesmo com as baixas porcentagens apresentadas, os resultados estão dentro do aceitável. Assim como o ocorrido no reator controle RALF-CM, a presença de metano no biogás, mesmo nas fases em que o reator apresentou um desequilíbrio devido ao aumento da carga orgânica aplicada, se apresenta com resultados favoráveis.

No caso de Adames (2022), que também trabalhou com reatores RAHLF sequenciais tratando esgoto sanitário e glicerol, o estudo obteve resultados semelhantes para a porcentagem de metano no biogás produzido pelo reator metanogênico. Com 1,5 % de glicerol (v/v) e TCO de 3,59 kg DQO.m⁻³.d⁻¹, o reator metanogênico apresentou 68,3 % de CH₄ no biogás. No entanto, com o aumento da concentração de glicerol adicionado para 2 % (v/v) (7,57 kg DQO.m⁻³.d⁻¹) e 3 % (v/v) (10,24 kg DQO.m⁻³.d⁻¹), o reator demonstrou queda na produção de biogás, com valores de 48,0 % e 53,7 %, respectivamente. Dessa forma, percebe-se o mesmo comportamento apresentado pelo reator RALF-SM no presente estudo, ou seja, uma diminuição de metano na composição do biogás em função do aumento da TCO aplicada.

5.3.1.4 Rendimento e produção volumétrica de metano no RALF-SM

O rendimento de metano específico de cada fase foi calculado a partir do volume de CH₄ produzido por unidade de massa de DQO consumida. Os resultados obtidos para rendimento de metano referente ao biogás produzido pelo RALF-CM podem ser visualizados na Tabela 34.

Tabela 34 - Rendimento de metano no RALF-SM nas fases de 1 a 5

RALF-SM		
FASE	TCO (gDQO.L ⁻¹ .d ⁻¹)	MY (mL CH ₄ .g DQO ⁻¹ _{cons})
1	2,8	167,5 ± 43,4
2	4,7	213,0 ± 52,0
3	11,9	176,5 ± 15,5
4	5,9	189,6 ± 14,1
5	3,9	130,1 ± 25,8

Fonte: Autoria própria.

Conforme o que foi especificado no item 5.1.1.5 do RALF-CM, levando-se em consideração que o rendimento teórico de metano é de 350 mL CH₄.g DQO⁻¹_{cons}, sob condições normais de temperatura e pressão, entende-se que todas as fases obtiveram rendimento médio abaixo do esperado.

O maior valor para rendimento de metano verificado no RALF-SM foi de 213,0 mL CH₄.g DQO⁻¹_{cons}, o qual ocorreu na Fase 2 com TCO de 4,7 g DQO.L⁻¹.d⁻¹ (para 1,17 g DQO.L⁻¹ e TDH de 6 h). Este primeiro acréscimo de matéria orgânica pelo glicerol no substrato do reator acidogênico e, conseqüentemente, na alimentação do reator metanogênico sequencial (de 0,69 g DQO.L⁻¹ para 1,17 g DQO.L⁻¹) contribuiu para o rendimento de metano, algo que também pode ser percebido com relação à remoção de DQO na mesma fase, de 75 %. No entanto, a porcentagem de CH₄ no biogás, nessa fase (77 %), foi ligeiramente menor do que a identificada na Fase 1, de 83 %.

A partir do próximo incremento de DQO para média de 2,95 g DQO.L⁻¹ na Fase 3, com TCO de 11,9 g DQO.L⁻¹.d⁻¹, o rendimento apresentou um decaimento, com resultados médios de 176,5 mL CH₄.g DQO⁻¹_{cons}. Na Fase 4, obteve-se o rendimento médio de 189,6 mL CH₄.g DQO⁻¹_{cons} e, posteriormente, mais uma queda para 130,1 mL CH₄.g DQO⁻¹_{cons} na Fase 5, sendo o pior resultado apresentado para este reator.

Assim como foi percebido no reator de fase única RALF-CM, para o processo de duas etapas a melhor condição observada para rendimento de metano foi a Fase 2, com concentração do substrato de 1,5 g DQO.L⁻¹, sendo 0,5 g DQO.L⁻¹ advindos do esgoto sanitário e 1,0 g DQO.L⁻¹ do glicerol, com TDH total de 8 h (no caso dos sequenciais, 2 h para o acidogênico mais 6 h para o metanogênico). Com relação à produção volumétrica de metano, os resultados encontrados para o RALF-SM estão descritos na Tabela 35.

Tabela 35 – Produção volumétrica de metano obtida nas fases de 1 a 5 no RALF-SM

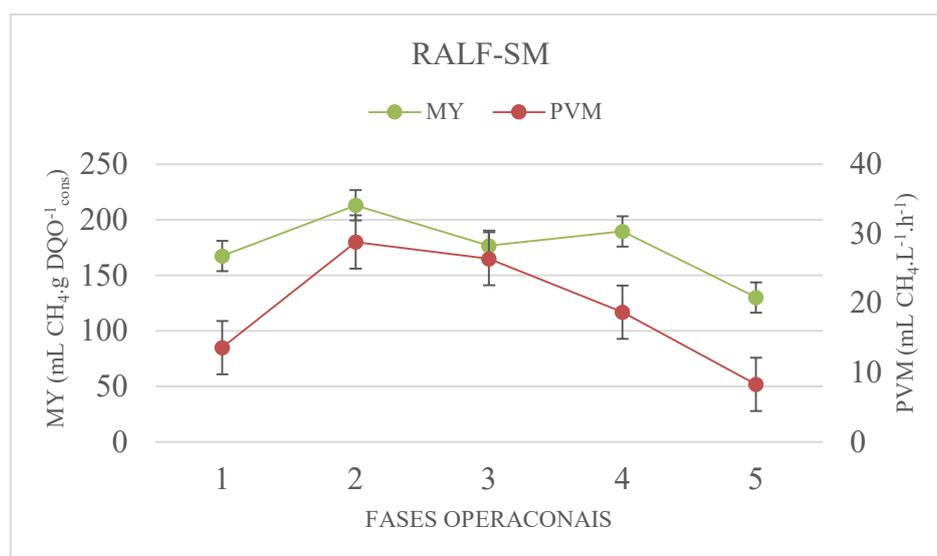
RALF-SM		
FASE	TCO (gDQO.L ⁻¹ .d ⁻¹)	PVM (mL CH ₄ .L ⁻¹ .h ⁻¹)
1	2,8	13,6 ± 2,8
2	4,7	28,8 ± 7,4
3	11,9	26,4 ± 1,8
4	5,9	18,7 ± 0,7
5	3,9	8,3 ± 1,1

Fonte: Autoria própria.

Assim como para o rendimento, o maior valor encontrado para produção volumétrica de metano foi de $28,8 \text{ mL CH}_4 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, também na Fase 2. Mais uma vez, percebe-se que a estratégia de aumentar a carga orgânica no reator, a partir do aumento de $1,0 \text{ g DQO} \cdot \text{L}^{-1}$ para $1,5 \text{ g DQO} \cdot \text{L}^{-1}$ no reator acidogênico, mantendo-se o TDH em 6 h, favoreceu a produção de metano. Ao passo que o progressivo aumento da carga orgânica, acima de $3,0 \text{ g DQO} \cdot \text{L}^{-1}$, mesmo com o aumento também do TDH, não foi favorável ao reator RALF-SM, reduzindo sobremaneira tanto o rendimento ($130 \text{ mL CH}_4 \cdot \text{g DQO}^{-1}_{\text{cons}}$) quanto a PVM ($8,3 \text{ mL CH}_4 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) e demonstrando, conseqüentemente, um possível desarranjo no interior do reator.

Os resultados para comparação de rendimento e produção volumétrica de biogás para o RALF-CM estão apresentados na Figura 20.

Figura 20 - Rendimento e produção volumétrica de biogás para as fases de 1 a 5 no RALF-SM



Fonte: Autoria própria.

Em trabalho analisando águas residuárias em reatores em batelada sequenciais para produção de hidrogênio e metano, Peixoto (2011) obteve rendimento de CH_4 de $180,14 \text{ mL CH}_4 \cdot \text{g DQO}^{-1}$ a partir da digestão de glicerol. Além disso, ao longo das 224 h de experimento, o reator metanogênico produziu $49,9 \text{ mL CH}_4$, a maior produção dentre os substratos estudados pelo autor. De acordo com Peixoto (2011), este teria sido um bom desempenho, indicativo de que a matéria orgânica teria sido bem direcionada para o processo de metanização. Ao analisar a digestão em duas fases de esgoto sanitário,

Peixoto (2011) obteve baixa produção de metano, cerca de 10,2 mL CH₄. Este resultado, segundo o autor, provavelmente teve relação com os baixos valores de remoção de matéria orgânica, que ocorreram porque não haviam compostos facilmente biodegradáveis, como carboidratos, que estivessem prontamente disponíveis para as arqueias metanogênicas.

No caso do estudo de Adames (2022), com reatores anaeróbios horizontais de leito fixo sequenciais, tratando esgoto sanitário e glicerol, os resultados obtidos para produção de metano são consideravelmente mais baixos do que os obtidos pelo presente estudo. O autor apresenta a produção volumétrica máxima de CH₄, obtida pelo reator metanogênico, de 306,7 L CH₄.m⁻³.d⁻¹, sendo a produção média de 92,16 L CH₄.m⁻³.d⁻¹. Para o presente estudo, os valores apresentados pelo RALF-SM na Fase 2 seriam equivalentes a 691,2 L CH₄.m⁻³.d⁻¹, resultado consideravelmente maior. A produção de metano apresentou uma tendência de queda com o aumento da carga orgânica aplicada, a mesma tendência apresentada por este estudo.

5.4 Codigestão em Uma Etapa versus Duas Etapas

Este tópico trata da análise das configurações estudadas, digestão anaeróbia em uma etapa e digestão anaeróbia em duas etapas, levando em consideração qual dos dois processos foi mais eficiente e mais produtivo energeticamente.

Comparando-se os melhores resultados do processo em uma única etapa (Fase 2) e do conjunto do processo em duas etapas (Fase 2), foi possível compilar os dados na Tabela 36. Ressalta-se que os dados apresentados na Tabela 36 não apresentam, necessariamente, os melhores resultados para cada parâmetro apresentado, mas sim os valores observados na fase que apresentou melhor rendimento de metano e, coincidentemente, melhor remoção de matéria orgânica para os reatores metanogênicos, e melhor rendimento de hidrogênio para reator acidogênico.

Tabela 36 – Principais resultados obtidos nos reatores em etapa única e em duas etapas

Parâmetros	Processo em uma etapa		Processo em duas etapas	
	RALF-CM		RALF-A	RALF-SM
DQO	1,68 g DQO.L ⁻¹		1,74 g DQO.L ⁻¹	1,17 g DQO.L ⁻¹
TDH	8 h		2 h	6 h
Remoção de DQO	75 %		28 %	75 %
Conversão de Glicerol	96 %		76 %	77 %
% H ₂ / % CH ₄ no biogás	70 % de CH ₄		76 % de H ₂	77,0 % de CH ₄
HY / MY	169,3 mL CH ₄ .g DQO ⁻¹ _{cons}	1,5 mmol H ₂ .g DQO ⁻¹ _{add}	213,0 mL CH ₄ .g DQO ⁻¹ _{cons}	
PVH / PVM	30,5 mL CH ₄ .L ⁻¹ .h ⁻¹		31,2 mL H ₂ .L ⁻¹ .h ⁻¹	28,8 mL CH ₄ .L ⁻¹ .h ⁻¹
PE _{H2} / PE _{CH4}	45,84 kJ.d ⁻¹		14,17 kJ.d ⁻¹	34,17 kJ.d ⁻¹

HY: rendimento de hidrogênio; MY: rendimento de metano; PVH: produção volumétrica de hidrogênio; PVM: produção volumétrica de metano; PE_{H2}: potencial energético de hidrogênio; PE_{CH4}: potencial energético de metano.

Fonte: Autoria própria.

Para melhor comparação de discussão dos resultados, fez-se também um compilado com os resultados globais do processo em duas etapas, comparados ao processo de uma etapa. Estes resultados estão exibidos na Tabela 37.

Tabela 37 – Comparação do processo em uma etapa com resultados globais do processo em duas etapas

Parâmetros	Processo em uma etapa	Processo em duas etapas
	RALF-CM	Global
DQO	1,68 g DQO.L ⁻¹	1,74 g DQO.L ⁻¹
TDH	8 h	8 h
Remoção de DQO	75%	83%
Conversão de Glicerol	96%	97%
Potencial Energético	45,84 kJ.d ⁻¹	48,34 kJ.d ⁻¹

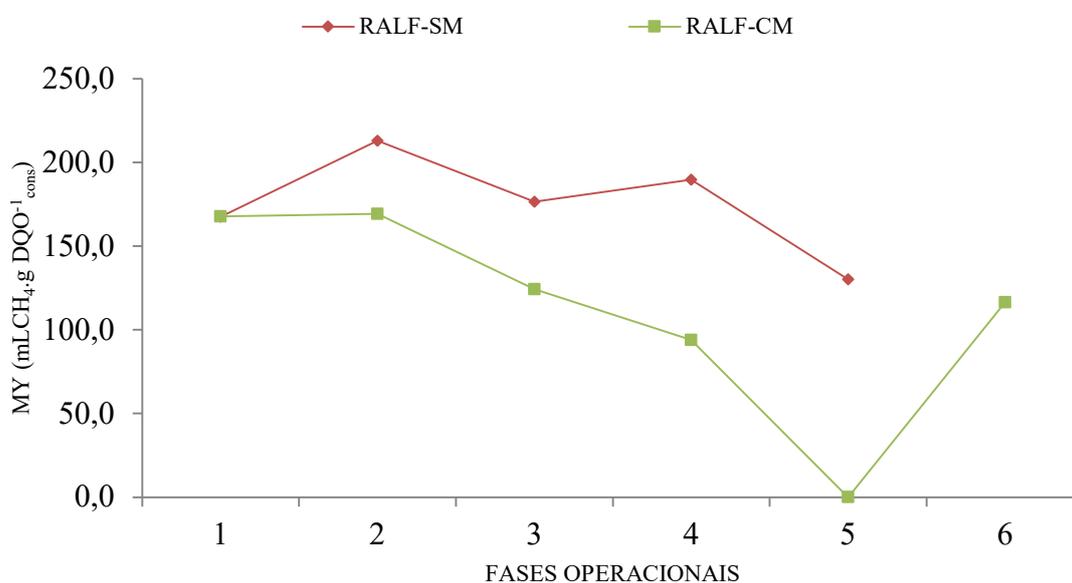
Fonte: Autoria própria.

Conforme apresentado na Tabela 37, verifica-se que a operação em duas etapas promoveu uma remoção da matéria orgânica mais eficaz do que no processo em uma única etapa. Lembrando-se que foram comparadas as fases com valores de carga orgânica semelhantes, com os mesmos tempos de detenção hidráulica. O processo realizado em duas etapas foi capaz de remover 83% da matéria orgânica, enquanto o processo em uma

fase apresentou remoção 8% menor, de 75%. No caso da conversão do glicerol, os valores foram próximos, sendo 96% para uma etapa e 97% para o processo em duas etapas.

Ao comparar os rendimentos de metano observados na Tabela 36, obtidos tanto na operação em uma etapa quanto na operação em duas etapas, observa-se que o processo em duas etapas possibilitou uma melhor performance do reator. Para o RALF-SM, em sua melhor fase, foi observado um rendimento de 213,0 mL CH₄.g DQO⁻¹_{cons}, enquanto que, para a mesma fase do RALF-CM, foi observado um rendimento de 169,3 mL CH₄.g DQO⁻¹_{cons}. Para todas as demais fases, tanto do processo em uma etapa quanto do processo em duas etapas, os resultados de rendimento de metano estão demonstrados na Figura 21.

Figura 21 – Comparação do rendimento de metano observado no RALF-CM e no RALF-SM

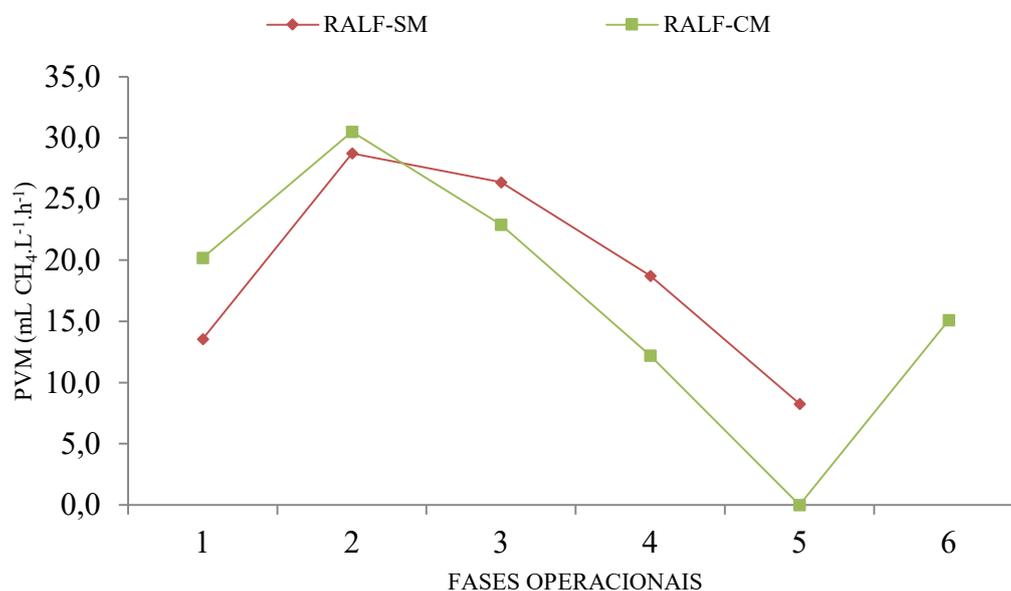


Fonte: Autoria própria.

Após análise da Figura 21, é possível confirmar o fato de que o processo em duas etapas possibilita realmente um melhor desempenho do reator, apresentando, em todas as fases, resultados melhores para rendimento de metano.

Para realizar o comparativo entre as produções volumétricas de metano do RALF-CM e do RALF-SM, é necessário analisar o comportamento dos reatores na Figura 22.

Figura 22 – Comparação da produção volumétrica de metano observada no RALF-CM e no RALF-SM.



Fonte: Autoria própria.

Verificando-se os dados obtidos na Tabela 36 e na Figura 22, observa-se que o RALF-SM não apresentou a maior produção volumétrica de metano, apesar dos melhores valores de rendimento. Para a melhor fase, enquanto o RALF-CM apresentou uma PVM de 30,5 mL CH₄.L⁻¹.h⁻¹, o RALF-SM apresentou 28,8 mL CH₄.L⁻¹.h⁻¹ de PVM. Ao se analisar a Figura 22, percebe-se que, após a Fase ótima (2), os valores de PVM passaram a cair com o aumento da carga orgânica, mesmo que os resultados obtidos para o RALF-SM tenham melhorado em relação ao RALF-CM. Isso pode ter sido um fator crucial para a redução dos resultados para ambos os reatores. O aumento da concentração de substrato imposto aos reatores pode ter alterado a diversidade microbiana presente favorável à produção de metano, talvez tendo seguido por rotas diferentes ao serem submetidas a tais cargas operacionais.

Por fim, como pode ser observado nas Tabelas 36 e 37, o processo em duas fases forneceu os maiores valores energéticos, produzindo 14,17 kJ.d⁻¹ no RALF-A e 34,14 kJ.d⁻¹ no RALF-SM, totalizando 48,34 kJ.d⁻¹. Esse valor global é maior do que o fornecido pelo processo em fase única, pelo RALF-CM, que produziu 45,84 kJ.d⁻¹. Em termos de energia produzida por grama de DQO aplicada, o reator RALF-A gerou 362,7 J.gDQO_{app}⁻¹ e o reator RALF-SM gerou 5264,8 J.gDQO_{app}⁻¹, resultando em um total de 5627,5 J.gDQO_{app}⁻¹, enquanto o reator em fase única RALF-CM gerou 4184,7 J.gDQO

app^{-1} . Assim, o processo em duas fases apresentou uma produção energética cerca de 35% maior do que o processo com reator em estágio único.

Perante o que foi exposto, verifica-se que, além de proporcionar uma conversão e remoção de matéria orgânica eficaz, o processo em duas etapas ainda promoveu um melhor rendimento e produção energética a partir da produção de metano e hidrogênio, algo que não pode ser alcançado com o processo de uma etapa. Conclui-se, portanto, que o processo de duas etapas se mostrou eficaz, o que se mostra de acordo com o esperado ao separar as etapas acidogênica e metanogênica, quando aplicadas as condições adequadas para cada uma.

5.5 Análise de viabilidade econômica

Foi realizada uma breve análise de viabilidade econômica sobre a aplicação do glicerol bruto em estações de tratamento de esgoto existentes, com base nos melhores resultados obtidos no presente estudo. Neste caso, concluiu-se que a melhor etapa foi a Fase 2 da configuração de reatores sequenciais, ou seja, do processo em duas etapas, no qual foram apresentados os melhores valores para remoção global de DQO e de conversão de glicerol.

Considerando-se, supostamente, uma cidade com 250.000 habitantes, e levando-se em conta a contribuição média de efluente de $160 \text{ L.hab}^{-1}.\text{d}^{-1}$, conforme ABNT NBR 7229 (ABNT, 1993), a vazão média diária de esgoto sanitário gerada seria de $40.000 \text{ m}^3.\text{d}^{-1}$ ou $0,46 \text{ m}^3.\text{s}^{-1}$. A concentração de DQO média gerada considerada seria de $400 \text{ mg DQO.L}^{-1}$ (JORDÃO; PESSOA, 2017). Ainda neste cenário hipotético, uma estação de tratamento de esgotos operando com reator anaeróbico como unidade biológica de tratamento possui média de eficiência de remoção de matéria orgânica de 65 % (não levando em consideração o pós-tratamento). Neste caso, a produção teórica de metano nas condições normais de temperatura e pressão seria de $3.640 \text{ m}^3 \text{ CH}_4.\text{d}^{-1}$.

Caso esta ETE adote o sistema de reatores sequenciais, conforme este estudo, suplementando o efluente com glicerol, a concentração de DQO afluente aumentaria, assim como a eficiência no tratamento. Considerando os resultados do presente trabalho, na melhor fase (Fase 2), na qual foram adicionados $1,0 \text{ g DQO.L}^{-1}$ ao esgoto sanitário sintético, a DQO afluente à ETE passaria a ser de $1400 \text{ mg DQO.L}^{-1}$. Assim, devido à introdução de uma nova fonte de matéria orgânica, a eficiência de remoção do reator passaria a ser de 83 %. Neste novo cenário, a produção teórica de metano, em condições

normais de temperatura e pressão, passaria a ser de $16.268 \text{ m}^3 \text{ CH}_4 \cdot \text{d}^{-1}$. Ou seja, a modificação da configuração dos reatores de uma ETE e a suplementação com glicerol bruto mais que quadruplicaria a produção teórica de metano do cenário inicial.

5.6 Análise da comunidade microbiana dos reatores

A partir dos dados resultantes do sequenciamento do gene 16S rRNA, foi realizada a inferência do perfil metabólico a partir da análise dos potenciais genes codificadores de enzimas envolvidas na digestão anaeróbia e degradação do glicerol. Foram analisadas duas amostras do RALF-CM, uma amostra do RALF-A e uma amostra do RALF-SM. Dessas amostras, foram inferidos 5754 diferentes KOs no reator sequencial metanogênico, 6005 no sequencial acidogênico, 5652 no metanogênico controle (Fase 2) e, por fim, 6197 Kos no reator metanogênico controle (Fase 6).

A análise do potencial metabólico baseada nas plataformas KEGG e BRENDA, e as principais enzimas potencialmente envolvidas na conversão do glicerol e bioconversão do hidrogênio e metano encontram-se resumidas na Figura 18. Nela, as vias do fosfoenolpiruvato a sulfoacetaldeído estão simplificadas, indicado pela seta cortada. Além disso, os KOs e principais enzimas de interesse a partir do mapa metabólico de glicerolípídeos do KEGG estão apresentados na Tabela 38 e na Figura 23.

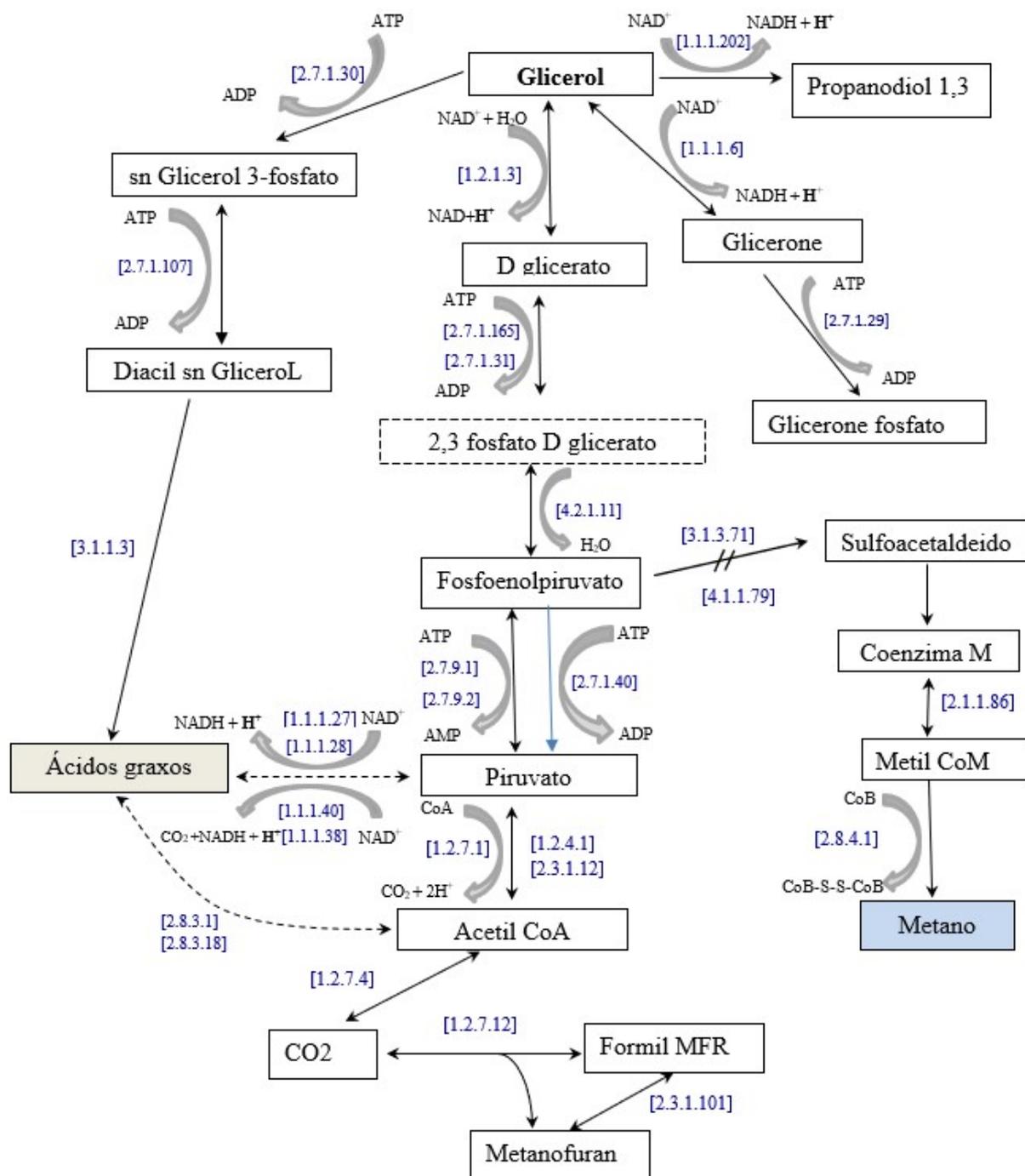
O hidrogênio produzido possivelmente foi gerado majoritariamente nas reações catalisadas pelas seguintes enzimas: aldeído desidrogenase (K00128 - EC 1.2.1.3), enzima 1,3 propanodiol desidrogenase (K00086 - EC 1.1.1.202) e enzima glicerol desidrogenase (K00005 - EC1.1.1.6). A conversão do glicerol foi catalisada em D-glicerato, 3 hidroxipropanol e glicerone respectivamente, como detalhado na Figura 23.

A enzima aldeído desidrogenase (K00128 - EC 1.2.1.3), responsável pela catálise do glicerol em D glicerato, foi inferida em maior proporção no reator metanogênico sequencial, seguido do reator acidogênico sequencial e do reator metanogênico controle na fase 6 (Figura 24-A).

O glicerol pode ser convertido pela enzima 1,3 propanodiol desidrogenase (K00086 - EC 1.1.1.202), em 3 hidroxipropanol, sendo o principal microrganismo atribuído a essa reação o *Clostridium sp.* A maior proporção dessa enzima foi inferida no reator controle metanogênico da Fase 2 (Tabela 38), no qual foi observado *Clostridium sp.* Além disso, no mesmo reator observou-se remoção média de glicerol de 96,6% (com DQO glicerol de $1,0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) e maior produtividade volumétrica de hidrogênio ($1,8 \text{ mL H}_2 \cdot \text{L}^{-1}$

¹.h⁻¹) comparado com as outras duas amostras metanogênicas, resultados que podem ser justificados devido ao maior potencial enzimático inferido neste reator.

Figura 23 – Possíveis rotas metabólicas e enzimas envolvidas na conversão do glicerol, produção de ácidos graxos, hidrogênio e metano



Fonte: Autoria própria.

Tabela 38 – Proporção dos principais Kos (%) inferidos nas quatro amostras analisadas em relação ao metabolismo de degradação glicerolípídeos (map00561), metabolismo de piruvato (map00620) e metabolismo de produção de metano (map00680) de acordo com as vias metabólicas de KEGG

KO	Amostra			
	Met Seq	Acid Seq	Met Cont2	Met Cont6
Metabolismo de Glicerolípídeos (degradação)				
K00086	1,74E-14	1,97E-15	5,21E+00	2,78E-13
K00128	1,21E-01	6,68E-02	9,96E-12	2,24E-02
K15918	1,57E-14	3,46E-14	4,04E-13	8,62E-14
K00863	3,47E-13	1,70E-13	4,13E-13	3,47E-02
K00005	1,04E-01	5,41E-13	2,23E-11	3,37E-12
K00864	6,33E-12	2,93E-02	8,78E-11	5,53E-12
K00865	3,56E-13	2,18E-12	6,03E-11	4,34E-12
K01046	9,44E-02	1,81E-02	1,43E-12	1,02E-12
K00901	4,78E-12	3,64E-13	6,02E-11	4,18E-12
Metabolismo de Piruvato				
K00873	1,28E-01	3,14E-13	1,35E-10	7,37E-12
K01007	4,24E-02	3,51E-02	6,67E-11	6,67E-02
K00029	8,61E-02	3,88E-12	4,73E-12	2,19E-02
K03778	1,48E-01	1,95E-02	1,56E-11	1,21E-12
K00016	3,45E-12	4,11E-02	4,89E-11	3,98E-12
K00027	3,98E-02	8,55E-13	9,16E-11	5,58E-02
K00169	1,10E-13	1,90E-01	2,33E-12	7,46E-14
K00163	2,70E-12	6,37E-02	2,95E-12	1,32E-12
K01689	1,23E-12	3,01E-01	1,13E-10	6,29E-13
K01067	3,90E-14	1,20E-13	1,44E-13	1,16E-14
K00627	1,04E-01	4,52E-02	6,24E-11	3,21E-02
K01026	1,03E-12	9,46E-14	6,68E-01	2,36E-12
K18118	2,49E-12	3,15E-12	4,16E-12	2,89E-12
Metabolismo de Metano (produção)				
K00399	5,86E-15	7,57E-16	1,55E-13	1,19E-14
K00577	3,09E-15	7,57E-16	1,48E-13	1,32E-14
K13039	1,55E-15	4,16E-16	4,92E-14	9,44E-15
K08097	4,85E-13	3,33E-15	3,43E-13	1,90E-14
K00200	1,55E-15	7,41E-16	8,74E-14	1,06E-14
K00192	1,55E-15	4,16E-16	4,92E-14	9,44E-15
K00672	1,55E-15	1,16E-15	1,37E-13	2,00E-14

Fonte: Autoria própria.

Glicerol e NAD⁺ podem ser convertidos pela enzima glicerol desidrogenase (K00005 – EC 1.1.1.6) em glicerone, NADH e H⁺, sendo que a maior proporção dessa enzima foi inferida no reator sequencial metanogênico. Já a enzima glicerol kinase

(K00864 - EC 2.7.1.30), que converte glicerol e ATP em ADP e sn-glicerol 3-fosfato, foi inferida em maiores proporções no reator sequencial acidogênico. O glicerone pode ser convertido em glicerone fosfato pela enzima glicerone kinase (K00863 - EC 2.7.1.29), sendo que a maior proporção dessa enzima foi inferida no reator controle metanogênico da fase 6.

As enzimas glicerato-2 e 3-kinase (K00865 - EC 2.7.1.165 e K15918 - EC 2.7.1.31) são responsáveis pela conversão de glicerato e ATP em ADP e 2,3 fosfato D glicerato, sendo que a proporção de tal enzima foi baixa em toda as amostras analisadas. De forma similar, a enzima diacylglycerol kinase (K00901- EC 2.7.1.107), que catalisa a reação de ATP e 1,2-diacyl-sn-glycerol em ADP + 1,2-diacyl-sn-glycerol 3-phosphate, também foi observada em baixas proporções.

A enzima triacilglicerol lipase (K01046 - EC 3.1.1.3) hidrolisa triglicerídeos em diglicerídeos e posteriormente em monoglicerídeos e ácidos graxos livres, sendo altamente solúvel em água e atuando na superfície das gotículas de óleo. A proporção inferida desta enzima foi maior nos reatores sequenciais metanogênicos e acidogênicos, possivelmente devido às menores concentrações de ácidos voláteis no efluente.

A enzima piruvato sintetase (K00169 - EC 1.2.7.1) catalisa a reação: pyruvate + CoA + 2 oxidized ferredoxin = acetyl-CoA + CO₂ + 2 reduced ferredoxin + 2 H⁺. A maior proporção dessa enzima foi inferida no reator sequencial acidogênico, além de enzimas já mencionadas relacionadas à produção de H⁺. Tal resultado pode ser relacionado com maior PVH deste reator, de 31,15 mLh²/hr/L (Figura 24-B).

A reação catalisada pela enzima piruvato kinase (K00873 - EC 2.7.1.40) converte ATP e piruvato em ADP e fosfoenolpiruvato. Essa enzima foi inferida em maior proporção no reator metanogênico sequencial. Reação similar pode ser catalisada pela enzima água dikinase (K01007 - EC 2.7.9.2) converte o ATP + piruvato + H₂O = AMP + fosfoenolpiruvato + fosfato, que foi inferida em menor proporção no reator metanogênico controle da fase1 em comparação aos outros reatores.

A enzima L-lactate dehydrogenase (K00016 – EC 1.1.1.27) catalisa a reação: (R)-lactate + NAD⁺ = pyruvate + NADH + H⁺. Maior proporção da enzima mencionada foi inferida no reator acidogênico sequencial, enquanto a enzima D-lactate dehydrogenase (K03778 – EC 1.1.1.28), que catalisa a reação: (R)-lactate + a quinone = pyruvate + a quinol, foi inferida em maiores proporções no reator metanogênico sequencial.

A enzima malate dehydrogenase (oxaloacetate-decarboxylating) (K00027 - EC 1.1.1.38), assim como a enzima malate dehydrogenase (oxaloacetate-decarboxylating)

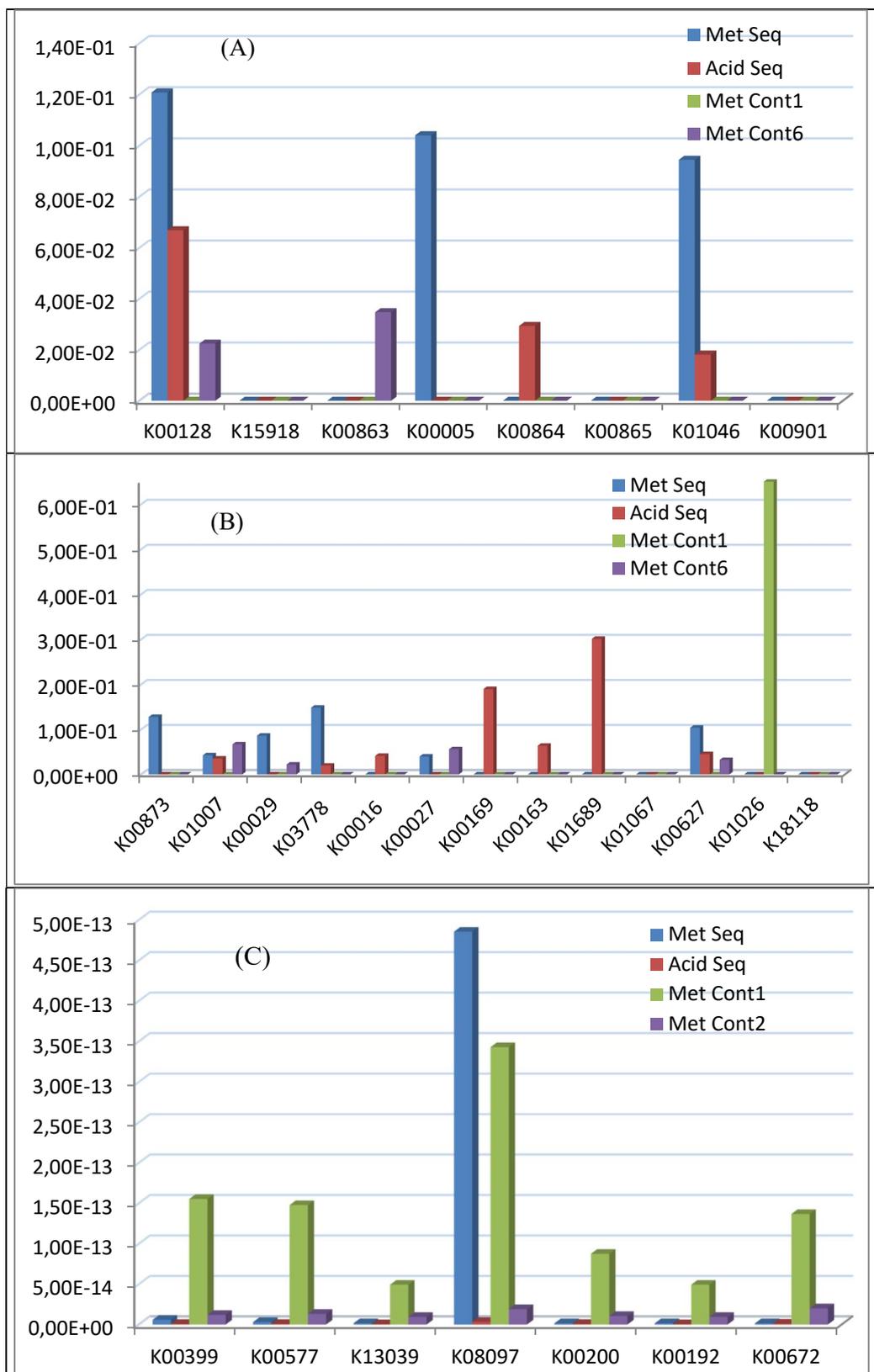
(K00029 - EC 1.1.1.40), catalisa a reação de (S)-malate + NAD⁺ = pyruvate + CO₂ + NADH + H⁺. A maior proporção de EC 1.1.1.38 foi inferida no reator metanogênico controle na Fase 6, seguido do reator metanogênico sequencial. Já a enzima EC 1.1.1.40 foi inferida em maiores proporções no reator metanogênico sequencial seguido do reator metanogênico controle na Fase 6.

A enzima pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring) (K00163 – EC 1.2.4.1) foi inferida em maior proporção no reator acidogênico sequencial. O grupo lipoil da enzima é redutivamente acetilado por EC 1.2.4.1 (K00163), e depois catalisado pela enzima dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase (K00627 - EC 2.3.1.12) pela reação de dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase -- acetyl-CoA + enzyme N6-(dihydrolipoyl)lysine = CoA + enzyme N6-(S-acetyldihydrolipoyl)lysine), em que o grupo acetil é convertido na coenzima A. Essa enzima foi inferida em maior proporção nos reatores sequenciais acidogênico e metanogênico, seguido pelo reator metanogênico na Fase 6.

A enzima 2-fosforo-D-glicerato (K01689 - EC 4.2.1.11), é responsável pela conversão do fosfoenolpiruvato, a maior proporção dessa enzima foi inferida no reator acidogênico sequencial.

A enzima propionate CoA-transferase (K01026 - EC 2.8.3.1) pode catalizar a reação acetyl-CoA + propanoate = acetate + propanoyl-CoA, sendo esta enzima inferida em maior proporção na amostra do reator metanogênico controle na Fase 2 (Figura 24-C). Enquanto a enzima succinyl-CoA: acetate CoA-transferase (K18118 - EC 2.8.3.18) catalisa a reação succinyl-CoA + acetate = acetyl-CoA + succinate, a proporção dessa enzima foi baixa para todas as amostras analisadas.

Figura 24 – Proporção dos principais Kos inferidos nas amostras analisadas em relação ao metabolismo de degradação de glicerolípídeos (A), metabolismo de piruvato (B) e metabolismo de produção de metano (C), de acordo com as vias metabólicas do KEGG.



Fonte: Autoria própria.

Entre as enzimas representados pelos KOs da Figura 24-C, a proporção maior foi inferida na amostra do reator metanogênico da Fase 2, com exceção da enzima fosfosulfolactato sintase (K08097 – EC 4.4.1.19), para qual maior proporção foi inferida no reator metanogênico controle da Fase 2, em comparação as demais amostras.

A enzima formilmetanofuro desidrogenase (K00200 - EC 1.2.7.12) pode catalisar a reação de um aglomerado de formilmetanofurano + H₂O + 2 ferredoxina oxidada [ferro-enxofre] = CO₂ + um metanofurano + 2 aglomerados de ferredoxina reduzida [ferro-enxofre] + 2 H⁺. Essa enzima pode estar envolvida na metanogênese a partir do CO₂, bem como na oxidação da coenzima M em CO₂. A reação é endergônica e é conduzida pelo acoplamento com a heterodissulfeto redutase solúvel CoB-CoM via bifurcação de elétrons. A maior proporção foi inferida no reator metanogênico controle Fase 2 seguido do reator metanogênico controle Fase 6, o qual pode ter convertido o CO₂ em Formil MFR e Metanofuran.

A enzima monóxido de carbono anaeróbico desidrogenase (K00192 - EC 1.2.7.4) pode catalisar a reação CO + H₂O + 2 ferredoxina oxidada = CO₂ + 2 ferredoxina reduzida + 2 H⁺. A proporção maior foi inferida no reator metanogênico controle 1 seguido do reator metanogênico controle Fase 6. Em archaeas metanogênicas existem aglomerados adicionais [4Fe-4S], presumivelmente como parte da cadeia de transferência de elétrons. A enzima monóxido de carbono anaeróbica desidrogenase (CODH), de acordo com Matson, Gora e Leadbetter (2011), é uma enzima chave na via Wood-Ljungdahl (acetil-CoA) para acetogênese, realizada por bactérias homoacetogênicas.

A enzima formilmetanofurano--tetra-hidrometanofterina N-formiltransferase (K00672 - EC:2.3.1.101), catalisa a reação formilmetanofurano + 5,6,7,8-tetrahidrometanofterina = metanofurano + 5-formil-5,6,7,8-Tetrahidrometanofterina. O metanofurano é um complexo 4-substituído furfurilamina e está envolvido na formação de metano a partir de CO₂ na metanogênese. O CO₂ como um substrato metanogênico é inicialmente reduzido e ativado para formilmetanofurano (NGETICH *et al.*, 2022).

A enzima tetrahidrometanofterina S-metiltransferase (K00577 - EC 2.1.1.86) catalisa a reação: 5-metil-5,6,7,8- tetrahidrometanofterina + CoM + 2 Na^{+/in} = 5,6,7,8-tetrahidrometanofterina + 2-(metilsulfanil) ethane-1-sulfonate + 2 Na^{+/out}. Essa enzima está envolvida na formação de metano a partir de CO₂ por archaeas metanogênicas hidrogenotróficas. Nos reatores metanogênicos controles (Fase 2 e Fase 6) foi encontrado maior abundância de metanogênicas hidrogenotróficas do gênero *Metanobacterium* sp. A reação envolve a exportação de um ou dois íons de sódio. A enzima do archaeon

Methanobacterium thermoautotropwhicum é um complexo multienzimático associado à membrana composto por oito subunidades diferentes e contém um grupo prostético 5'-hidroxibenzimidazolil-cobamida, ao qual o grupo metil é ligado durante a transferência.

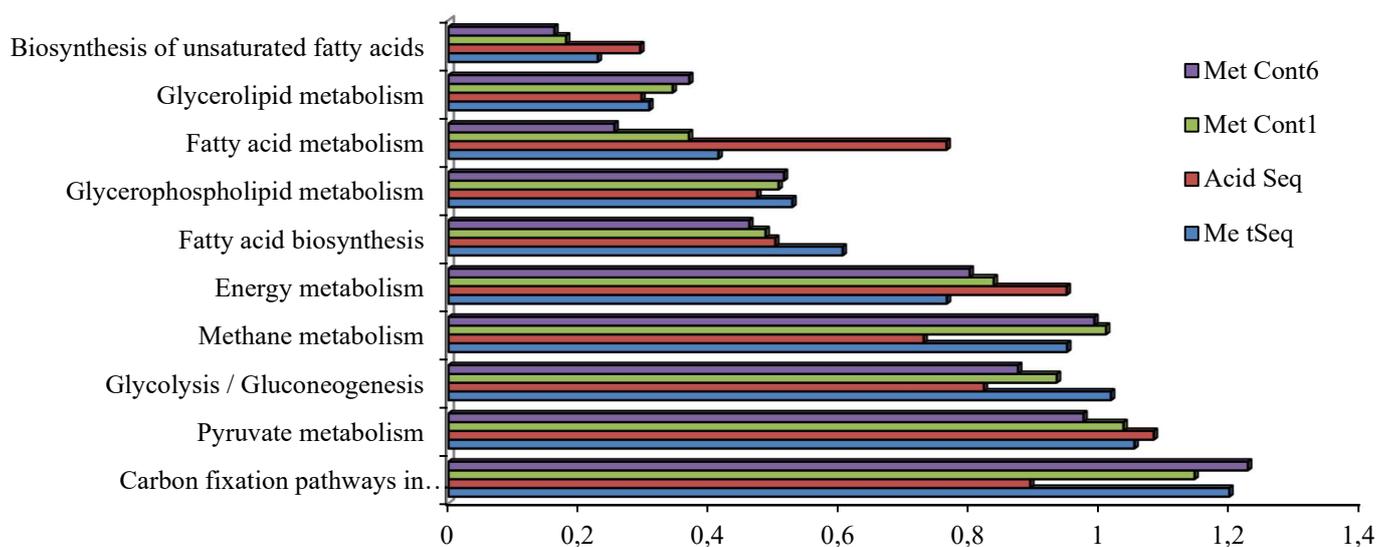
A enzima sulfopyruvate decarboxylase (K13039 - EC 4.1.1.79) catalisa a reação $3\text{-sulfopyruvate} = 2\text{-sulfoacetaldehyde} + \text{CO}_2$. A enzima EC 4.1.1.79 está envolvido na síntese da Coenzima M (GRAUPNER; XU; WHITE, 2000; SARMIENTO; ELLISON; WHITMAN, 2013), responsável pela formação do metano.

A enzima phosphosulfolactate synthase (K08097 - EC 4.4.1.19) catalisa a reação: $(2R)\text{-2-O-phospho-3-sulfolactate} = \text{phosphoenolpyruvate} + \text{sulfite}$. De acordo com Wu et al. (2022), essa enzima também está envolvida na síntese da Coenzima M.

A partir dos dados resultantes do sequenciamento do gene 16S rRNA, foram inferidos 264 genes no sequencial metanogênico, 268 genes no sequencial acidogênico, 263 genes no metanogênia controle1 e 262 genes no metanogênico controle6. Os genes com relevância para esse estudo estão apresentados na Figura 24-C.

Os genes para fixação do carbono, glicólise e metabolismo do metano foram inferidos em menores proporções na amostra do reator acidogênico sequencial. No entanto, o gene responsável pelo metabolismo de ácidos graxos e biossíntese de ácidos graxos insaturados foi maior quando comparado com os reatores metanogênicos, indicando maior potencial de produção de energia, conforme pode ser visto na Figura 25.

Figura 25 – Vias metabólicas de interesse para obtenção de metano a partir da degradação do glicerol em sistema de digestão anaeróbia, inferidas a partir do sequenciamento do gene 16S rRNA para as quatro amostras analisadas.



Fonte: Autoria própria.

6 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos ao longo dessa operação, é possível inferir que a codigestão de glicerol e esgoto sanitário sintético é uma alternativa viável, tanto para o tratamento do resíduo quanto para a produção de energia, com hidrogênio e metano. Estudando-se o aumento na carga orgânica no substrato, a partir do glicerol adicionado, é possível perceber que a DQO interfere diretamente no processo de metanogênese, sendo suportado até um valor determinado e, posteriormente, reduzindo a eficiência na remoção da matéria orgânica no efluente. Além disso, também é perceptível a forte influência na produção de biogás gerado na codigestão de glicerol e esgoto sanitário sintético. Com relação ao TDH, também é possível concluir que existe uma influência nos parâmetros e na eficiência do processo, principalmente ao se comparar os resultados para mesmos valores de DQO adicionados ($3,0 \text{ g DQO.L}^{-1}$) com o aumento progressivo dos tempos de detenção hidráulica. Quanto maior o TDH, melhores os resultados para remoção de DQO e eficiência na produção de biogás.

A melhor condição para a codigestão de esgoto e glicerol, estudada no RALF-CM, ao se analisar o acréscimo de glicerol, ocorreu para concentração teórica de matéria orgânica de $1,5 \text{ g DQO.L}^{-1}$ com o TDH de 8 h. Nesta condição, denominada no estudo de Fase 2, obteve-se uma eficiência de 75% de remoção de DQO e 96% de conversão do glicerol. Nesta mesma fase, obteve-se o maior valor de rendimento de metano do RALF-CM, de $169,3 \text{ mL CH}_4.\text{g DQO}^{-1}_{\text{cons}}$, com 70% da composição de biogás sendo CH_4 , além da maior produtividade encontrada para este reator, de $30,5 \text{ mL CH}_4.\text{L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Além disso, os resultados obtidos para as demais fases podem indicar que o reator RALF, com codigestão de esgoto sanitário e glicerol, poderia atingir valores consideráveis, mesmo com o aumento de DQO caso houvesse o aumento do TDH acima de 24h. Este seria, portanto, um ponto de partida para futuros estudos.

Para o reator acidogênico, RALF-A, os melhores resultados foram obtidos na Fase 2. Os dados de remoção de DQO se mantiveram baixos ao longo do experimento, sendo de 28 % na Fase 2, estando em conformidade com a literatura apresentada. Quanto à conversão de glicerol, o reator apresentou o resultado de 76 % em sua melhor fase. O biogás produzido no RALF-A foi composto exclusivamente por H_2 e CO_2 , o que confirma a eficiência do tratamento do lodo e a supressão da metanogênese no reator. Durante a Fase 2, o biogás analisado foi composto por 75,7 % de hidrogênio. O rendimento (HY) e a produção volumétrica (PVH) de hidrogênio foram, respectivamente, de $1,49 \text{ mmol H}_2.\text{g}$

DQO⁻¹_{add} e 31,2 mL H₂.L⁻¹.h⁻¹. Por fim, a análise de metabólitos do RALF-A não detectou ácidos intermediários; no entanto, foi capaz de detectar a presença de etanol, na concentração de 456 mg_{etanol}.L⁻¹.

No que se refere ao reator sequencial metanogênico, RALF-SM, alimentado com o efluente do reator RALF-A, os melhores resultados variaram ao longo das fases. Os melhores dados para remoção de matéria orgânica foram apresentados na Fase 2, com 75 %. Já a conversão de glicerol, para a mesma fase, foi de 77 %. Neste caso, independente da fase, os valores de glicerol afluente ao reator foram muito baixos, resultando em concentrações de glicerol no efluente abaixo de 0,05 g.L⁻¹, o que comprova que o glicerol não apresentou dificuldades em ser convertido. O biogás produzido pelo reator foi composto de metano, sendo o melhor resultado encontrado na Fase 1, com 82,8 % de CH₄, seguido da Fase 2 com 77,0 %. O rendimento (MY) e a produção volumétrica (PVM) de metano foram maiores durante a Fase 2, sendo, respectivamente, de 213,0 mL CH₄.g DQO⁻¹_{cons} e 28,8 mL CH₄.L⁻¹.h⁻¹.

Também é possível concluir, a partir dos resultados discutidos anteriormente, a viabilidade da digestão anaeróbia em duas etapas, ou seja, a aplicação de um reator acidogênico seguido de um reator metanogênico, capazes de proporcionar melhorias ao processo anaeróbio em uma única etapa. O processo de duas etapas, composto pelo conjunto RALF-A + RALF-CM, foi capaz de, não só, elevar os valores de rendimento na produção de CH₄ e remoção de DQO, mas também criar a possibilidade de aproveitamento de H₂ e possíveis metabólitos que poderiam ter sido produzidos pelo reator acidogênico. Enquanto o RALF-CM apresentou produção máxima de CH₄ de 169,3 mL CH₄.g DQO⁻¹_{cons}, o RALF-SM atingiu o valor para produção de CH₄ de 213,0 mL CH₄.g DQO⁻¹_{cons}, cerca de 26% a mais que o primeiro. Em termos de potencial energético, o processo em duas fases produziu 14,17 kJ.d⁻¹ no RALF-A e 34,14 kJ.d⁻¹ no RALF-SM, totalizando 48,34 kJ.d⁻¹, enquanto o processo em fase única produziu 45,84 kJ.d⁻¹, com o RALF-CM. Além disso, a produção energética, em termos de energia produzida por grama de DQO aplicada, foi cerca de 35% maior no conjunto RALF-A + RALF-SM do que o processo somente com RALF-CM. No caso da matéria orgânica, o RALF-CM, o qual realizou a digestão sozinho em uma única etapa, atingiu a marca de 75% de remoção de DQO. Por sua vez, o conjunto RALF-A + RALF-SM apresentou uma remoção global, ou seja, ao final das duas etapas da digestão, de 83%, 8% a mais que a digestão em uma etapa. Ainda nessa mesma conjuntura de digestão em duas fases, a etapa acidogênica representou uma produção de H₂ de 1,49 mmol H₂.g DQO⁻¹_{add}. Entretanto, neste estudo,

as análises cromatográficas para metabólitos no reator acidogênico RALF-A não detectaram nenhum ácido intermediário, sendo necessária a execução de estudos futuros para complementar essa informação.

A partir dos dados de remoção de matéria orgânica e de rendimento de metano encontrados na melhor fase do processo de uma etapa (Fase 2) e do processo de duas etapas (Fase 2), tornou-se possível a realização de um estudo básico, preliminar, sobre a viabilidade econômica da aplicação de glicerol em ETEs. Tal estudo indicou que a adaptação dos reatores de uma ETE para a configuração com RALF em duas etapas, e a adição de glicerol ao efluente, poderia resultar em um aumento na eficiência de remoção de matéria orgânica e um aumento na eficiência energética da estação (de mais de 4x), podendo torná-la autossuficiente. Portanto, a capacidade de produção de biogás que já se encontra instalada nas ETEs do país pode ser viabilizada e aumentada por meio da adição de glicerol ao esgoto sanitário afluente à estação, a partir do melhoramento no desempenho dos reatores anaeróbios.

Por fim, no que se refere às análises da comunidade microbiana dos reatores, os dados de sequenciamento do gene 16 sRNA e do potencial metabólico, baseados nas plataformas KEGG e BRENDA, foram estudados. Os genes responsáveis pelo metabolismo de metano e as vias de fixação de carbono e glicólise foram encontrados em maiores proporções nas amostras dos reatores RALF-SM e RALF-CM. Por esse motivo, as principais enzimas ligadas ao metabolismo de produção de metano foram inferidas nesses mesmos reatores. Por outro lado, os genes para fixação do carbono e glicólise e ligados ao metabolismo do metano foram encontrados em proporções menores no reator RALF-A. Enquanto os genes responsáveis pelo metabolismo de ácidos graxos e biossíntese de ácidos graxos insaturados foram inferidos em maiores proporções, quando comparados aos reatores metanogênicos, assim como o gene do metabolismo para produção de energia, indicando maior potencial de produção de energia neste reator. Em consonância, enzimas relacionadas à produção de H^+ foram encontradas em abundância no RALF-A, o que pode estar relacionado ao maior valor de PVH no reator.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Diante dos resultados obtidos ao longo deste trabalho, alguns tópicos são sugeridos para a realização de trabalhos futuros:

- a) avaliar a codigestão de esgoto sanitário e glicerol bruto em reatores RALF com TDH acima de 24 horas, favorecendo a mistura e o contato do substrato com o meio suporte;
- b) analisar a codigestão com glicerol aplicando resíduo *in natura* (esgoto sanitário) em reatores RALF;
- c) realizar um estudo de viabilidade econômica mais aprofundado dos processos para ambas as configurações (fase única e duas fases) e determinar aquela mais adequada economicamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 7229**: Projeto, construção e operação de sistemas de tanques sépticos. Rio de Janeiro, 1993. 15 p.

ADAMES, L. V. **Co-digestão de glicerol bruto e esgoto sanitário visando produção de biogás em reatores anaeróbios horizontais de leito fixo**. 2022. 173 f. Tese (Doutorado). Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2022.

ADEKUNLE, K.; OKOLIE, J. A Review of Biochemical Process of Anaerobic Digestion. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 6, p. 205 – 212, 2015. <https://doi.org/10.4236/abb.2015.63020>.

ALBUQUERQUE, M. F. G. **Tratamento do glicerol bruto proveniente da produção de biodiesel visando a geração de metano**. 2014. 80f. Dissertação (Mestrado) – Biotecnologia, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2014.

ALMEIDA, P. S. **Produção de hidrogênio e metano a partir da codigestão de soro de queijo e glicerol em reator anaeróbio de leito fluidizado**. 215f. Tese (Doutorado) – Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2021.

APHA – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22. ed. Washington: American Public Health Association, 2012.

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, 2009.

ANA – AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS (Brasil). **Atlas esgotos: despolição de bacias hidrográficas**. Brasília: ANA, 2017. 265 p.

ANUKAM, A.; MOHAMMADI, A.; NAQVI, M.; GRANSTRÖM, K. A Review of the Chemistry of Anaerobic Digestion: Methods of Accelerating and Optimizing Process Efficiency. **Processes**, v. 7, p. 504, 2019. <https://doi.org/10.3390/pr7080504>.

ANP – AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (Brasil). **Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis**. Rio de Janeiro: ANP, 2022. 266 p. Brasil, 2022.

ARAÚJO, J. C. **Caracterização e evolução do biofilme em reator anaeróbio de leito fluidificado alimentado com esgoto sanitário sintético**. 1995. 158p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1995.

AWE, O.W.; ZHAO, Y.; NZIHO, A.; MINH, D.P.; LYCZKO, N. A review of biogas utilisation, purification and upgrading technologies. **Waste and Biomass Valorization**, v. 8, p. 267 – 283, 2017. <https://doi.org/10.1007/s12649-016-9826-4>.

AYABE, D. N. **Co-digestão anaeróbia de glicerol residual com esgoto sanitário visando o aumento da produção de metano**. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

AZADI, P.; MALINA, R.; BARRETT, S.R.H.; KRAFT, M. The Evolution of de biofuel Science. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 76, p. 1479 – 1484, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.11.181>.

BARROS, A. R. **Influência de diferentes materiais suporte na produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidizado**. 2009. 101 f. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

BARROS, F. G. **Emprego de reator aeróbio de leito fluidificado para nitrificação de efluentes de tratamento secundário**. 142 p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 1989.

BEATRIZ, A.; ARAÚJO, Y. J. K.; DE LIMA, D. P. Glycerol: a brief history and their application in stereoselective syntheses. **Química Nova**, v. 34, n. 2, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000200025>.

BIEBL, H.; MENZEL, K.; ZENG, A. P., DECKWER, W. D. Microbial production of 1,3-propanediol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, p. 289 – 297, 1999.

BIEBL, H. Fermentation of glycerol by *Clostridium pasteurianum* – batch and continuous culture studies. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 18 – 26, 2001.

BONDIOLI, P.; DELLA BELLA, L. An alternative spectrophotometric method for the determination of free glycerol in biodiesel. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 107, n. 3, p. 153–157, 2005.

BOONSAWANG, P. *et al.* Effect of nitrogen and phosphorus on the performance of acidogenic and methanogenic reactors for treatment of biodiesel wastewater. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 39, n.6, p. 643-649, 2014.

CAMPOS, J. R. **Remoção de DQO e de nitrogênio em um sistema de três reatores biológicos de filme fixo em série**. 1989. 177 f. Tese (Livre-Docência) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1989.

CAMPOS, J. R. **Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbio e disposição controlada no solo**. Rio de Janeiro: ABES, 1999.

CAMPOS, J. R.; PEREIRA, J. A. R. Reator Anaeróbio de Leito Fixo Expandido/Fluidizado. In: Campos, J.R. (Coord.) **Tratamento de Esgotos Sanitários por**

Processos Anaeróbio e Disposição Controlada no Solo, PROSAB/ABES. p. 199-219, 1999.

CAMPOS, C. M. M.; CARMO, F. R.; BOTELHO, C. G.; COSTA, C. C. Development and operation of an upflow anaerobic sludge blanket reactor (UASB) treating liquid effluent from swine manure in laboratory scale. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, p. 140-147, 2006.

CASTRO, T. M. **Codigestão anaeróbia de lixiviado de aterro industrial e glicerina**. 120 f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, Cascavel, PR. 2018.

CASTRO, T. M. et al. Anaerobic co-digestion of industrial landfill leachate and glycerin: methanogenic potential, organic matter removal and process optimization. **Environmental Technology**, v. 41, n. 20, p. 2583-2593, 2019. <https://doi.org/10.1080/09593330.2019.1575915>.

CHENG, K. K. *et al.* Pilot-scale production of 1,3-propanediol using *Klebsiella pneumoniae*. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 4, p. 740–744, 2007.

CHERNICHARO, C. A. L. **Reatores Anaeróbios – Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias**, v. 5. 2ª Ed. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental UFMG, 1997.

CHERNICHARO, C. A. L.; **Biological wastewater treatment series – Anaerobic Reactors**, vol. 4. IWA Publishing, London, UK, 2007.

CHOOKAEW, T.; O-THONG, S.; PRASERTSAN, P. biohydrogen production from crude glycerol by immobilized *Klebsiella* sp. TR17 in a UASB reactor and bacterial quantification under non-sterile conditions. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 18, p.9580-9587, 2014.

CNPE – Conselho Nacional de Política Energética. **Resolução nº 03, de 20 de março de 2023**. Altera a Resolução CNPE nº 16, de 29 de outubro de 2018, que dispõe sobre a evolução da adição obrigatória de biodiesel ao óleo diesel vendido ao consumidor final, em qualquer parte do território nacional, e dá outras providências. Diário Oficial da União, edição 61, seção 1, p. 2, 2023. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/despacho-do-presidente-da-republica-473383252>. Acesso em: 20 mai. 2023.

COSTA, T. B. **Produção de hidrogênio e metano a partir de glicerol bruto e cultura mista em reatores anaeróbios de leito fluidizado termofílicos**. 2017. 168 f. Dissertação (Mestrado). Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2017.

COSTA, V. L.; KOVALESKI, J. L.; JUNIOR, P. P. A.; MATOS, E. A. S. A. A introdução do biodiesel na matriz energética brasileira: contextualização histórica e o processo de produção. **Revista Brasileira de Energia**, v. 19, n. 2, p. 71 – 89, 2013.

CUBA TERAN, F. X. **Tratamento de esgotos sanitários empregando reator anaeróbio de leito fluidificado: desempenho do reator e estudo do biofilme**. 258p.

Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 1995.

DABDOUB, M. J.; BRONZEL, J. L.; RAMPIN, M. A. Biodiesel: a critical overview on the current status and perspectives at the academy and industry. **Química Nova**, v. 32, n. 3, São Paulo, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000300021>.

DE SOUSA, J. T.; VAZOLLER, R. F.; FORESTI, E. Phosphate removal in an UASB reactor treating synthetic substrate simulating domestic sewage. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 14, n. 4, 1997. <https://doi.org/10.1590/S0104-66321997000400002>.

DHARMADI, Y.; MURARKA, A.; GONZALES, R. Anaerobic Fermentation of Glycerol by *Escherichia coli*: a New Platform for Metabolic Engineering. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 94, n. 5, p. 821 – 829, 2006.

DILALLO, R.; ALBERTSON, O. E. Volatile Acids by Direct Titration. **Journal of Water Pollution Control Federation**, v. 33, n. 4, p. 356–365, 1961.

DINH, N. T. *et al.* Changes in the microbial community during the acclimation stages of the methane fermentation for the treatment of glycerol. **Biomass and Bioenergy**, v. 68, p. 240 – 249, 2014.

DOUNAVIS, A. S.; NTAIKOU, I.; LYBERATOS, G. Production of biohydrogen from crude glycerol in a upflow column bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 198, p. 701-708, 2015.

DUBOIS, M. *et al.* Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, mar. 1956. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac60111a017>.

EDWARDS, V. H. The influence of high substrate concentrations on microbial kinetics. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 12, p. 679 – 712, 1970.

FERREIRA, J. S. **Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidizado a partir de glicerol bruto sob condições termofílicas**. 107f. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2014.

FORSBERG, C. W. Production of 1,3-Propanediol from Glycerol by *Clostridium acetobutylicum* and Other *Clostridium* Species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 639 – 643, 1987. <https://doi.org/10.1128/aem.53.4.639-643.1987>.

FOUNTOULAKIS, M. S.; MANIOS, T. Enhanced methane and hydrogen production from municipal solid waste and agro-industrial by-products co-digested with crude glycerol. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 3043-3047, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.01.016>.

FOUNTOULAKIS, M. S.; PETOUSHI, I.; MANIOS, T. Co-digestion of sewage sludge with glycerol to boost biogas production. **Waste Management**, v. 30, n. 10, p. 1849-1853, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2010.04.011>.

GARCIA, C. C. B. **Codigestão anaeróbia de glicerol residual com esgoto sanitário em reator híbrido visando ao aumento da produção de biogás**. 2019. 100 f. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

GIOANNIS, G.; MUNTONI, A.; POLETTINI, A.; POMI, R. A review of dark fermentative hydrogen production from biodegradable municipal waste fractions. **Waste Management**, v. 33, n. 6, p. 1345 – 1361, 2013.

GRAUPNER, M.; XU, H.; WHITE, R. H. Identification of the gene encoding sulfopyruvate decarboxylase, an enzyme involved in biosynthesis of coenzyme M. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 17, p. 4862-4867, 2000.

GOLDEMBERG, J. Atualidade e Perspectivas no Uso de Biomassa para Geração de Energia. *Revista Virtual de Química*, v. 9, n. 1, p. 15–28, 2016.

INCE, O. Performance of a two-phase anaerobic digestion system when treating dairy wastewater. **Water Research**, v. 32, n. 9, p. 2707-2713, 1998.

ITO, T. *et al.* Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, n. 3, p. 260-265, 2005.

JORDÃO, E. P.; PESSOA, C. A. **Tratamento de Esgotos Domésticos**. 7ª edição. Rio de Janeiro: ABES, 2017.

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

KIM, S. -H.; HAN, S. -K.; SHIN, H. -S. Effect of substrate concentration on hydrogen production and 16S rDNA-based analysis of the microbial community in a continuous fermenter. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 1, p. 199–207, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.06.013>.

KNOTHE, G.; KRAHL, J.; GERPEN, J. V.; RAMOS, L. P. **Manual de Biodiesel**. São Paulo: Editora Blucher, 2006.

KRISHNAN, S.; DIN, M. F. M.; TAIB, S. M.; LING, Y. E.; PUTEH, H.; MISHRA, P.; NASRULLAH, M.; SAKINAH, M.; WAHID, Z. A.; RANA, S.; SINGH, L. Process constraints in sustainable bio-hythane production from wastewater: technical note. **Bioresource Technology Reports**, v. 5, p. 359-63, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2018.05.003>.

LO, Y. C. *et al.* Dark fermentative hydrogen production with crude glycerol from biodiesel industry using indigenous hydrogen-producing bacteria. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 35, p.15815-15822, 2013.

LOBATO, C. S.; CHERNICHARO, C. A. L.; SOUZA, C. L. Estimates of methane loss and energy recovery potential in anaerobic reactors treating domestic wastewater. **Water Science and Technology**, v. 66, n. 12, p. 2745 – 2753, 2012. <https://doi.org/10.2166/wst.2012.514>.

LOGAN, M.; TAN, L. C.; NZETEU, C. O.; LENS, P. N. L. Effect of selenate on treatment of glycerol containing wastewater in UASB reactors. **Renewable Energy**, v. 206, p. 97 – 110, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2023.01.106>.

LOVATO, G. *et al.* Effect of feed strategy on methane production and performance of an AnSBBR treating effluente from biodiesel production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, n. 8, p. 2007 – 2029, 2012.

MALINOWSKY, C. **Avaliação da digestão anaerobia em duas fases de resíduos alimentares em escala piloto**. 2021. 138 f. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2021.

MANGAYIL, R.; KARP, M.; SANTALA, V. Bioconversion of crude glycerol from biodiesel production to hydrogen. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 17, p. 12198 – 12204, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.06.010>.

MARAGNO, A. L. F. C. **Tratamento de águas residuárias de baixa concentração de matéria orgânica através do emprego de reator anaeróbio de leito fluidificado**. 117 p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 1988.

MARCHAIM, U.; KRAUSE, C. Propionic to acetic acid ratios in overloaded anaerobic digestion. **Bioresource Technology**, v. 43, n. 3, p. 195-203, 1992.

MARÇOM, R. O. **Pré-tratamento da glicerina bruta gerada na produção de biodiesel por transesterificação de óleos vegetais e gordura animal**. 2010. 103 f. Dissertação (Mestrado). Pós-Graduação em Agroenergia, Universidade Federal do Tocantins, Palmas. 2010.

MARU, B. T. *et al.* Biohydrogen production from glycerol using *Thermotoga* spp. **Energy Procedia**, v. 29, p. 300–307, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.egypro.2012.09.036>.

MATA-ALVAREZ, J.; DOSTA, J.; MACÉ, S.; ASTALS, S. Codigestion of solid wastes: a review of its uses and perspectives including modeling. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 31, n. 2, p. 99-111, 2011. <https://doi.org/10.3109/07388551.2010.525496>.

MATSON, E. G.; GORA, K. G.; LEADBETTER, J. R. Anaerobic carbon monoxide dehydrogenase diversity in the homoacetogenic hindgut microbial communities of lower

termites and the wood roach. **PloS one**, 6(4), e19316, 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019316>.

MEHER, L. C.; SAGAR, D. V.; NAIK, S. N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification – a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 10, n. 3, p. 248 – 268, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2004.09.002>.

MENDONÇA, N. M. **Caracterização do material suporte e estudo da partida de um reator anaeróbio de leito expandido utilizado no tratamento de esgoto sanitário**. 190 p. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1998.

MENDONÇA, N. M. **Tratamento de esgoto sanitário empregando reator de leito expandido em escala plena com zonas anaeróbia e aeróbia sobrepostas: concepção, construção e operação**. 280 p. Tese (Doutorado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.

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. **Industrial Crops and Products**, v. 198, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111586>.

METCALF, L; EDDY, H. P. **Tratamento de efluentes e recuperação de recursos**. 5ª ed. Porto Alegre: AMGH, 2016.

MOCKAITIS, G.; RATUSZNEI, S. M.; RODRIGUES, J. A. D.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. Anaerobic whey treatment by a stirred sequencing batch reactor (ASBR): effects of organic loading and supplemented alkalinity. **Journal of Environmental Management**, v. 79, p. 198-206, 2006.

MOSEY, F. E. Mathematical modelling of the anaerobic digestion process: regulatory mechanisms for the formation of short-chain volatile acids from glucose. **Water Science and Technology**, v. 15, n. 8-9, p. 209-232, 1983.

MOTA, C. J. A.; da SILVA, C. X. A.; GONÇALVES, V. L. C. Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. **Química Nova**, v. 32, n. 3, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000300008>.

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, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.10.060>.

NAZARETH, T. C. **Produção microbiológica de ácido propiônico, 1,3-propanodiol e hidrogênio a partir de glicerol bruto em reator anaeróbio de leito fluidizado**. 111f. Dissertação (Mestrado) – Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015.

NGETICH, D. K.; BETT, R. C.; GACHUIRI, C. K.; KIBEGWA, F. M. Diversity of gut methanogens and functional enzymes associated with methane metabolism in smallholder

dairy cattle. **Archives of Microbiology**, 204(10), n. 608, 2022. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-03187-z>.

NICIURA, L. C. **Avaliação do uso da banda de rodagem de pneus inservíveis triturada como suporte ao desenvolvimento de biofilmes em um reator anaeróbio de leite expansível**. 2005. 204 f. Tese (Doutorado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

NOGUEIRA, L. A. H.; CARDOSO, R. B. Perspectivas da Matriz Energética Mundial e no Brasil. **O Setor Elétrico**, v. 1, p. 32 – 43, 2007.

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 leite fluidificado**. 142f. Dissertação (Mestrado). Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2016.

PEIXOTO, G. **Sistema fermentativo de duas fases para a produção de hidrogênio e metano a partir de esgoto sanitário combinado com águas residuárias industriais**. 2011. 214 f. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

PENTEADO, E. D.; LAZARO C. Z.; SAKAMOTO, I. K.; ZAIAT, M. Influence of seed sludge and pretreatment method on hydrogen production in packed-bed anaerobic reactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 14, p. 6137–6145, 2013.

PEREIRA, E. L.; CAMPOS, C. M. M.; MONTERANI, F. Efeitos do pH, acidez e alcalinidade na microbiota de um reator anaeróbio de manta de lodo (UASB) tratando efluentes de suinocultura. **Revista Ambiente & Água - An interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 4, n. 3, p. 157-168, 2009.

PEREIRA, J. A. R. **Concepção, construção e operação de reator anaeróbio de leite expandido, em escala real, para tratamento de esgoto sanitário**. 339 p. Tese (Doutorado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2000.

PHUKINGNGAM, D. *et al.* Anaerobic baffled reactor treatment of biodiesel-processing wastewater with high strength of metanol and glycerol: reactor performance and biogas production. **Chemical Papers**, v. 65, n. 5, p. 644 – 651, 2011.

POHLAND, G. F.; GHOSH, S. Developments in anaerobic treatment process. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 2, p. 85-106, 1971.

POLETO, L.; SOUZA, P.; MAGRINI, F.E.; BEAL, L.L.; TORRES, A.P.R.; de SOUSA, M.P.; LAURINO, J.P.; PAESI, S. Selection and identification of microorganisms present in the treatment of wastewater and activated sludge to produce biohydrogen from glycerol. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 7, p. 4374 – 4381, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.06.051>.

PRAKASH, J. *et al.* Bio-hydrogen production by co-digestion of domestic wastewater and biodiesel industry effluent. **PLoS ONE**, 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199059>.

PROBIOGÁS. **Guia técnico de aproveitamento energético de biogás em estações de tratamento de esgoto**. Ministério das Cidades, Deutsche Gesellschaft für Internationale Zusammenarbeit GmbH (GIZ). Brasília, DF: Ministério das Cidades, 2017. 183 p.: il. (Aproveitamento energético de biogás em estações de tratamento de esgoto: 1). Brasil, Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental, 2017.

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

RIPLEY, A. L. E.; BOYLE, W. C.; CONVERSE, J. C. Improved Alkalimetric Monitoring for Anaerobic Digestion of High-Strength Wastes. v. 58, n. 5, p. 406–411, 1986.

RODRIGUES, C. V.; SANTANA, K. O.; NESPECA, M. G.; RODRIGUES, A. V.; PIRES, L. O.; MAINTINGUER, S. I. Energy valorization of crude glycerol and sanitary sewage in hydrogen generation by biological processes. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 45, n. 21, p. 11943-11953, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.02.168>.

SAMUL, D.; LEJA, K.; GRAJEK, W. Impurities of crude glycerol and their effect on metabolite production. **Annals of Microbiology**, v. 64, n. 3, p. 891 – 898, 2014. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0767-x>.

SANTIBÁÑEZ, C.; VARNERO, M. T.; BUSTAMANTE, M. Residual Glycerol From Biodiesel Manufacturing, Waste Or Potential Source Of Bioenergy: A Review. **Chilean journal of agricultural research**, v. 71, n. 3, p. 469 – 475, 2011.

SANTOS, H. R. **Aplicação de coagulante no afluente do reator anaeróbio de leite expandido alimentado com esgoto sanitário**. 166p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2001.

SANTOS, S. C. *et al.* Continuous thermophilic hydrogen production and microbial community analysis from anaerobic digestion of diluted sugar cane stillage. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 17, p. 9000–9011, jun. 2014. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0360319914009690>.

SARMIENTO, F.; ELLISON, C. K.; WHITMAN, W. B. Genetic confirmation of the role of sulfopyruvate decarboxylase in coenzyme M biosynthesis in *Methanococcus maripaludis*. **Archaea**, v. 2013, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/185250>.

SAWASDEE, V.; HAOSAGUL, S.; PISUTPAISAL, N. Co-digestion of waste glycerol and glucose to enhance biogas production. **ScienceDirect**, v. 44, n. 56, p. 29575-29582, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.03.144>.

SHIDA, G. M. **Produção de hidrogênio e ácidos orgânicos por fermentação acidogênica em reator anaeróbio de leito fluidificado**. 2008. 105 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento, Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

SILVA, F. M. S. Hydrogen and methane production in a two-stage anaerobic digestion system by co-digestion of food waste, sewage sludge and glycerol. **Waste Management**, v. 76, p. 339-349, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.02.039>.

SILVA, G. P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 1, p. 30-39, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.07.006>.

SILVA, R. C. **Tratamento de esgoto sanitário em um reator de leito expandido em escala plena, operado com regiões anaeróbia e aeróbia sobrepostas**. 192p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

SIMAN, R. R. **Reator de leito expandido em escala plena com zonas anaeróbia e aeróbia sobrepostas: Remoção conjunta de matéria orgânica e nutrientes e estudo do comportamento microbiológico do biofilme, por respirometria e microsensor de OD**. 276p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

SIMÕES, A. N. **Processamento do glicerol bruto em reatores anaeróbios de leito fluidificado, acidogênico e metanogênico, em temperatura mesofílica**. 2017. 147 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento, Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

SIVAGURUNATHAN, P.; KUPPAM, C.; MUDHOO, A.; SARATALE, G. D.; KADIER, A.; ZHEN, G.; CHATELLARD, L.; TRABLY, E.; KUMAR, G. A comprehensive review on two-stage integrative schemes for the valorization of dark fermentative effluents. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 38, p. 868-882, 2018. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1416578>.

SOARES, C. M. T.; FEIDEN, A.; TAVARES, S. G. Fatores que influenciam o processo de digestão anaeróbia na produção de biogás. **Nativa**, v. 5, p. 522 – 528, 2017.

SPEECE, R. E. *Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters*. 1 ed. Archae Press, Tennessee, USA, 394 p. 1996.

SWITZENBAUM, M. S.; JEWELL, W. J. **Anaerobic attached film expanded bed reactor for the treatment of dilute organic wastes**. Estados Unidos: 1978 <https://doi.org/10.2172/6085589>.

TAKEDA, P. Y.; GOTARDO, J. T.; GOMES, S. D. Anaerobic co-digestion of leachate and glycerol for renewable energy generation. **Environmental Technology**, 2020. <https://doi.org/10.1080/09593330.2020.1818832>.

TAN, H. W.; ABDUL AZIZ, A. R.; AROUA, M. K. Glycerol production and its applications as a raw material: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 118-127, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.06.035>.

TANGKATHITIPONG, P.; INTANOO, P.; CHAVADEJ, S. Hydrogen and methane production from biodiesel wasteqater with added glycerine by using two-stage anaerobic sequencing batch reactor (ASBR). **Chemical Engineering Transactions**, v. 39, p.1723-1728, 2014.

THEREZO, P. E. A. **Avaliação do desempenho de um reator anaeróbio de leite expandido operado sob condições instáveis de carregamento orgânico e hidráulico**. 109p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 1993.

TORRES, P. **Desempenho de um reator anaeróbio de manta de lodo (UASB) de bancada no tratamento de substrato sintético simulando esgotos sanitários**. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Sao Carlos, 1992.

VAN HAANDEL, A. C. Influence of the digested COD concentration on the alkalinity requirement in anaerobic digesters. **Water Science and Technology**, v. 30, n. 8, p. 23 – 34, 1994. <https://doi.org/10.2166/wst.1994.0374>.

VARRONE, C.; LIBERATORE, R.; CRESCENZI, T.; IZZO, G.; WANG, A. The valorization of glycerol: Economic assessment of an innovative process for the bioconversion of crude glycerol into ethanol and hydrogen. **Applied Energy**, v. 105, p. 349 – 357, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.01.015>.

VIANA, M. B. **Produção de biogás a partir de glycerol oriundo de biodiesel**. 2011. 113 f. Dissertação (Mestrado) – Engenharia Ambiental, Departamento de Engenharia Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

VIEIRA, M. B. S. **Avaliação do desempenho de um reator anaeróbio de leite fluidificado piloto no tratamento de efluentes líquidos apresentando baixa concentração de DQO**. 276 p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 1989.

VLASSIS, T.; ANTONOPOULOU, G.; LYBERATOS, G. Anaerobic treatment of glycerol for methane and hydrogen. **Global Nest Journal**, v. 14, n. 2, p. 149-156, 2012.

VLASSIS, T.; STAMATELATOU, K.; ANTONOPOULOU, G.; LYBERATOS, G. Methane production via anaerobic digestion of glycerol: a comparison of conventional (CSTR) and high-rate (PABR) digesters. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 88, n. 11, p. 2000-2006, 2013.

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**, v. 1. 2ª ed. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, UFMG, 1996.

WALKER, M. *et al.* Potential errors in the quantitative evaluation of biogas production in anaerobic digestion processes. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 24, p. 6339–6346, dez. 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.07.018>.

WANG, Z.; ZHUGE, J.; FANG, H.; PRIOR, B. A. Glycerol production by microbial fermentation: A review. **Biotechnology Advances**, v. 19, n. 3, p. 201-223, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(01\)00060-X](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(01)00060-X).

WU, H. H.; PUN, M. D.; WISE, C. E.; STREIT, B. R.; MUS, F.; BERIM, A.; PETERS, J. W. The pathway for coenzyme M biosynthesis in bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 119, n. 36, 2022. <https://doi.org/10.1073/pnas.2207190119>.

WU, S. Y.; LIN, C. N.; CHANG, J. S. Hydrogen production with immobilized sewage sludge in three-phase fluidized-bed bioreactors. **Biotechnology Progress**, v. 19, p. 828 – 832, 2003.

YANG, Y.; TSUKAHARA, K.; SAWAYAMA, S. Biodegradation and methane production from glycerol-containing synthetic wastes with fixed-bed bioreactor under mesophilic and thermophilic anaerobic conditions. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 4, p. 362-367, 2008.

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, 2007.

ZHU, H.; STADNYK, A.; BELAND, M.; SETO, P. Co-production of hydrogen and methane from potato waste using a two-stage anaerobic digestion process. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 11, p. 5078 – 5084, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.08.083>.



EESC • USP