

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

Eduarda Holz Brächer

**DIGESTÃO ANAERÓBIA DE GLICEROL RESIDUAL VISANDO A
PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO E ENERGIA**

**Santa Maria, RS
2017**

Eduarda Holz Brächer

**DIGESTÃO ANAERÓBIA DE GLICEROL RESIDUAL VISANDO A PRODUÇÃO
DE HIDROGÊNIO E ENERGIA**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, Área de concentração Desenvolvimento de Processos Industriais e Ambientais, como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Engenharia Química**.

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Hoffmann
Co-orientador: Prof. Dr. Fabricio Butierres Santana

Santa Maria, RS
2017

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bracher, Eduarda
DIGESTÃO ANAERÓBIA DE GLICEROL RESIDUAL VISANDO A
PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO E ENERGIA / Eduarda Bracher.-
2017.
92 p.; 30 cm

Orientador: Ronaldo Hoffmann
Coorientador: Fabricio Santana
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química, RS, 2017

1. Célula combustível microbiana 2. Digestão anaeróbia
3. Glicerol residual 4. Produção de energia 5. Remoção
matéria orgânica I. Hoffmann, Ronaldo II. Santana,
Fabricio III. Título.

© 2017

Todos os direitos autorais reservados a Eduarda Holz Brächer. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

Endereço: São João da Reserva, Bairro sexto distrito, São Lourenço do Sul, RS. CEP: 96170-000

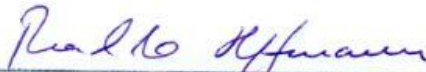
Fone (0xx)53 9 84281368, E-mail: eduardabracher@yahoo.com.br

Eduarda Holz Brächer

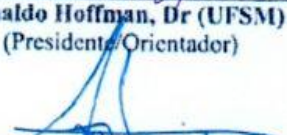
**DIGESTÃO ANAERÓBIA DE GLICEROL RESIDUAL VISANDO A
PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO E ENERGIA**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, Área de concentração Desenvolvimento de Processos Industriais e Ambientais, como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Engenharia Química**.

Aprovado em vinte e nove de agosto de 2017.



Ronaldo Hoffman, Dr (UFSM)
(Presidente/Orientador)


Fabrício Santana Butierrez, Dr (FURG) - Videoconferência
(Co-orientador)

Raquel Kubn, Dr (UFSM)



Valeria Reginatto, Dr (USP) - Videoconferência

Santa Maria, RS
2017

AGRADECIMENTOS

À Deus pela fé e força nos momentos que precisei e pela minha família e amigos.

Aos meus pais, Marilicia e Fernando Bracher, pelo incentivo, apoio em minhas decisões, compreensão em momentos difíceis, vocês são meu maior incentivo e exemplo.

Ao meu irmão, Gustavo Holz Bracher, pela parceria de sempre, por fazer dos meus dias mais felizes indo estudar também em Santa Maria.

Ao meu noivo, Juliano Uarth Carvalho, que sempre me incentivou nas minhas decisões, por entender minhas preocupações e estar sempre ao meu lado pra tudo.

À minha família, aos meus avós, dindos, tios e tias, primos e primas, pela compreensão da minha ausência em alguns momentos e incentivo ao longo desta jornada.

À Universidade Federal do Santa Maria pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

Ao meu orientador Prof Dr Ronaldo Hoffman pela oportunidade, por acreditar no meu trabalho, por estar sempre a disposição para conversar e trocar ideias.

Ao meu co-orientador Prof Dr Fabricio Santana Butierres que apareceu no momento certo, estendendo a mão para me auxiliar com a disponibilização de seu laboratório para o desenvolvimento da pesquisa e acolhimento na FURG.

A Prof Dr Raquel Cristine Kuhn que no início do trabalho participou de forma ativa, discutindo ideias, propostas e emprestando o laboratório e também consumíveis. Também pelas contribuições como banca deste trabalho.

A Prof Dr Valeria Reginatto que em alguns minutos de conversa via Skype sugeriu uma ideia, a qual apresentou sucesso para a realização deste trabalho. Também pelas contribuições como banca deste trabalho.

Ao laboratorista Alfeu que sempre esteve disponível para auxiliar com a realização de análises laboratoriais, além de troca de ideias a respeito do trabalho.

A Helen Oliveira, técnica do Laboratório de Controle Ambiental da FURG, que sempre me auxiliou e motivou para a conclusão deste trabalho.

A minha iniciante Caroline Noronha de Lima pelo auxílio e dedicação na realização da etapa inicial deste trabalho.

Aos amigos de Santa Maria, Fernanda, Fabiane, Isabela, Pricila, Carol, Marcela, Bárbara, Thuany, Mateus, Gislaine, pelos momentos de descontração, conversas e estudo, além de momentos compartilhados de desespero.

As minhas companheiras de casa, Ana Elisa e Silvia, por estarem presentes em momentos

de tensão e também de diversão.

Ao Prof Dr Roger Wagner e doutoranda Bruna Klein, pelo desenvolvimento do método para a determinação do glicerol, bem como por todas as conversas ao longo deste período.

Ao Prof Dr Sérgio Jahn pelas conversas ao longo do mestrado, sempre foram muito produtivas.

Aos meus amigos da FURG em especial a Mayara Copello, Igor Severo e Bruno Menestrino, pelo companheirismo e estímulo em momentos difíceis, foram essenciais.

Aos laboratórios da FURG pelo empréstimo de equipamentos para a realização de análises.

A empresa BSBIOS pelo fornecimento de glicerol para a realização da pesquisa.

A CAPES pelo auxílio financeiro com bolsa de estudos.

RESUMO

DIGESTÃO ANAERÓBIA DE GLICEROL VISANDO A PRODUÇÃO DE BIOHIDROGÊNIO

AUTORA: Eduarda Holz Brächer

ORIENTADOR: Prof. Dr. Ronaldo Hoffmann

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Fabricio Butierres Santana

As fontes alternativas de energia vem ganhando espaço no cenário atual, e com isso os bioprocessos para produção de energia sustentável vem sendo mais intensivamente investigados. A utilização de resíduos industriais como fontes alternativas de carbono tem ganho destaque, entre estes o glicerol é uma fonte de carbono altamente assimilável por micro-organismos. A digestão anaeróbia é um bioprocessos que utiliza micro-organismos para a degradação da matéria orgânica e produção de biogás. Além de ser utilizado, prioritariamente, para a estabilização da matéria orgânica, atualmente é uma forma promissora para produção de energia. A associação deste bioprocessos com células combustíveis microbianas traz um conceito inovador e interessante para a utilização de resíduos de reator acidogênicos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de hidrogênio a partir da digestão anaeróbia de glicerol, além da redução da matéria orgânica e produção de energia. Foi realizado ensaios com a relação carbono/nitrogênio (C/N) 40, 80 e 120, variando a agitação em agitação contínua (100 rpm), agitação de 4 h (100rpm) e sem agitação na temperatura de 55 °C. Após definição da melhor condição para remoção da matéria orgânica foi verificado a produção de hidrogênio com a aplicação de tratamento térmico ao inóculo de 80 °C durante 30 min e 105 °C durante 15 h. Também foi realizado ensaio com reator anaeróbio de manta de lodo (UASB) e célula combustível microbiana (MFC), operado de forma contínua, o tempo de retenção hidráulico (TRH) do reator UASB foi de 24 h e a temperatura foi de 35 °C. Foram determinados nos ensaios a demanda química de oxigênio (DQO), pH, ácidos orgânicos voláteis (AOV), consumo de glicerol, concentração hidrogênio, volume de biogás, densidade de corrente e potência. Nos ensaios iniciais obteve-se a melhor condição para remoção de matéria orgânica na condição da relação C/N 40 (62,22 %) sem agitação, não havendo diferença significativa entre as demais formas de agitação. A maior produção de hidrogênio foi obtida a 105 °C durante 15 h, 0,345 mmol L⁻¹ e remoção de glicerol de 58 %. No tratamento a 80 °C durante 30 min a presença de metano foi identificada a partir de 18 h de processo, havendo máxima produção de hidrogênio de 0,261 mmol L⁻¹ e remoção de glicerol de 99,74 % ao final de 168 h. Quando avaliou-se o TRH, no reator UASB, como forma de controle das bactérias metanogênicas, não foi possível controlar apenas com o TRH, havendo a presença de metano. Porém, a produção de energia na MFC foi maior no ensaio com relação C/N 120, apresentando densidade de potência de 40 mW m⁻². Portanto a relação C/N teve influência na remoção de matéria orgânica e a produção de hidrogênio foi favorecida com a aplicação do tratamento térmico a 105 °C durante 15 h ao lodo, não havendo presença de metano. A MFC é um processo inovador e apropriado para a utilização em reatores acidogênicos, gerando energia e auxiliando na remoção de matéria orgânica.

Palavras-chave: Célula combustível microbiana. Digestão anaeróbia. Glicerol. Produção de energia. Remoção matéria orgânica.

ABSTRACT

ANAEROBIC DIGESTION OF GLYCEROL FOR THE PRODUCTION OF HYDROGEN

AUTHOR: Eduarda Holz Brächer
ADVISOR: Prof. Dr. Ronaldo Hoffmann
CO-ADVISOR: Prof. Dr. Fabricio Butierres Santana

Alternative energy sources have been gaining ground in the current scenario, and thus the bioprocesses for sustainable energy production have been more intensively investigated. The use of industrial waste as alternative sources of carbon has gained prominence, among which glycerol is a source of carbon highly assimilable by microorganisms. Anaerobic digestion is a bioprocess that uses microorganisms for the degradation of organic matter and biogas production. Besides being used, primarily, for the stabilization of organic matter, it is currently a promising way to produce energy. The association of this bioprocess with microbial fuel cells brings an innovative and interesting concept for the use of acidogenic reactor residues. The objective of this work was to evaluate the production of hydrogen from the anaerobic digestion of glycerol, in addition to the reduction of organic matter and energy production. It was carried out tests with the carbon/nitrogen ratio (C/N) 40, 80 and 120, varying the agitation in continuous agitation (100 rpm), agitation of 4 h (100 rpm) and without agitation at 55 °C. After determining the best condition for removal of organic matter, the production of hydrogen was verified with the application of heat treatment to the inoculum of 80 °C for 30 min and 105 °C for 15 h. A UASB reactor and a microbial fuel cell reactor (MFC), continuously operated, the hydraulic retention time (HRT) of the UASB reactor was 24 h and the temperature was 35 °C. The chemical oxygen demand (COD), pH, volatile organic acids (AOV), glycerol consumption, hydrogen concentration, biogas volume, current density and power were determined in the tests. In the initial tests, the best condition was obtained for organic matter removal in the C/N 40 condition (62.22 %) without agitation, with no significant difference between the other forms of agitation. The highest hydrogen production was obtained at 105 °C for 15 h, 0.345 mmol L⁻¹ and glycerol removal of 58 %. In the treatment at 80 °C for 30 min the presence of methane was identified from 18 h of process, with maximum hydrogen production of 0.261 mmol L⁻¹ and glycerol removal of 99.74 % at the end of 168 h. When the TRH was evaluated in the UASB reactor as a form of methanogenic bacteria control, it was not possible to control only with the HRT, with the presence of methane. However, the energy production in the CFM was higher in the C/N 120 test, with a power density of 40 mW m⁻². Therefore, the C/N ratio had an influence on the removal of organic matter and the hydrogen production was favored by the application of the thermal treatment at 105 °C for 15 h to the sludge, with no methane present. MFC is an innovative and appropriate process for the use in acidogenic reactors, generating energy and aiding in the removal of organic matter.

Keywords: Microbial fuel cell. Anaerobic digestion. Glycerol. Production of energy. Removal of organic matter.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Reação de transesterificação de óleos vegetais para obtenção do biodiesel e glicerol.....	177
Figura 2 - Número de documentos de patente e artigos científicos depositados nos últimos 20 anos relativos a produção de biohidrogênio.	20
Figura 3 - Biorrefinaria a partir da digestão anaeróbia.....	222
Figura 4 - Etapas da digestão anaeróbia.....	23
Figura 5 - Rotas metabólicas para produção de hidrogênio.....	25
Figura 6 - Modelo de célula combustível e seus componentes básicos.....	31
Figura 7 - Exemplo de reações bioquímicas que ocorrem nos compartimentos anódico e catódico em sistema bioeletroquímico.....	32
Artigo 1	
Figura 1 - Esquema da realização dos ensaios.....	37
Figura 2 - Eficiência de remoção da demanda química de oxigênio (DQO) nas relações de C/N 40 (a), 80 (b) e 120 (c), com diferentes formas de agitação ■ contínua (100 rpm), ● 4 horas (100 rpm) e ◆ sem agitação.....	39
Artigo 2	
Figura 1 - Cinética de produção de hidrogênio (mmol L ⁻¹) produzido durante a digestão anaeróbia nos ensaios sem tratamento térmico (a), com tratamento térmico 105 °C durante 15 h (b) e com tratamento térmico 80 °C durante 30 min (c).....	51
Figura 2 - Cinética de consumo de glicerol (mmol L ⁻¹) durante a digestão anaeróbia nos ensaios sem tratamento térmico (a), com tratamento térmico 105 °C durante 15 h (b) e 80 °C durante 30 min (c).....	52
Figura 3 - Volume de hidrogênio produzido nos ensaios sem tratamento térmico (a), com tratamento térmico 105 °C durante 15 h (b) e 80 °C durante 30 min (c).....	54
Figura 4 - Concentração de ácidos acético (a), propiônico (b) e butírico (c) durante os ensaios sem tratamento (■), 105 °C durante 15 h (■) e 80 °C durante 30 min (■).....	56
Artigo 3	
Figura 1 - Reator UASB utilizado no trabalho.....	65
Figura 2 - Ilustração da célula combustível microbiana (MFC).....	65
Figura 3 - Visão geral da associação do reator UASB e MFC para realização dos ensaios.....	67
Figura 4 - Produção de biogás no reator UASB na relação C/N 40 com tratamento térmico (a), relação C/N 120 com tratamento térmico (b) e relação C/N 40 sem tratamento térmico (c)...	70
Figura 5 - Concentração de ácido acético (a), propiônico (b) e butírico (c) nos ensaios em reator UASB na relação C/N 40 com tratamento térmico (●), relação C/N 120 com tratamento térmico (●) e relação C/N 40 sem tratamento térmico (●).....	72
Figura 6 - Concentração de ácido acético (a), propiônico (b) e butírico (c) nos ensaios em reator MFC na relação C/N 40 com tratamento térmico (●), relação C/N 120 com tratamento térmico (●) e relação C/N 40 sem tratamento térmico (●).....	73
Figura 7 - Remoção de matéria orgânica na relação C/N 40 com tratamento térmico (a), relação C/N 120 com tratamento térmico e relação C/N 40 sem tratamento térmico, na alimentação (●), UASB (●) e MFC (●).....	74
Figura 8 - Acompanhamento da condutividade nos ensaios na relação C/N 120 com tratamento térmico (a) e relação C/N 40 sem tratamento térmico (b), na alimentação (●), no reator UASB (●) e MFC (●).....	75

Figura 9 - Densidade de corrente elétrica produzida na célula combustível microbiana na relação C/N 40 com tratamento térmico (a), relação C/N 120 com tratamento térmico (b) e relação C/N 40 sem tratamento térmico (c).....	77
Figura 10 - Densidade de potência elétrica produzida na célula combustível microbiana na relação C/N 40 com tratamento térmico (a), relação C/N 120 com tratamento térmico (b) e relação C/N 40 sem tratamento térmico (c).....	78
Figura 11 - Análise de microscopia eletrônica de varredura ao final dos ensaios realizados com a célula combustível microbiana (MFC).....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades físico-químicas do glicerol.....	188
Tabela 2 - Número de depósitos de patentes e artigos científicos em alguns países.....	21
Artigo 1	
Tabela 1 - Composição do resíduo sintético utilizado para partida do reator.....	36
Tabela 2 - Composição do glicerol residual.....	37
Tabela 3 - Percentual de remoção máxima de DQO em diferentes relações de C/N.....	40
Artigo 2	
Tabela 1 - Composição do meio de cultivo utilizado no reator.....	47
Tabela 2 - Composição do glicerol residual.....	48
Tabela 3 - Percentual de remoção de glicerol nos diferentes tratamentos aplicados ao inóculo.....	53
Tabela 4 - Fator de conversão de substrato em produto nos diferentes tratamentos aplicados.....	55
Artigo 3	
Tabela 1 - Composição do meio de cultivo utilizado no reator.....	64
Tabela 2 - Composição do glicerol residual.....	64
Tabela 3 - Meio de cultivo para inoculação da MFC.....	66
Tabela 4 - Valores máximos de remoção de DQO e eficiência Coulombica nos ensaios na relação C/N 40 sem tratamento térmico e com tratamento térmico, relação C/N 120 com tratamento térmico.....	79

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
3.1 BIODIESEL E GLICEROL.....	17
3.2 PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO	19
3.3 BIOHIDROGÊNIO	20
3.4 DIGESTÃO ANAERÓBIA PARA PRODUÇÃO DE BIOHIDROGÊNIO.....	21
3.5 METABOLISMO DA DIGESTÃO ANAERÓBIA PARA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO.....	24
3.6 PARÂMETROS QUE INFLUENCIAM A PRODUÇÃO BIOLÓGICA DE HIDROGÊNIO	26
3.6.1 <i>Temperatura</i>	26
3.6.2 <i>Relação C/N</i>	27
3.6.3 <i>Inóculo</i>	28
3.6.4 <i>pH</i>	29
3.6.5 <i>Tempo de retenção hidráulico</i>	29
3.7 CÉLULAS COMBUSTÍVEL MICROBIANA (MFC) ASSOCIADA A DIGESTÃO ANAERÓBIA.....	30
4. ARTIGOS DESENVOLVIDOS PARA SUBMISSÃO	33
4.1 ARTIGO 1 - INFLUÊNCIA DA RELAÇÃO CARBONO/NITROGÊNIO E DA AGITAÇÃO NA DEGRADAÇÃO DE GLICEROL A PARTIR DA DIGESTÃO ANAERÓBIA EM CONDIÇÕES TERMOFÍLICAS	33
4.1.1 <i>Resumo</i>	33
4.1.2 <i>Introdução</i>	34
4.1.3 <i>Material e Métodos</i>	36
4.1.4 <i>Resultados e Discussão</i>	38
4.1.5 <i>Conclusão</i>	41
4.1.6 <i>Referências bibliográficas</i>	41
4.2 ARTIGO 2 - AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO A PARTIR DA DIGESTÃO ANAERÓBIA DE GLICEROL UTILIZANDO DOIS TIPOS DE PRÉ- TRATAMENTOS AO INÓCULO.....	44
4.2.1 <i>Resumo</i>	44
4.2.2 <i>Introdução</i>	45
4.2.3 <i>Material e Métodos</i>	47
4.2.4 <i>Resultados e discussão</i>	50
4.2.5 <i>Conclusões</i>	57
4.2.6 <i>Referências bibliográficas</i>	57
4.3 ARTIGO 3 – PRODUÇÃO DE ENERGIA A PARTIR DO GLICEROL EM SISTEMA INTEGRADO: DIGESTÃO ANAERÓBIA E CÉLULA COMBUSTÍVEL MICROBIANA .	60
4.3.1 <i>Resumo</i>	60
4.3.2 <i>Introdução</i>	61
4.3.3 <i>Material e Métodos</i>	63
4.3.4 <i>Resultados e discussão</i>	70
4.3.5 <i>Conclusões</i>	80

<i>4.3.6 Referências bibliográficas</i>	81
5. DISCUSSÃO GERAL	83
6. CONCLUSÃO GERAL	85
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	86
REFERÊNCIAS	87

1 INTRODUÇÃO

Nos dias atuais a busca por energias renováveis vem se tornando indispensável, a fim de reduzir os efeitos causados ao meio ambiente e a limitada reserva que se tem de energia não renovável, principalmente o combustível fóssil. O glicerol é um subproduto gerado durante a produção de biodiesel, em uma proporção de 10 kg de glicerol para 100 kg de biodiesel. Sendo gerados 430,89 mil toneladas de glicerol no ano de 2014 no Brasil (Agência Nacional do Petróleo, Gás natural e Biocombustíveis, 2014).

O glicerol é um álcool de baixa toxicidade, possui três carbonos e em cada um deles um grupo hidroxil. Em condições normais de armazenamento e manipulação é quimicamente estável, porém pode se tornar explosivo quando em contato com agentes oxidantes. O processo mais utilizado para obtenção de biodiesel é a reação de transesterificação, nesta reação a pureza do glicerol é entre 50 % a 55 %, possuindo alto teor de sal e excesso de álcool (TAN; AZIZ; AROUA, 2013). Para a aplicação do glicerol em indústrias de cosméticos, fármacos e alimentos o grau de pureza deve ser elevado, elevando os custos para purificação (FERREIRA, 2014).

Por possuir elevados teores de carbono o glicerol pode ser empregado como fonte energética em processos biotecnológicos, como por exemplo a digestão anaeróbia tendo como resultado do processo, a produção de hidrogênio (RAZAVIARANI, BUCHANAN, 2015). Este gás possui alto teor de energia, aproximadamente 122 kJ g^{-1} e rendimento energético 2,75 vezes superior ao de outros combustíveis de hidrocarbonetos. Atualmente, a produção de hidrogênio ainda é realizada a partir de combustíveis fósseis, representando cerca de 98 % do total produzido (SIRGH; ZULARISAM, 2015). A produção de hidrogênio a partir de processos biológicos é um método alternativo e ecologicamente correto, já que nos últimos anos o uso de hidrogênio vem aumentando.

O conceito de biorrefinarias engloba a otimização do uso de recursos oriundos das indústrias a fim de trazer benefícios para a mesma e reduzir os resíduos gerados, maximizando a rentabilidade (KOKOSSIS; TSAKALOVA; PYRGAKIS, 2015). Desta forma esse processo além, de auxiliar no tratamento do subproduto gerado, também gera energia que pode ser utilizada pelas indústrias de biodiesel.

A fim de maximizar a produtividade de hidrogênio, alguns parâmetros de processo são importantes, como temperatura, pH, tempo de retenção hidráulica (TRH), razão C/N e inóculo. A temperatura é considerada por diversos autores como o fator mais influente na

digestão anaeróbia (DEEPANRAJ; SIVASUBRAMANIAN; JAYARAJ, 2015). Estudos comprovam que o uso de temperaturas elevadas (condições termofílicas) aumentam significativamente a produção de hidrogênio no processo de biodigestão. Devido a utilização de tempos de retenção baixos utilizados para a produção de hidrogênio o uso de células combustíveis microbianas (MFC) vem se tornando uma alternativa atraente, produzindo eletricidade, além do hidrogênio (SCHIEVANO, et al., 2016).

As MFC são biorreatores eletroquímicos, divididos em dois compartimentos e separados por uma membrana de permuta iônica, estes compartimentos são o ânodo (presença de micro-organismos) e cátodo (aceptor final de elétrons) (LOGAN; REGAN, 2006). A associação da digestão anaeróbia e MFC é recente, havendo poucos estudos na área, busca-se aprimorar a interação destes dois processos biológicos, demonstrando um elevado potencial para a produção de energia, principalmente em locais de difícil acesso (HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ et. al., 2015). Desta forma, o presente estudo, busca desenvolver a partir da digestão anaeróbia a produção de hidrogênio, e com a utilização da célula combustível microbiana a produção de energia, trazendo o aproveitamento máximo dos resíduos gerados.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a produção de hidrogênio a partir da digestão anaeróbia de glicerol, além da redução da matéria orgânica e produção de energia.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar diferentes relações de C/N e agitação do biorreator, a fim de determinar a melhor condição para degradação da matéria orgânica;
- ✓ Estudar efeito do pré-tratamento ao inóculo na produção de hidrogênio;
- ✓ Determinar a concentração de hidrogênio produzido nos diferentes pré-tratamentos do inóculo;
- ✓ Quantificar os principais metabólitos (ácidos orgânicos voláteis) produzidos durante o processo;
- ✓ Verificar a eficiência de remoção de matéria orgânica e glicerol durante o processo.
- ✓ Verificar a remoção de matéria orgânica na associação de reator UASB e célula combustível microbiana, além da produção de hidrogênio e eletricidade a partir do glicerol.

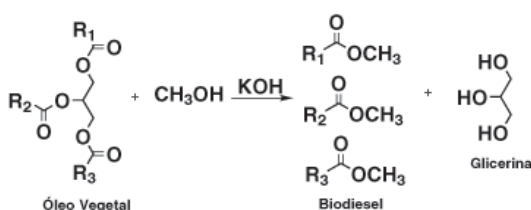
3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 BIODIESEL E GLICEROL

O biodiesel é um biocombustível alternativo para veículos, obtido a partir da reação de transesterificação, esterificação ou craqueamento de óleos vegetais (MME). O método mais utilizado para a produção de biocombustível é a partir da transesterificação, onde utiliza-se um catalisador (geralmente alcalino) e álcool (metanol ou etanol) para a reação ocorrer, obtendo as duas fases, biodiesel e glicerol.

A fase superior, mais leve ou menos densa, contém os ésteres metílicos ou etílicos constituintes do biodiesel. Na fase inferior está presente o glicerol e algumas impurezas resultantes da reação de transesterificação, como álcool, catalisador e água (RIVALDI et al., 2007). A Figura 1 mostra a reação de transesterificação de óleos vegetais.

Figura 1 – Reação de transesterificação de óleos vegetais para obtenção do biodiesel e glicerol.



Fonte: Mota et al., 2009.

Atualmente o Brasil, a partir de uma política nacional, acrescenta ao diesel 7 % de biodiesel, chamado de B7, gerando um acréscimo na produção de glicerol. Este índice passará em 2019 para 10 % de biodiesel no diesel, causando um aumento significativo na produção de glicerol. Estima-se que para cada 100 kg de biodiesel são gerados 10 kg de glicerol, em 2014 o Brasil gerou 430,89 mil t de glicerol (Agência Nacional do Petróleo, Gás natural e Biocombustíveis, 2014). Devido a esta elevada produção de glicerol o mercado brasileiro atual não atende o total desta oferta, tornando-o um resíduo e reduzindo a rentabilidade das indústrias (YAZDANI e GONZALES, 2007). O glicerol é um composto orgânico, pertence à função álcool, não possui odor e nem cor (PACHAURI e HE, 2006).

Devido as suas características físicas e químicas o glicerol purificado pode ser utilizado como matéria prima em diversos setores industriais, principalmente na indústria de alimentos, cosméticos e fármacos (OOI et al., 2004). Porém existe um elevado custo para purificação do glicerol, restringindo o uso para obtenção de produtos com alto valor agregado (FERREIRA, 2014). A Tabela 1 apresenta as características físicas e químicas do glicerol.

Tabela 1 – Propriedades físico-químicas do glicerol.

Parâmetro	Valor
Massa molar	92,09 g mol ⁻¹
Densidade (glicerol 100 %) 25 °C	1,262 kg Mg ⁻¹
Viscosidade 20 °C	939 cps
Ponto de ebulição (101,3 Kpa)	290 °C
Ponto de fusão	18 °C
Ponto de inflamação	177 °C
Tensão superficial 20 °C	63,4 Mn m ⁻¹
Calor específico (glicerol 99,94%) 26 °C	2,435 J g ⁻¹
Calor de evaporação 55 °C	88,12 J mol ⁻¹

Fonte: Arruda et al., 2007.

Fontes de energia alternativa são estudadas a fim de solucionar a possível crise energética futura, entre estas alternativas o uso de glicerol vem se tornando interessante. Principalmente quando é um resíduo da produção de biodiesel, pois acarreta em custos para a indústria com o seu tratamento. Existem diversos estudos utilizando o glicerol como fonte de carbono no cultivo de células microbianas (SILVA et al., 2009; TANG et al., 2012; PACHAPUR et al., 2015). O glicerol possui em sua composição elementos nutricionais importantes para o crescimento de micro-organismos, como fósforo, enxofre, magnésio, cálcio, nitrogênio e sódio (XIU et al., 2007). Segundo Dillis et al. (1980), o glicerol é altamente assimilável por bactérias e leveduras em cultivos para obtenção de energia.

A partir da digestão anaeróbia do glicerol bruto podem-se obter diversos produtos com alto valor agregado, como hidrogênio, 1,3-propanodiol, etanol, butanol, ácidos orgânicos, entre outros (VARRONE, 2014; SILVA et al., 2009). Estudo desenvolvido com o uso de

glicerol bruto estimou que pudesse haver a produção de etanol e hidrogênio, apresentando rendimentos de aproximadamente 500 kg t^{-1} de glicerol e $260 \text{ m}^3 \text{ t}^{-1}$ de glicerol, respectivamente (VARRONE, 2014), gerando energia a qual poderá ser utilizada pela própria indústria de biodiesel.

Desta forma o conceito de biorrefinarias integradas às indústrias de biodiesel vem se tornando interessante, utilizando um resíduo para produção de energia e produtos com valor agregado, colaborando com a receita de indústrias deste ramo (GARLAPATI; SHANKAR; BUDHIRAJA, 2016).

3.2 PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO

O hidrogênio é um composto com alto valor energético, tem alta energia por unidade de massa, superando qualquer outro combustível. Existem diversas formas de obter o hidrogênio, podendo ser utilizados métodos térmicos, elétricos e biológicos. Entre o método térmico existem diversas técnicas, como vapor reformando o gás natural ou outros hidrocarbonetos, hidrólise termoquímica, gaseificação de biomassa e pirólise. As técnicas que envolvem o método elétrico podem ser a eletrolise ou a fotoeletroquímica e os métodos biológicos empregam as técnicas fotobiológico, fermentação ou digestão anaeróbia, gerando assim o biohidrogênio (SANTOS e SANTOS, 2005). A digestão anaeróbia além de produzir biohidrogênio traz benefícios como o tratamento de compostos orgânicos, tornando economicamente viável sua produção a partir do uso de resíduos (LAMAISON, 2009).

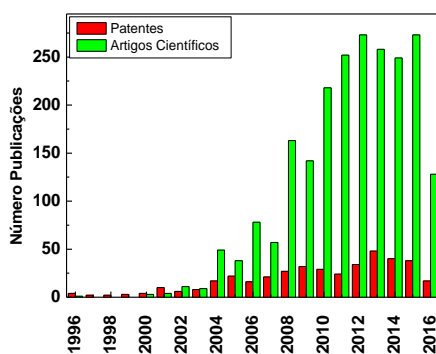
O hidrogênio pode ser utilizado como reagente para processos de hidrogenação, para remoção de traços de oxigênio e corrosão (DAS e VEZIROGLU, 2001). Também é muito utilizado como combustível para foguetes da NASA, devido seu baixo peso, usado como refrigerante em motores elétricos e atualmente busca-se a utilização do hidrogênio como fonte de energia renovável (WANG e WAN, 2009; HALLENBECK e GHOSH, 2009).

A vantagem da utilização de hidrogênio como biocombustível é que quando queimado gera apenas calor e água. Desta forma, gerando menos poluentes atmosféricos quando comparado aos combustíveis fósseis (GOMES NETO, 2005). Os processos biológicos apresentam grande potencial para a produção de biohidrogênio, destacando a digestão anaeróbia.

3.3 BIOHIDROGÊNIO

Com o objetivo de avaliar a relevância do tema, produção de biohidrogênio, foram realizadas buscas em bases de patentes e literatura científica, utilizando o portal do Questel Orbit e a base científica Scopus, respectivamente, empregando a palavra chave biohydrogen, para identificar o número de documentos depositados nos últimos 20 anos. Os resultados são apresentados na Figura 2, onde pode-se constatar um crescente aumento no número de publicações relativo ao tema nos últimos anos. Estes resultados mostram a importância atribuída ao tema de estudo proposto nesta dissertação.

Figura 2 - Número de documentos de patente e artigos científicos depositados nos últimos 20 anos relativos a produção de biohidrogênio.



A Tabela 2 apresenta dados relativos a depósito e geração de patentes e publicação de artigos científicos nos principais países. Pode-se constatar que a China é o país que mais gera tecnologia na área de biohidrogênio, seja por patentes, com 171 depósitos por empresas residentes neste país, seja através de artigos científicos, com 432 publicações.

Tabela 2 - Número de depósitos de patentes e artigos científicos em alguns países.

Pais	Total de Depósitos Patentes	Depósito de Patentes por residentes	Artigos Científicos
CN	191	171	432
US	56	38	209
JP	46	35	70
KR	25	17	93
AU	22	1	23
CA	21	4	120
IN	19	5	250
DE	12	5	49
TW	11	9	206
RU	10	4	25
BR	10	3	72

Até o momento no Brasil foram protegidas por patentes 3 tecnologias por empresas residentes e 7 tecnologias depositadas por empresas não residentes, totalizando 10 depósitos, o que representa o décimo primeiro país em depósito de patentes nesta área. Com relação a artigos científicos até 2016 foram divulgados 70 documentos, representando a décima segunda posição entre os principais países.

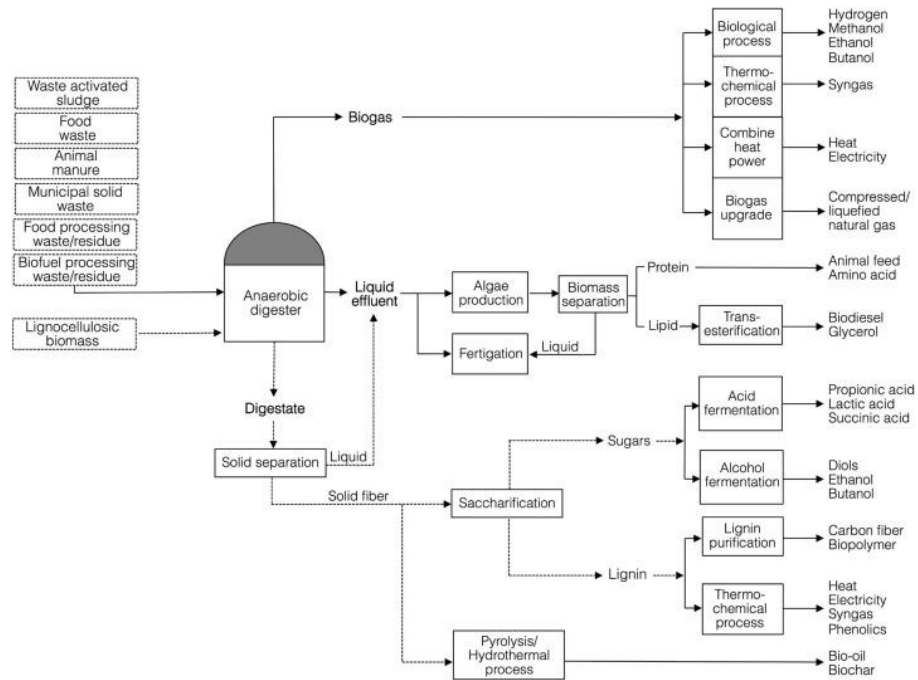
Os resultados apresentados mostram que o tema relacionado a produção de hidrogênio por rotas biotecnológicas ganhou grande relevância nos últimos anos, em função de importância que este insumo representa e representará no setor energético em termos mundiais.

3.4 DIGESTÃO ANAERÓBIA PARA PRODUÇÃO DE BIOHIDROGÊNIO

A digestão anaeróbia é uma das tecnologias mais promissoras para produção de energia, pois pode degradar diversos substratos orgânicos para geração de biogás. Inicialmente foi desenvolvida e utilizada para a estabilização de materiais orgânicos, porém atualmente tem sido amplamente utilizada para produção de energia (SAWATDEENARUNAT et al., 2016). A Figura 3 mostra as possibilidades de processos e

produtos a partir da digestão anaeróbia de diversos tipos de substratos, caracterizando-se como biorrefinarias anaeróbias.

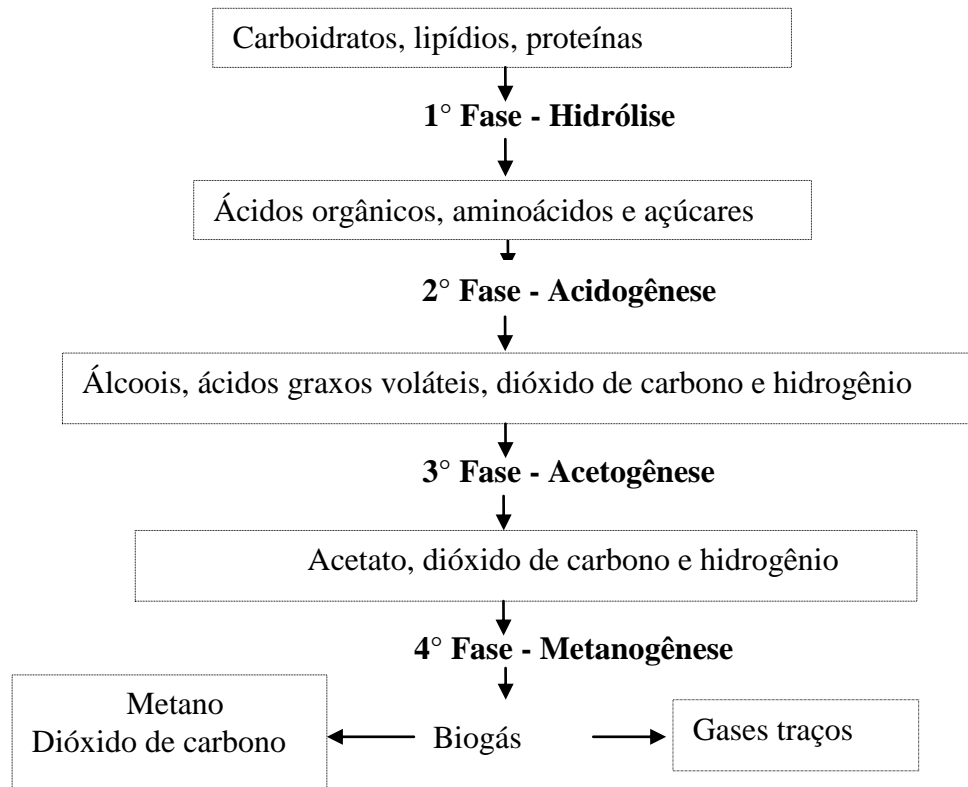
Figura 3 - Biorrefinaria a partir da digestão anaeróbia.



Fonte: SAWATDEENARUNAT et al., 2016.

Este processo ocorre na ausência de oxigênio envolvendo diversos micro-organismos e etapas bioquímicas para a degradação da matéria orgânica e formação de biogás (DHAKED et al., 2010; SCHMIDELL et al., 2007). A Figura 4 mostra a sequência de reações realizadas pelos micro-organismos na digestão anaeróbia.

Figura 4 - Etapas da digestão anaeróbia



A primeira etapa consiste na hidrólise das moléculas, essa reação ocorre através de enzimas extracelulares a fim de facilitar a degradação destas moléculas pelos micro-organismos (FONSECA e TEIXEIRA, 2007). Na acidogênese os produtos originados da hidrólise são metabolizados pelas células bacterianas, onde são excretados álcoois, ácidos graxos voláteis, dióxido de carbono e hidrogênio (AL SEADI et al., 2008). Após, estes subprodutos são metabolizados por bactérias homoacetogênicas e sintróficas, e esta fase é chamada de acetogênese, o produto desta fermentação é o acetato, dióxido de carbono e hidrogênio (ZANGH et al., 2014).

A última etapa é conhecida como metanogênese, nesta etapa os micro-organismos metanogênicos metabolizam os produtos das etapas anteriores para formar metano e dióxido de carbono, cerca de 70 % do metano produzido é oriundo do acetato produzido na etapa anterior (JAIN, et al, 2015).

Estudos vêm sendo realizados a fim de utilizar a digestão anaeróbia para produção de hidrogênio, devido às vantagens e propriedades deste gás. O produto final da digestão

anaeróbia tradicional é biogás, rico em metano, desta forma é necessário eliminar a etapa metanogênica, resultando em um biogás rico em hidrogênio.

A utilização de pré-tratamentos ao lodo anaeróbio, para eliminação dos micro-organismos metanogênicos, podem ser utilizados processos químicos e físicos, como o calor, congelamento e descongelamento, utilização de ácido ou bases e ultrassom (SIRGH; ZULARISAM, 2015). Segundo Wang et al. (2011) e Rossi et al. (2011), o calor é um processo eficiente havendo a eliminação dos micro-organismos metanogênicos e com isso não há formação de metano. Pode-se afirmar que a produção de hidrogênio em relação aos pré-tratamentos citados anteriormente é decrescente na seguinte ordem: tratamento térmico, ácido, congelamento/descongelamento, sonicação e aeração (DONG et al., 2010).

3.5 METABOLISMOS MICROBIANOS ENVOLVIDOS NA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO DURANTE A DIGESTÃO ANAERÓBIA

A produção de hidrogênio a partir da digestão anaeróbia pode ocorrer por duas principais rotas metabólicas, por exemplo, pode ser gerado a partir da decomposição de formiato pela ação da enzima hidrogenase ou pela oxi-redução de NADH. O formiato é obtido a partir da degradação de piruvato a acetil-Coa, gerando acetato ou etanol. Sendo esta a rota que corresponde a 50 % da produção de hidrogênio e é realizada principalmente por enterobactérias, sendo o gênero *Escherichia* o mais conhecido (FERNANDES, 2008).

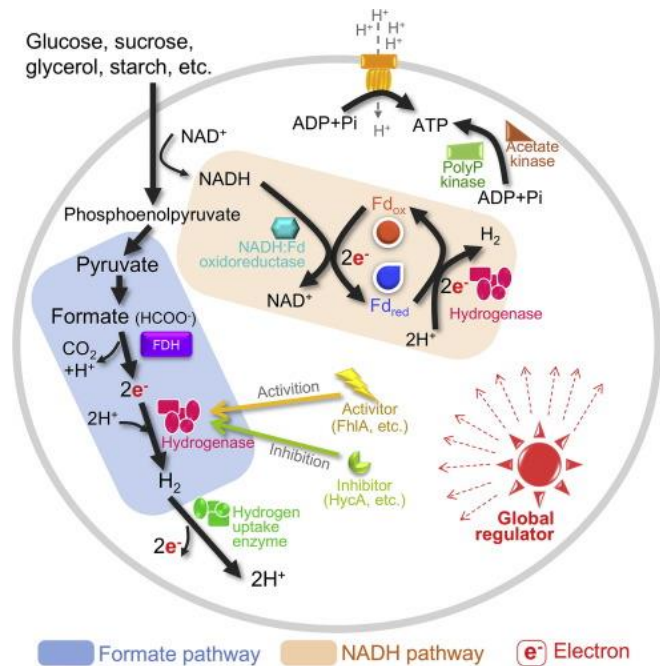
Outra forma é a rota de oxi-redução de NADH, sendo gerado hidrogênio pelo processo de formação do NADH. A formação de NADH ocorre na fermentação da glicose a piruvato, ou na fermentação de piruvato a outros produtos finais (CAMPBELL; FARRELL, 2008). Na via redutiva para produção de NADH o produto final é 1,3 propanodiol, o glicerol sofre um processo de desidratação, intermediado pela co-enzima glicerol hidratase, produzindo 3-hidroxi-propionaldeído, que por sua vez é reduzido a 1,3 propanodiol, pela ação da enzima 1,3 propanodiol desidrogenase. O rendimento da produção de hidrogênio e 1,3 propanodiol são dependentes da via oxidativa (BIEBL et al., 1999).

Na via oxidativa o NADH é produzido a partir da oxidação de glicerol a piruvato, envolvendo enzimas específicas, e este em produtos intermediários, como, etanol e ácidos orgânicos, gerando hidrogênio. O glicerol é utilizado de diversas maneiras por diversos

micro-organismos, também é responsável pela formação de inúmeros metabólitos (MANSSOURI, 2012).

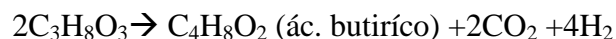
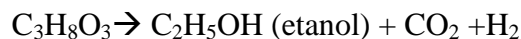
A Figura 5 mostra as duas principais rotas metabólicas para produção de hidrogênio, ilustrando as etapas descritas anteriormente.

Figura 5 - Rotas metabólicas para produção de hidrogênio.



Fonte: Lu et al., (2016).

O rendimento da rota metabólica de oxi-redução do NADH é influenciada pelos produtos gerados. Abaixo são apresentados as equações de rendimento máximo de hidrogênio a partir glicerol com cada metabólito produzido durante a digestão anaeróbia.



A produção de hidrogênio a partir desta rota metabólica é influenciada pela formação de produtos intermediários, como a formação de ácidos orgânicos e álcool. O metabolismo

pode ser direcionado, favorecendo a produção de hidrogênio através da melhora dos parâmetros operacionais, como pH, temperatura, inóculo e tempo de retenção hidráulico (MANSSOUR, 2012).

3.6 PARÂMETROS QUE INFLUENCIAM A PRODUÇÃO BIOLÓGICA DE HIDROGÊNIO

Alguns parâmetros são essenciais na digestão anaeróbia, principalmente quando se trata da produção de hidrogênio. Os parâmetros mais influentes são a temperatura, relação C/N, inóculo, pH e tempo de retenção hidráulico (TRH) (FERREIRA, 2014).

3.6.1 Temperatura

A temperatura é o fator mais influente na atividade de bactérias produtoras de hidrogênio por via fermentativa. Alguns autores afirmam que em temperatura mesófila a produção de hidrogênio é reduzida, porém, a conversão de substrato é favorecida. Já em temperaturas termófilas a produção de hidrogênio é favorecida, isto porque a temperatura alta melhora a termodinâmica das reações químicas e bioquímicas, além de aumentar a tolerância à pressão parcial de hidrogênio no meio líquido (FERREIRA, 2014).

A pressão parcial de hidrogênio no meio líquido desempenha um papel crucial para o equilíbrio bioquímico envolvido na conversão de substrato em hidrogênio, assim determinando a via metabólica. Quando o hidrogênio no meio líquido atingir a concentração crítica, a bactéria muda seu metabolismo, devido a limitação termodinâmica (BECKERS et al., 2015). Desta forma, em temperaturas termofílicas a produção de hidrogênio é favorecida.

Segundo Wilson et al. (2008) a temperatura é um fator crucial na formação da estrutura da comunidade microbiana, pois elevadas temperaturas aumentam a eficiência dos processos enzimáticos e aumentam a taxa de crescimento de micro-organismos metanogênicos. Porém, existe um limite de temperatura, quando acima do ideal causa a redução da diversidade microbiana, incluído a complexidade da comunidade metanogênica. Pap et al. (2015) ressaltou que níveis mais elevados de amônia e ácidos graxos voláteis são encontrados em condições termofílicas do que em condições mesofílicas. Sendo consequência da possibilidade de inibição de micro-organismos metanogênicos, visto que as mesmas são

sensíveis a altos níveis de ácidos graxos voláteis. Desta forma, os reatores operados em temperatura de 57,5 °C apresentaram acúmulo de hidrogênio e ácidos graxos voláteis, já quando utilizado temperatura inferior a 55 °C não houve acúmulo de metabólitos intermediários (WILSON et al., 2008).

3.6.2 Relação C/N

A relação carbono/nitrogênio é um fator importante para a produção de hidrogênio, segundo pesquisadores o nitrogênio e o ferro são os nutrientes mais importantes e essenciais para a produção de hidrogênio. Segundo Oztekin et al. (2008) concentrações em excesso ou muito inferiores reduzem o rendimento e velocidade de produção de hidrogênio. Estas mudanças estão relacionadas com a mudança de rotas metabólicas, redução da atividade biológica, efeito inibitório do crescimento microbiano, assim interferindo na cultura microbiana e produtos da fermentação.

O nitrogênio é um fator importante na digestão anaeróbia pois esta relacionado com a formação de proteínas, ácidos nucleicos e enzimas, que são fundamentais para o crescimento de micro-organismos produtores de hidrogênio. Estudos haviam relatado que a relação C/N era influenciada pelo carbono, alterando vias metabólicas e formando produtos intermediários. Porém, segundo Anzola-Rojas et al. (2015), o fator principal que influenciou a produção de hidrogênio foi a concentração de nitrogênio.

Um estudo interessante foi realizado por Liu e Shen (2004), pesquisando a influência da variação de nitrogênio e carbono. Inicialmente foi estudada a variação de nitrogênio, variou-se entre 0,56 g – 11,28 g em 15 g L⁻¹ de amido, esta variação não apresentou alteração nos produtos intermediários. Porém, o melhor rendimento de hidrogênio foi obtido na concentração de nitrogênio de 5,64 g. Após foi avaliado a variação da concentração de carbono, 2 g L⁻¹ – 32 g L⁻¹, foi observado que a concentração de ácido acético aumentou com o aumento da concentração de amido e o melhor rendimento de hidrogênio foi obtido nas concentrações de amido de 2 g L⁻¹ e 24 g L⁻¹. Mostrando que o principal nutriente para a produção de hidrogênio foi o nitrogênio.

Desta forma pode-se verificar que existe uma grande influência da relação C/N na digestão anaeróbia para produção de hidrogênio, sendo o nitrogênio relatado como componente relevante. Avaliando a produtividade de hidrogênio, Anzola-Rojas et al. (2015)

testou diferentes relações C/N, 40, 90, 140 e 190 utilizando sacarose como fonte carbono e uréia como fonte de nitrogênio em reator de leito fixo de fluxo ascendente a 25°C e tempo de retenção hidráulico 2 h. Nestes ensaios foi observado que no ensaio com relação C/N 140 o fluxo de biogás foi 423,4 mL h⁻¹, obtendo 61% H₂, representando um aumento de 3,5 vezes em relação ao ensaio da relação C/N 40. Porém, na relação C/N 90 o rendimento de conversão de sacarose em hidrogênio foi 17 % superior ao comparado com a relação C/N 140. Após ajuste matemático a razão ótima foi 137, apresentando rendimento de 3,5 mol H₂ mol sacarose⁻¹.

3.6.3 Inóculo

Segundo Kawagoshi et al. (2005) o inóculo é um fator limitante para a produção de hidrogênio. Estes autores realizaram um estudo utilizando o mesmo meio de cultura em diferentes inóculos, o resultado foi que houve variação na produção de hidrogênio. A digestão anaeróbia pode ocorrer em cultura pura, em que é utilizado apenas um micro-organismo, ou em cultura mista. Porém, para a produção de hidrogênio é necessário que apenas os micro-organismos produtores de hidrogênio estejam presentes, já que os micro-organismos metanogênicos consomem o hidrogênio produzido para a produção de metano.

As culturas mistas apresentam vantagens em relação as culturas puras, pois são simples de manusear e controlar, além de serem capazes de metabolizar uma quantidade maior de substratos. Atualmente são utilizados pré-tratamentos para suprir a atividade das bactérias consumidoras de hidrogênio, preservando a viabilidade destes micro-organismos (WANG; WAN, 2009). Os pré-tratamentos utilizados são físicos ou químicos, como o calor, congelamento e descongelamento, utilização de ácido ou bases e ultrassom (SIRGH; ZULARISAM, 2015).

O estudo realizado por Kawagoshi et al. (2005), verificou a influência do inóculo e pré-tratamentos na produção de hidrogênio. O resultado obtido foi que utilizando lodo digerido o rendimento de conversão de hidrogênio foi superior ao comparado com lodo ativado, 1,4 mol H₂ mol glicose⁻¹ e inferior a 0,2 mol H₂ mol glicose⁻¹, respectivamente. Também foi avaliado o pré-tratamento aplicado ao lodo digerido, a resposta foi que no tratamento térmico o rendimento de produção de H₂ foi 1,4 mol H₂ mol glicose⁻¹ e aplicando o

ajuste de pH foi $0,8 \text{ mol H}_2 \text{ mol glicose}^{-1}$. Assim comprova-se que o inóculo e o pré-tratamento aplicado influenciam na produção de hidrogênio.

3.6.4 pH

O pH também é um fator importante para a digestão anaeróbia, pois influencia na atividade de bactérias produtoras de hidrogênio, afetando a ação da enzima hidrogenase e assim a via metabólica. O uso de um intervalo adequado de pH é imprescindível para obter máxima produção de hidrogênio. O aumento de pH pode favorecer a capacidade de produção de hidrogênio pelos micro-organismo, porém em valores elevados pode haver a redução da produção deste gás (WANG; WAN, 2009).

Segundo Mu et al. (2006), o pH ótimo para produção de hidrogênio foi 5,5, produzindo $2,52 \text{ mL H}_2 \text{ g sacarose}^{-1}$, utilizando lodo anaeróbio e sacarose como fonte de carbono em reator batelada, a faixa de pH estudada foi 4,5 a 6,5. Neste mesmo valor de pH (5,5) Fang e Liu (2002) obtiveram a produtividade máxima de hidrogênio, além de notar que o aumento de pH provoca uma redução da produção de hidrogênio. Justifica-se a importância do pH devido a etapa de produção de hidrogênio ser a acidogênica, nesta etapa o pH da solução é mais baixo, porém quando em pH próximos a 4,5 há a formação de ácidos voláteis e quando o valor de pH é inferior a 4,5 existe a produção de butanol e inibição da produção de hidrogênio (FANG e LIU, 2002).

3.6.5 Tempo de retenção hidráulico

O tempo de retenção hidráulico é um fator muito importante na produção de hidrogênio, relacionando a velocidade específica máxima de crescimento dos micro-organismos. Os micro-organismos produtores de hidrogênio possuem velocidade específica de crescimento superior ($0,083 \text{ h}^{-1}$) que os micro-organismos produtores de metano ($0,0167 \text{ h}^{-1}$), desta forma é importante a utilização de tempos de retenção curtos. Assim os micro-organismos metanogênicos são incapazes de manter uma população estável, sendo eliminados do reator (CHEN et al., 2001).

Segundo Chen et al. (2001) os tempos de retenção hidráulico ótimos para a produção de hidrogênio foi entre 2 h e 4 h, contribuindo para a eliminação dos micro-organismos

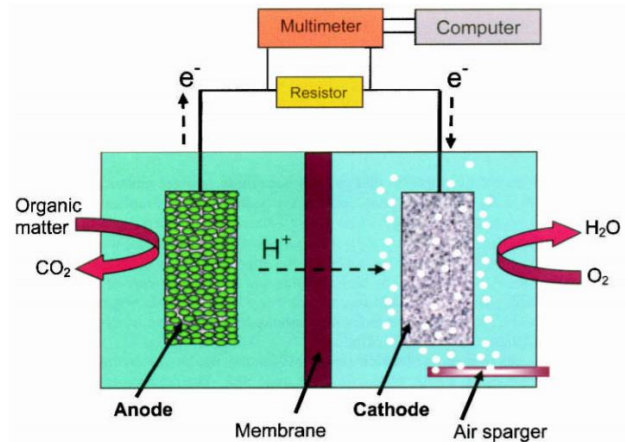
metanogênicos. Estudo realizado em reator CSTR com glicose como substrato em temperatura termofílica, foi avaliado o tempo de retenção hidráulico de 2 a 12 h, o máximo rendimento de hidrogênio foi $2,1 \text{ mol H}_2 \text{ mol glicose}^{-1}$, em TRH de 6 h (GRAVALA et al., 2006). Então, a utilização de tempos de retenção hidráulica auxiliam na retirada dos micro-organismos metanogênicos, através de lavagem seletiva, retirando metanogênicas do reator, já que as mesmas são consumidoras de hidrogênio.

3.7 CÉLULAS COMBUSTÍVEL MICROBIANA (MFC) ASSOCIADA A DIGESTÃO ANAERÓBIA

Devido a alta carga orgânica ainda presente na saída de biorreatores utilizados para a produção de hidrogênio, referente a utilização de tempos de retenção hidráulico baixos, propõe-se a associação de células combustível microbiana (MFC). Este sistema é recente e existem diversas pesquisas na área, a fim de aprimorar seu funcionamento. As células combustíveis microbianas ganharam atenção para integração com a digestão anaeróbia, devido à utilização de efluentes para a geração de eletricidade, além de auxiliar na redução da carga orgânica presente nestes efluentes (SCHIEVANO et al., 2016).

As células combustíveis microbianas são biorreatores eletroquímicos, divididos em dois compartimentos e separados por uma membrana de permuta iônica, os compartimentos são divididos em ânodo (presença de micro-organismos) e cátodo (acceptor final de elétrons). A Figura 6 apresenta um modelo de célula combustível microbiana. Os micro-organismos presentes no ânodo possuem atividade exoeletrogênica, atuando como catalisadores da reação de oxidação do doar de elétrons, o agente redutor, liberando prótons e elétrons no meio reacional (LOGAN; REGAN, 2006). Os elétrons produzidos são transferidos entre os eletrodos do compartimento do ânodo para o cátodo, a partir de uma resistência externa, reagindo com os prótons e com o acceptor final de elétrons, agente oxidante do meio (TELEKEN, 2013). O compartimento catódico possui um eletrodo insolúvel em uma solução contendo o acceptor final de elétrons, usualmente são utilizados o oxigênio e ferricianeto de potássio. O ferricianeto de potássio apresenta melhor desempenho quando comparado com o oxigênio, pois gera valores maiores de densidade de corrente, porém é prejudicial ao meio ambiente (LOGAN; REGAN, 2006).

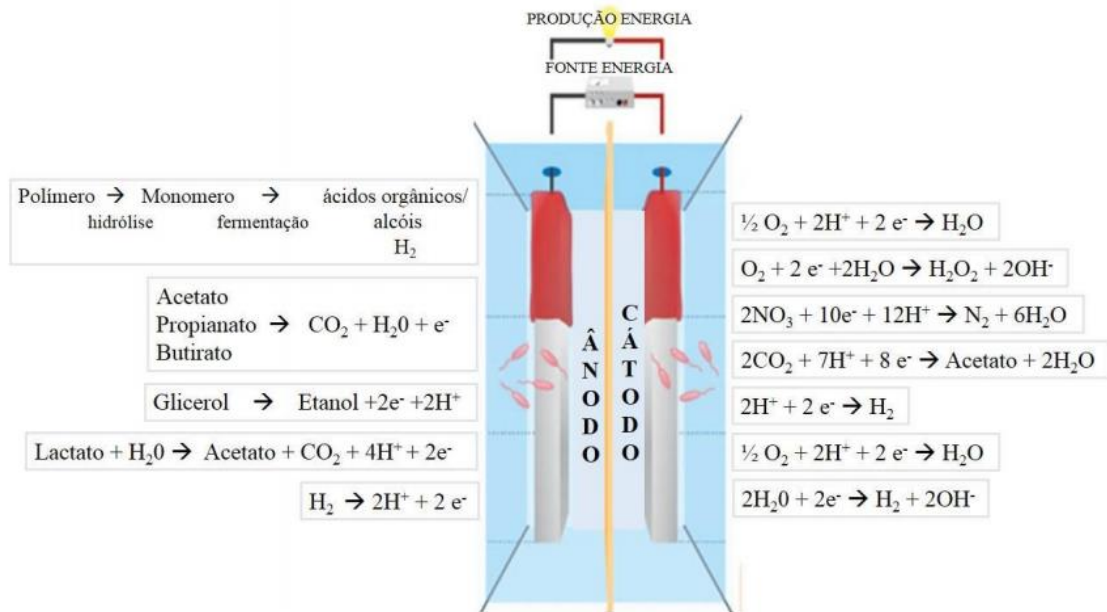
Figura 6 – Modelo de célula combustível e seus componentes básicos.



Fonte: Logan, 2008.

O compartimento anódico é constituído por um eletrodo insolúvel, micro-organismo, fonte de carbono e demais nutrientes contidos no meio de cultivo. O eletrodo que compõe o ânodo atua como redutor no processo respiratório microbiano, necessitando ter alta condutividade elétrica, boa compatibilidade e estabilidade química em solução (LOGAN, 2008). As reações bioquímicas que ocorrem neste compartimento são basicamente degradativas, transformando substância complexas em simples, como ácidos orgânicos, hidrogênio, dióxido de carbono, etanol, além da produção de energia. A Figura 7 apresenta algumas reações bioquímicas que ocorrem no ânodo e quais são os produtos obtidos no cátodo (KIELY et al. 2011).

Figura 7 - Exemplo de reações bioquímicas que ocorrem nos compartimentos anódico e catódico em sistema bioeletroquímico.



Fonte: Adaptado Logan e Rabaey (2012)

O primeiro estudo exaustivo foi apresentado por Premier et al, (2013), considerando apenas a remoção de DQO, apresentando pouca atenção na remoção de nitrogênio. Outros estudos realizados para demonstrar o desempenho de células combustíveis microbianas não apresentaram resultados satisfatórios de geração de energia. Fradler et al. (2014) utilizou a MFC de quatro módulos, TRH de 8 h e concentração inicial de efluente de 1029 mg L⁻¹, nestas condições a remoção de DQO foi 10%, resultando em recuperação de energia relativamente baixa por volume de efluente (92 J L⁻¹). Quando se utilizam concentrações de DQO superiores, evitando a diluição de efluente da digestão anaeróbia, o desempenho da MFC é ainda pior (SCHIEVANO et al., 2016). Em um sistema utilizando a associação da digestão anaeróbia e célula combustível microbiana a produção de energia foi 430 mW m⁻², utilizando uma resistência externa de 500 Ω, nestes ensaios foi utilizado como fonte de nutrientes esterco suíno e farelo de arroz, a concentração de matéria orgânica adicionada foi 6,8 g L⁻¹ e o sobrenadante da digestão anaeróbia foi adicionado na MFC (SCHIEVANO et al., 2016).

Outros estudos relatam que a utilização de substratos complexos reduzem a produção de energia em relação a substratos simples. Conforme verificado por Larrosa-Guerrero et al. (2010) utilizando água residual de cervejaria diluída em água residual doméstica, composta

por 1200 mg L⁻¹ de DQO e 412 mg L⁻¹ de sólidos voláteis, a temperatura do sistema foi 35°C a eficiência Coulombic foi de apenas 1,75 % e a potência elétrica gerada foi 174 mW m⁻³. Este mesmo autor verificou a influência da temperatura no sistema, realizando ensaios com a temperatura de 4°C e os resultados foram superiores ao ensaio anterior, resultando em uma eficiência Coulombic 25 % e potência elétrica de saída de 294,6 mW m⁻³. A baixa produção de energia e eficiência Coulombic pode se dar pela presença de outros aceptores de elétrons no meio anódico, como oxigênio, se existe neste compartimento crescimento bacteriano ou até mesmo a digestão anaeróbia este elétrons são utilizados ao invés de transferidos para o cátodo para geração de energia (HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ et al., 2015).

Apesar dos avanços obtidos nesta área, a produção de energia ainda é baixa. Uma maneira para superar esta desvantagem seria o armazenamento da energia produzida pelas MFC em dispositivos recarregáveis e após distribuir para uma aplicação final. Porém, a utilização de células combustíveis microbiana pode ser considerada uma alternativa, com elevado potencial para a produção de energia, principalmente se tratando de locais de difícil acesso (HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ et al., 2015).

4. ARTIGOS DESENVOLVIDOS PARA SUBMISSÃO

4.1 ARTIGO 1 - INFLUÊNCIA DA RELAÇÃO CARBONO/NITROGÊNIO E DA AGITAÇÃO NA DEGRADAÇÃO DE GLICEROL RESIDUAL A PARTIR DA DIGESTÃO ANAERÓBIA EM CONDIÇÕES TERMOFÍLICAS

Bracher, Eduarda Holz^a; Santana, Fabricio^b Hoffmann, Ronaldo^a

^a Departamento Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, Santa Maria, Brasil. ^b Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande, Brasil.

4.1.1 Resumo

A digestão anaeróbia vem se tornando uma fonte promissora para a produção de energia limpa e renovável, através do uso de subprodutos industriais, como por exemplo o uso

do glicerol. O glicerol é subproduto da produção de biodiesel e devido suas características pode ser utilizado como fonte de carbono no cultivo de micro-organismos. O objetivo do trabalho foi verificar a influência da agitação e da relação C/N na degradação da matéria orgânica por digestão anaeróbia de glicerol residual. Os ensaios foram realizados em Erlenmeyer de 500 mL, com volume útil de 300 mL. O inóculo foi oriundo de reator UASB, correspondendo a 10 %, o restante foi adicionado meio de cultivo Del Nery e a fonte de carbono foi o glicerol residual. Semanalmente foi analisado DQO e pH. A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que agitação não apresentou influência na remoção de DQO, a máxima remoção foi na relação C/N 40, correspondendo a 62,22 %. Com o aumento da relação C/N a remoção da matéria orgânica foi reduzida, possivelmente causada pela inibição pelo substrato. Portanto, verificou-se que o fator influente na digestão anaeróbia de glicerol foi a relação C/N e a agitação não apresentou diferença significativa. Desta forma resulta-se em redução de custos para a produção de energia.

4.1.2 Introdução

A digestão anaeróbia está se tornando uma forma promissora e sustentável para produção de energia. Este processo já foi muito utilizado para a estabilização de matéria orgânica (SAWATDEENARUNAT et al., 2016). A digestão anaeróbia é um bioprocessamento que visa a degradação de matéria orgânica e formação de biogás, predominando em sua composição o metano. Este processo envolve diversas etapas e micro-organismos. Inicialmente é realizada hidrólise da matéria orgânica, seguida de acidogênese, etapa em que as moléculas são convertidas em álcoois, ácidos graxos voláteis, dióxido de carbono e hidrogênio. Após ocorre a acetogênese, que utiliza os produtos da etapa anterior para geração de hidrogênio, dióxido de carbono e acetato. A última etapa deste processo é a metanogênese em que ocorre a produção de metano e dióxido de carbono, principalmente (FONSECA e TEIXEIRA, 2008).

A utilização de fontes alternativas de carbono vem sendo alvo de diversas pesquisas, dentre as fontes de carbono estudadas, o glicerol vem se tornando uma fonte de carbono interessante para o cultivo de micro-organismos (VARRONE, 2014; PACHAPUR et al., 2015). O glicerol pode ser uma fonte de carbono altamente assimilável por micro-organismos, também possui em sua composição micronutrientes, como fósforo, enxofre, magnésio, cálcio,

nitrogênio e sódio (XIU et al., 2007). Alguns autores tem utilizado o glicerol na digestão anaeróbia, obtendo etanol e hidrogênio (VARRONE, 2014), com rendimentos de 500 kg ton⁻¹ de glicerol e 250 kg ton⁻¹ de glicerol, respectivamente. O glicerol é obtido a partir da produção de biodiesel, representando 10 % do total produzido, sendo este um subproduto com aplicações na indústria de alimentos, fármacos e cosméticos. Porém, para sua utilização é necessário realizar sua purificação, elevando os custos deste subproduto (OOI et al., 2004). Assim torna-se interessante a utilização do glicerol como fonte de carbono uma alternativa promissora e de baixo custo para o cultivo de micro-organismos.

Para obtenção de alta eficiência do produto desejado a partir da digestão anaeróbia alguns parâmetros são significativos, como temperatura, relação carbono/nitrogênio (C/N), inóculo e agitação. A temperatura é um dos fatores que mais influencia na estabilidade do processo de digestão anaeróbia, influenciando o equilíbrio termodinâmico das reações bioquímicas, a estrutura da comunidade microbiana e a atividade enzimática (QIANG et al., 2016). Em condições termofílicas (50-60 °C) pode ocorrer a inibição de micro-organismos metanogênicos, havendo maior degradação de proteínas e liberação de amoníaco e ácidos graxos livres no meio líquido (BOROWSKI, 2015). As limitações termodinâmicas são reduzidas, facilitando a liberação do biogás do meio líquido (BECKERS et al., 2015).

A relação C/N é de suma importância visto que o carbono é utilizado como fonte de energia e devido a associação ao nitrogênio na obtenção de proteínas, ácidos nucleicos e enzimas que são fundamentais para a o crescimento de micro-organismos (CAMPBELL e FARRELL, 2008). Estudos demonstram que este parâmetro influencia a produção de hidrogênio na digestão anaeróbia, concluindo que maior relação C/N, 140, a produção de hidrogênio é maior, já quando busca-se a produção de metano a faixa ótima de carbono/nitrogênio é 25 (ANZOLA-ROJAS et al., 2015; LI et al., 2011; PUYUELO et al., 2011).

A agitação afeta na homogeneidade do inóculo com o substrato, facilitando a degradação do substrato além de manter a temperatura uniforme, quando em excesso pode prejudicar os micro-organismos, causando morte celular. Além disso, a agitação é importante para a transferência de massa do gás da fase líquida para fase gasosa, visto que sem agitação a transferência é reduzida (CONRAD et al., 1985), na ausência de agitação pode ocorrer a formação de espuma (STROOT et al., 2001). Também com a agitação em excesso pode ocorrer a destruição dos flocos anaeróbios, mas não apresentando efeito na produção de

biogás (HOFFMANN et al., 2008). Em vista do que foi exposto, o principal objetivo do trabalho foi verificar a influência da agitação e da relação C/N na degradação da matéria orgânica por digestão anaeróbia de glicerol.

4.1.2 Material e Métodos

4.1.2.1 Inóculo e meio de cultivo

O lodo anaeróbio foi obtido de reator UASB utilizado para o tratamento de uma rede de supermercado, localizado na cidade de Panambi, no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. O lodo foi mantido em temperatura ambiente até sua utilização nos ensaios, os sólidos totais foi $13,51 \pm 0,17 \text{ g L}^{-1}$ e sólidos voláteis foi $8,21 \pm 0,23 \text{ g L}^{-1}$. Foi realizado um pré-tratamento térmico a fim de inativar os micro-organismos consumidores de hidrogênio, o lodo anaeróbio foi aquecido a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 min, após resfriado em banho de gelo e o pH foi ajustado em 5,5 (SIRGH e ZULARISAM, 2015). Após foi adicionado 10 % do volume útil de inóculo.

A fonte de carbono utilizada foi o glicerol residual, fornecido pela empresa BSBIOS (Passo Fundo/RS, Brasil), sua composição esta descrita na Tabela 1.

Tabela 1 – Caracterização do glicerol residual.

Parâmetro	Resultado (%)
Umidade	12,15
Glicerol	82,69
Cinzas	3,26
Cloreto de sódio	3,61
pH	5,34
Teor de metanol	0,04

Fonte: BSBIOS

O glicerol foi adicionado ao meio cultivo Del Nery (Del Nery, 1987, adaptado por Ferreira, 2015) (Tabela 2), representando uma água residual, e o pH foi ajustado entre 6 e 7. Para a solubilização do glicerol ao meio de cultivo foi necessário aquecimento a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 20 min.

Tabela 2 - Composição do meio de cultivo Del Nery utilizado para partida do reator.

Composição	Concentração (mg L ⁻¹)
Ureia	125,00
Fosfato de potássio monobásico	85,00
Fosfato de potássio dibásico	21,70
Fosfato de sódio dibásico	33,40
Cloreto de cálcio	47,00
Sulfato de níquel	1,00
Sulfato ferroso	5,00
Cloreto férrico	0,50
Cloreto de cobalto	0,08

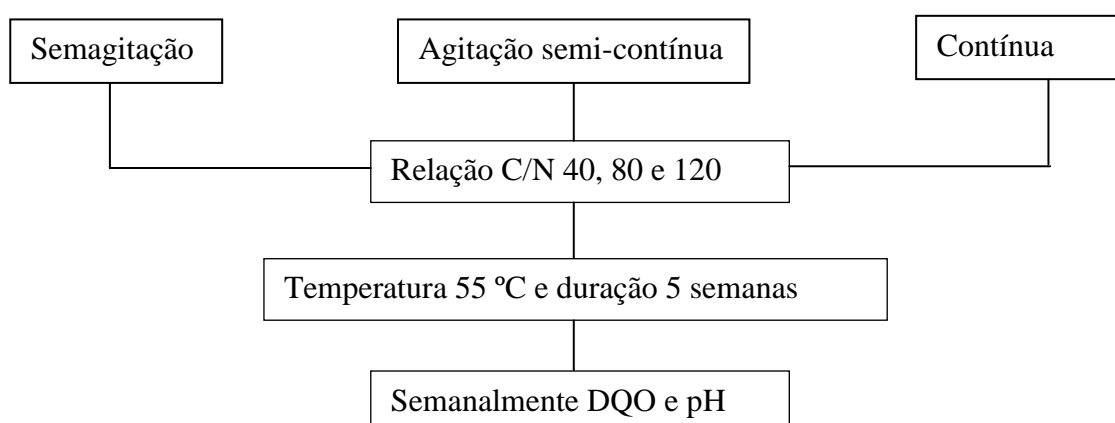
Fonte: Del Nery, 1987, adaptado Ferreira, 2015.

4.1.2.2 Condições experimentais

Os ensaios foram realizados em Erlenmeyer de 500 mL, com volume útil de 300 mL, vedado com rosca de silicone e mantidos em shaker orbital termostatzado (NEW BRUNSWICK, INNOVA 44) na temperatura de 55 °C. A relação C/N utilizada foi 40, 80 e 120, determinadas por estequiometria, mantendo fixa a concentração de nitrogênio (ureia). Além da relação C/N foi verificada a influência da agitação na degradação da matéria orgânica, variando em agitação contínua, semi-contínua (4 h) e sem agitação. Os ensaios com agitação foram realizados em velocidade de agitação de 100 rpm.

Durante os ensaios não houve correção de pH e totalizaram 5 semanas de duração. A Figura 1 mostra o esquema realizado para os ensaios.

Figura 1 - Esquema da realização dos ensaios.



4.1.2.3 Métodos analíticos e resposta avaliada

Semanalmente foi avaliada a demanda química de oxigênio (DQO), a partir do método refluxo fechado e verificado pH (APHA, 2005).

A remoção cumulativa de DQO foi calculada a partir da Equação 1.

$$\% DQO_{remoção\ cumulativa\ t} = \frac{DQO_{t\ inicial} - DQO_t}{DQO_{t\ inicial}} \times 100 \quad (1)$$

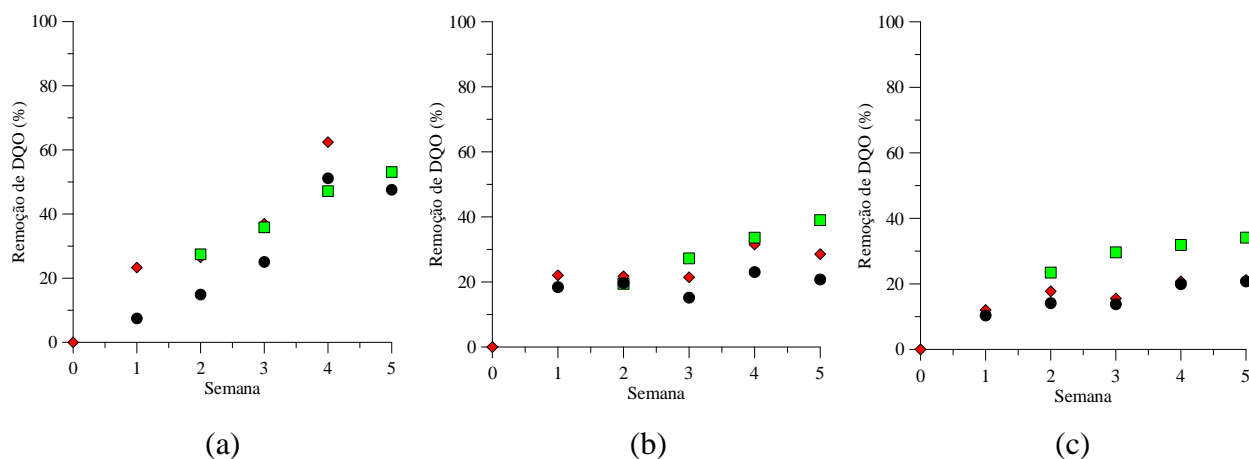
4.1.2.4 Análise estatística

Os resultados foram comparados através da análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, com nível de 95% de confiança ($p < 0,05$).

4.1.3 Resultados e Discussão

A Figura 2 (a) mostra que a remoção de matéria orgânica na relação C/N 40, obteve o mesmo perfil de degradação nas diferentes formas de agitação, obtendo na quarta semana a máxima remoção de DQO (62,22 %) no ensaio sem agitação. Nas demais semanas o perfil de degradação da matéria orgânica são próximos entre as formas de agitação estudadas no ensaio com relação C/N 40. Isto pode ter ocorrido devido a relação utilizada não ser limitante para ocasionar influência na remoção de DQO. Na relação C/N 80, Figura 2 (b), os ensaios com 4 h de agitação e sem agitação obtiveram menor remoção de DQO em relação a agitação contínua, removendo até 39,10 % na quinta semana. Utilizando a relação C/N 120, Figura 2 (c), a agitação contínua proporcionou maior remoção de DQO, em relação aos demais ensaios. Nesta relação, pode-se verificar que a agitação é limitante para remoção da matéria orgânica, havendo maior remoção de DQO quando a agitação foi contínua 34,12 %. A remoção de DQO nos ensaios sem agitação e agitação semi-contínua ficou em torno de 20 %.

Figura 2 - Eficiência de remoção da demanda química de oxigênio (DQO) nas relações de C/N 40 (a), 80 (b) e 120 (c), com diferentes formas de agitação ■ contínua (100 rpm), ● 4 horas (100 rpm) e ◆ sem agitação.



A agitação pode influenciar na disponibilidade de nutrientes e homogeneização do meio de cultivo, o que pode explicar o perfil obtido nos resultados, não ocorrendo a agitação de forma adequada a remoção de matéria orgânica também é afetada. Rodrigues et al. (2004) quando estudou a implantação de um perfil de agitação variável ao longo de 6 h, a agitação foi 60 min – 75 rpm; 220 min – 50 rpm e 30 min – 25 rpm, também foi verificado a influência com a agitação contínua em 50 rpm – 6 h, a agitação variável apresentou melhor eficiência do reator, sem prejudicar a qualidade de sedimentação e com isso não houve o rompimento do grânulo. Outro fator que pode ocasionar influência na remoção de matéria orgânica é a produção de ácidos orgânicos voláteis, os quais são quantificados na análise de DQO. Devido a realização de tratamento térmico para inibição dos micro-organismos metanogênicos, há um acúmulo de ácidos orgânicos, portanto, a digestão anaeróbia pode não ser completa, os ácidos acumulados são em maior concentração acético, butírico e propiônico e também alguns álcoois (FERREIRA, 2014).

Avaliando a eficiência da remoção de matéria orgânica em relação as diferentes relações C/N (Figura 2). Pode-se observar que a máxima remoção de matéria orgânica foi na relação C/N 40 (superior a 50 %) (Figura 2, a), independente da agitação, não apresentando diferença significativa no final da quinta semana. Nos ensaios sem agitação (◆) a relação C/N 40 obteve remoção de DQO próximo a 57 % ao final de 5 semanas, conforme a relação C/N aumenta de 80 para 120 a remoção da matéria orgânica é reduzida, alcançando cerca de 30 % e 20 %, respectivamente. A agitação de 4 horas (●) apresentou maior remoção de DQO na

relação C/N 40 (51 %), não houve diferença significativa nas relações C/N de 80 e 120 para a remoção de matéria, finalizando a quinta semana com remoção de DQO de aproximadamente 20 %, em ambos os ensaios. O mesmo perfil observado para a agitação de 4 horas (●) foi obtido para a agitação contínua (■), obtendo remoção de DQO para a relação C/N 40 de 53 %, relação C/N 80 de 39 % e para relação C/N 120 de 34 %. Este fato pode ser explicado devido a relação C/N 120 apresentar fonte de carbono em excesso, o que pode ter ocasionado a inibição das bactérias.

Nos estudos realizados por Albuquerque (2014) pode-se observar que o aumento da concentração da fonte de carbono causa a redução da eficiência de remoção de DQO, verificou-se o mesmo comportamento no presente trabalho. Este fenômeno pode ser explicado segundo estudo realizado por Hutnan et al., (2009) que verificou que a degradação anaeróbia de glicerol bruto é sensível a altas cargas orgânicas. A partir destas conclusões, pode-se dizer que a relação C/N 120 reduz a eficiência de remoção de DQO, desta forma tornando-se prejudicial a fins de tratamento do glicerol.

A disponibilidade de nutrientes pode ter influenciado neste resultado, pois quando há o fornecimento em excesso, pode ocorrer a inibição celular causando a morte dos micro-organismos. Este fato pode ter ocorrido na utilização da relação C/N 120, em especial quando se estudou a agitação contínua, houve maior homogeneização dos nutrientes, apresentando remoção de DQO de 34,12 %, porém ainda menor que na relação C/N 40 e 80. O acúmulo de metabólitos secundários do metabolismo pode afetar o crescimento celular, inibindo alguns micro-organismos por excesso de substrato. A partir de análise estatística referente aos valores máximos de remoção de DQO, apresentada na Tabela 3, certificou-se que o fator influente para remoção de matéria orgânica foi a relação C/N e não a forma de agitação.

Tabela 3 - Percentual de remoção máxima de DQO em diferentes relações de C/N.

Condição experimental	Relação C/N 40	Relação C/N 80	Relação C/N 120
Sem agitação (%)	62,22 ^{a,A} ±0,35	31,51 ^{b,A} ±0,19	20,73 ^{c,A} ±1,06
Agitação semi-contínua (%)	51,12 ^{a,A} ±5,06	20,73 ^{b,A} ±8,97	20,16 ^{b,A} ±1,27
Agitação contínua (%)	53,10 ^{a,A} ±39,04	39,01 ^{a,A} ±7,69	34,12 ^{a,A} ±6,22

*Valores médios de ensaios realizados em duplicata ± desvio padrão. Letras minúsculas iguais na mesma linha e letras maiúsculas iguais na mesma coluna representam que não houve diferença significativa estatisticamente (p<0,05).

Conforme verificado na Tabela 3, na mesma relação C/N e diferentes formas de agitação não houve diferença significativa na remoção de DQO. Quando verificado na mesma forma de agitação, as diferentes relações de C/N apresentaram diferença significativa na remoção de DQO ($p > 0,05$). Somente a agitação contínua não apresentou diferenças entre as relações de C/N estudadas. Nos ensaios sem agitação e agitação semi-contínua a máxima remoção foi obtida na relação C/N 40, apresentando remoção de DQO de 62,22 % e 51,12 %, respectivamente. Desta forma visando a máxima remoção de matéria orgânica e redução de custos operacionais, a aplicação da relação C/N de 40 não utilizando agitação mostrou-se uma forma promissora para o tratamento deste resíduo a partir da digestão anaeróbia.

Também é importante ressaltar que o pH dos ensaios variou entre 6,5 a 7,5, visto este ser o pH ideal para digestão anaeróbia, sendo o produto pretendido o hidrogênio. Este é um parâmetro importante de processo, alterando a atividade de enzimas e com isso prejudicando a produção deste gás (WANG e WAN, 2008).

4.1.4 Conclusão

A partir dos resultados obtidos, verificou-se que o fator influente na digestão anaeróbia de glicerol foi a relação carbono/nitrogênio, não havendo diferença significativa entre as formas de agitação. Quando ocorre o aumento da relação C/N nos ensaios sem agitação a remoção de matéria orgânica é reduzida. Para a agitação de 4 h e contínua a relação C/N 80 e 120 não apresentou diferença significativa na remoção de matéria orgânica. Os melhores resultados foram obtidos na relação C/N 40, resultando na remoção de 62,22% de DQO, sem haver diferença significativa entre as formas de agitação. Portanto para o tratamento deste efluente pode-se escolher o ensaio sem agitação na relação C/N 40, havendo redução dos custos com a agitação e obtendo remoção de matéria orgânica superior a 50 %. Desta forma a digestão anaeróbia de glicerol residual é um processo promissor para o tratamento deste resíduo, além de auxiliar no tratamento deste resíduos também é possível gerar energia através do biogás.

4.1.5 Referências bibliográficas

ALBUQUERQUE, A. F. G. **Tratamento do glicerol bruto proveniente da produção de biodiesel visando a geração de metano**. Dissertação, Universidade Federal de Ouro Preto, 2014.

ANZOLA-ROJAS, M.DEL P.; FONSECA, S. G.; SILVA, C. C.; OLIVEIRA, V. M.; ZAIAT, M. The use of the carbono/nitrogen ratio and specific organic loading rate as tools for improving biohydrogen production in fixed-bed reactors. **Biotechnology Reports**, v. 5, 2015.

APHA – American Public Health Association; AWWA – American Water Works Association; WEF – Water Environment Federation. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. Washington, D. C, 2005.

BECKERS, L.; MASSET, J.; HAMILTON, C.; DELVIGNE, F.; TOYE, D.; CRINE, M.; THONART, P.; HILIGSMANN, S. Investigation of the links between mass transfer conditions, dissolved hydrogen concentration and biohydrogen production by pure strain *Clostridium butyricum* CWBI1009. **Biochemical Engineering Journal**, v. 98, 2015.

BOROWSKI S. Temperature-phased anaerobic digestion of the hydromechanically separated organic fraction of municipal solid waste with sewage sludge. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 105, 2005.

CAMPBELL, M. K.; FARRELL, S. O. **Bioquímica. Trad. de A. Tasks**. São Paulo: Thomson Learning, 2008.

CONRAD, R.; PHELPS, T. J.; ZEIKUS, J. G. Gas metabolism evidence in support of the juxtaposition of hydrogen-producing and methanogenic bacteria in sewage sludge and lake sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, 1985.

DEL NERY, V. **Utilização de lodo anaeróbio imobilizado em gel no estudo de partida de reatores de fluxxo ascendente com manta de lodo**. Dissertação, Universidade de São Paulo, 1987.

FERREIRA, J. **Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidizado a partir de glicerol bruto sob condições termofílicas**. Dissertação mestrado. Universidade Federal de São Carlos. 2014.

FONSECA, M. M.; TEIXEIRA, J. A. **Biological Reactors Fundamentals and Applications**. Editora: Lidel (2007).

HOFFMANN, R. A.; GARCIA, M. L.; VESLIVAR, M.; KARIN, K.; AL-DAHAN, M. H.; ANGENENT, L. T. Effect of shear on performance and microbial ecology of continuously stirred anaerobic digesters treating animal manure. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 100, 2008.

HUTNAN, M.; KOLESÁROVÁ, N.; BODIK, I.; SPALKOVÁ, V.; LAZOR, M. **Possibilities of anaerobic treatment of crude glycerol from biodiesel production**. 36TH International Conference Of Ssche. 2009.

LI Y.; PARK S.Y.; ZHU J. Solid-state anaerobic digestion for methane production from organic waste. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, 2011.

OOI, T. L.; YONG, K. C.; HAZIMAH, A. H.; DZULKEFLY, K.; WAN YUNUS, W. M. Z. Glycerol Residue-A Rich Source of Glycerol and Medium Chain Fatty Acids. **Journal of Oleo Science**, v. 53, n. 1, p. 29–33, 2004.

PACHAPUR, V. L.; SARMA, S. J.; BRAR, S. K.; BIHAM, Y. B.; BUELMA G.; VERMA, M. Biohydrogen production by co-fermentation of crude glycerol and apple pomace hydroly sate using co-culture of *Enterobacter aerogenes* and *Clostridium butyricum*. **Bioresource Technology**, v. 193, 2015.

PUYUELO B, PONSÁ S, GEA T & SÁNCHEZ A. Determining C/N ratios for typical organic wastes using biodegradable fractions. **Chemosphere**, v. 85, 2011.

QIANG, L.; VRIEZE, J. D.; LI, J.; LI, X.; Temperature affects microbial abundance, activity and interacions in digestion anaerobis. **Bioresource Technology**, v. 209, 2016.

RODRIGUES, J. A. D.; PINTO, A. G.; GEDRAITE, R. RATUSZNEI, S. ZAIAT, M. Enhancement of the performance of an anaerobic sequencing batch reactor treating low-strength wastewater through implementation of the variable stirring rate program. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.21, 2004.

SAWATDEENARUNAT, C.; NGUYED, D.; SURENDRA, K. C.; SHERESTHA, S.; RAJENDRAN, K.; OECHSNER, H.; XIE, L.; KHANAL, S. K. Anaerobic biorefinery: Current status, challenges, and opportunities. **Bioresource Technology**, v. 215, 2016.

SIRGH, L.; ZULARISAM, A. W. Methods for enhancing bio-hydrogen productions from biological process: A review. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 21, 2015.

STROOT, P. G.; MACMAHON, K. D.; MACKIE, R. I.; RASKIN, L. Anaerobic codigestion of municipal solid waste and biosolids under various mixing conditions—I. Digester performance. **Water Resource**, 35 (2001).

Varrone, Cristiano. Crude glycerol fermenting process for the production of ethanol and hydrogen. C12P7/06, C112P7/14. US 20140295515A1. 12 set. 2012: 4 jun. 2014. 2 out. 2014.

WANG, J.; WAN, W. Optimization of fermentative hydrogen production process by response surface methodology. *International journal of hydrogen production*, 33 (2008).

XIU, Z-L.; CHEN, X.; SUN, T-Q.; ZHANG, D-J. Stoichiometric analysis and experimental investigation of glycerol–glucose co-fermentation in *Klebsiella pneumoniae* under microaerobic conditions. *Biochemical Engineering Jornal*, 33, 1 (2007).

4.2 ARTIGO 2 - AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO A PARTIR DA DIGESTÃO ANAERÓBIA DE GLICEROL UTILIZANDO DOIS TIPOS DE PRÉ-TRATAMENTOS AO INÓCULO.

Bracher, Eduarda Holz^a; Santana, Fabricio^b Hoffmann, Ronaldo^a

^aDepartamento Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, Santa Maria, Brasil. ^b Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande, Brasil.

4.2.1 Resumo

O hidrogênio é um gás com alto valor energético, a sua produção através de rotas bioquímicas vem sendo estudada. A partir da digestão anaeróbia é possível sua produção, porém se faz necessário a eliminação de micro-organismos metanogênicos. A eliminação destes micro-organismos pode ser realizada através de tratamento térmico ao inóculo, sendo este um método descrito como eficiente na literatura. O glicerol possui características favoráveis para sua aplicação como fonte de carbono em meio de cultivo para micro-organismos. Dentro deste contexto, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da aplicação de dois tratamentos térmicos no inóculo durante a digestão anaeróbia de glicerol para a geração de hidrogênio. Foram utilizados reatores Oxitop®, com volume útil de 200 mL e volume de “headspace” de 117 mL. O glicerol foi utilizado como fonte de carbono, adicionado ao meio de cultivo Del Nery, a relação carbono/nitrogênio foi de 40, mantido sem agitação e temperatura de 55 °C, durante 168 h. Avaliou-se o tratamento térmico ao inóculo, o qual foi oriundo de reator UASB, mantido em banho termostatizado a 80 °C durante 30 min e em estufa a 105 °C durante 15 h e, a fim de comparação, foi realizado ensaio sem aplicação do tratamento. Os parâmetros avaliados foram a produção de hidrogênio, volume de biogás gerado, ácidos orgânicos voláteis, pH e remoção da DQO. A partir dos resultados verificou-se que o tratamento térmico de 105 °C durante 15 h, foi eficiente para eliminação dos micro-organismos metanogênicos, alcançando em 66 h a concentração máxima de hidrogênio de 0,345 mmol_{H2} L⁻¹. O ensaio com tratamento de 80 °C durante 30 min, a produção de metano foi identificada a partir de 24 h e, no ensaio controle, a produção de metano foi identificada

com apenas 9 h do início do processo. Desta forma, o tratamento térmico a 105 °C durante 15 h, foi eficiente para eliminação dos micro-organismos metanogênicos, havendo também a remoção de 58 % do glicerol e a conversão de $0,0815 \text{ mol}_{\text{H}_2} \text{ mol}_{\text{glicerol}}^{-1}$ ao final de 168 h.

4.2.2 Introdução

O hidrogênio é considerado um combustível limpo, a partir de sua queima obtêm-se apenas água e energia. Desta forma, são liberados menos poluentes atmosféricos comparando-se com combustíveis fósseis (GOMES, NETO, 2005). Este gás possui um alto teor de energia, aproximadamente 122 kJ g^{-1} , e rendimento energético 2,75 vezes superior ao de outros combustíveis fósseis (SIRGH; ZULARISAM, 2015). Porém, a produção deste combustível ainda se dá a partir de rotas químicas, como a hidrólise química, gaseificação de biomassa, pirólise, eletrólise, foto eletroquímica e reforma à vapor do gás natural. Estes processos químicos necessitam de altas temperaturas e pressões, o que aumenta os custos para a produção de hidrogênio (SANTOS e SANTOS, 2005).

Como alternativa, estão em desenvolvimento novas técnicas que utilizam resíduos orgânicos como substrato, gerando um composto com características ideais para aplicação no solo agrícola (LAMAISON, 2009), dentre estas técnicas encontram-se as rotas bioquímicas para geração de hidrogênio (biohidrogênio), como a fotofermentação, a biofotólise direta e indireta e a digestão anaeróbia. Que apresentam vantagens devido as condições de trabalho não necessitarem de elevada temperatura e pressão.

A digestão anaeróbia é conhecida como a fonte mais promissora para geração de energia sustentável, pois pode degradar diversos substratos para a geração de biogás. Este processo inicialmente foi desenvolvido para a estabilização de material orgânico, porém hoje estuda-se este processo para ampliar as fontes de energia (SAWATDEENARUNAT et al., 2015). Este bioprocessos envolve diversos micro-organismos e etapas bioquímicas para a degradação de materiais orgânicos e produção de biogás (DHAKED et al., 2010). A etapa inicial é a hidrólise, seguida da acidogênese e acetogênese, finalizando com a metanogênese. Para a produção de hidrogênio é necessária a inibição da etapa metanogênica, visto que os micro-organismos envolvidos consomem o hidrogênio produzido para geração de metano (BUNDHOO; MOHEE; HASSAN, 2015).

Existem diversas formas de eliminar os micro-organismos metanogênicos, utilizando processos físicos e/ou químicos, o mais utilizado é o tratamento térmico (BUNDHOO; MOHEE; HASSAN, 2015; SIRGH; ZULARISAM, 2015). Segundo Kawagoshiet al. (2005) o tratamento térmico aplicado ao inóculo obteve maior rendimento em hidrogênio quando realizado o ajuste de pH do inóculo. A utilização do calor faz com que os micro-organismos mais resistentes, acidogênicos, formem esporos e com isso sejam capazes de resistir a elevadas temperaturas (VALDEZ-VASQUEZ; POGGI-VARALDO, 2009).

A utilização de glicerol residual se torna atraente devido a elevada produção de biodiesel, sendo este um subproduto da produção de biodiesel, para cada 100 kg de biodiesel são gerados 10 kg de glicerol. A utilização deste subproduto no setor alimentício, fármacos, cosméticos necessita a purificação, aumentando os custos. Devido sua composição nutricional, pode ser utilizado em cultivo de micro-organismos, desta forma reduzindo os custos com fontes de carbono inorgânicas e auxiliando no tratamento deste subproduto. Assim, a digestão anaeróbia torna-se um bioprocessamento atraente, pois além de gerar energia, pode também servir como etapa de tratamento biológico do glicerol residual. Segundo Dillies et al., (1980) o glicerol é uma fonte de carbono altamente assimilável por bactérias e leveduras em cultivo tanto aeróbio, quanto anaeróbio.

Segundo pesquisas desenvolvidas por Varrone (2014) e Silva et al. (2009) a digestão anaeróbia de glicerol pode obter produtos com alto valor agregado, como a produção de hidrogênio, 1,3-propanodiol, etanol, butanol, ácidos orgânicos voláteis (AOV). Varone (2014) obteve a partir da digestão anaeróbia de glicerol a produção de etanol e hidrogênio, correspondendo a um rendimento de 500 kg ton^{-1} de glicerol e $260 \text{ m}^3 \text{ ton}^{-1}$ de glicerol, respectivamente. Segundo estudo realizado por Ferreira (2014), utilizando glicerol na digestão anaeróbia, obteve um fator de conversão de glicerol em hidrogênio de $1,2 \text{ mol}_{\text{H}_2} \text{ mol}_{\text{glicerol}}^{-1}$, quando aplicado TRH de 14 h. Em vista disto, a aplicação da digestão anaeróbia para produção de hidrogênio torna-se um processo promissor para a geração de energia sustentável. Aborda-se neste contexto, o conceito de biorrefinarias a este processo, o qual busca o aproveitamento máximo dos resíduos gerados, obtendo novos produtos (GARLAPATI; SHANKAR; BUDHIRAJA, 2016). Dentro deste contexto, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da aplicação de dois tratamentos térmicos no inóculo durante a digestão anaeróbia de glicerol para a produção de hidrogênio.

4.2.3 Material e Métodos

4.2.3.1 Inóculo e meio de cultivo

O lodo anaeróbico foi obtido de um reator de fluxo ascendente com manta de lodo (UASB) para tratamento de água de parboilização de arroz (Rio Grande do Sul, Brasil). Neste inóculo, realizou-se dois pré-tratamentos térmicos para eliminar os micro-organismos metanogênicos. Um dos pré-tratamentos consistiu em aquecer o inóculo a 80 °C em banho termostaticado durante 30 min e após resfriar em banho de gelo até temperatura ambiente (WANG et al., 2011). No outro pré-tratamento avaliou-se a secagem do inóculo a 105 °C durante 15 h (SIQUEIRA e REGINATTO, 2015). Foi caracterizado quanto aos sólidos totais, correspondendo a 19,70 g L⁻¹ e sólidos voláteis, correspondendo a 11,23 g L⁻¹.

O glicerol residual utilizado como fonte de carbono, foi fornecido pela empresa BSBIOS (Rio Grande do Sul, Brasil), sua composição esta descrita na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição do glicerol residual.

Parâmetro	Resultado (%)
Umidade	12,15
Glicerol	82,69
Cinzas	3,26
Cloreto de sódio	3,61
pH	5,34
Teor de metanol	0,04

Fonte: BSBIOS

Este substrato foi adicionado ao meio de cultivo Del Nery (Tabela 2), representando uma água residual, correspondendo a relação carbono/nitrogênio 40. Para a solubilização do glicerol ao meio de cultivo foi necessário o aquecimento do mesmo a 60 °C durante 20 min (FERREIRA, 2014).

Tabela 2 - Composição do meio de cultivo utilizado no reator.

Composição	Concentração (mg L⁻¹)
Ureia	125,00
Fosfato de potássio monobásico	85,00
Fosfato de potássio dibásico	21,70
Fosfato de sódio dibásico	33,40
Cloreto de cálcio	47,00
Sulfato de níquel	1,00
Sulfato ferroso	5,00
Cloreto férrico	0,50
Cloreto de cobalto	0,08

Fonte: Del Nery, 1987.

4.2.3.2 Condições experimentais

Os ensaios foram realizados em reatores Oxitop® sem agitação, com volume útil de 200 mL e volume de “headspace” de 117 mL, mantidos em estufa termostaticada a 55 °C. A relação de carbono/nitrogênio estudada foi de 40, determinada pela estequiometria em função da quantidade de glicerol adicionada ao meio, utilizando ureia como fonte de nitrogênio. Durante os ensaios não houve ajuste de pH, sendo injetado argônio para remoção de oxigênio nos reatores durante 5 min, e o tempo de duração dos mesmos foi de 168 h.

4.2.3.3 Respostas avaliadas

A produção de hidrogênio foi avaliada utilizando-se cromatógrafo a gás (SHIMADZU, GC-2014), com detector de condutividade térmica (TCD), coluna Carboxen 1000 (Supelco), com as temperaturas do injetor e detector de 280 °C, usando argônio como gás de arraste, com vazão de 30 mL min⁻¹. A rampa de aquecimento da coluna inicialmente foi de 100 °C até 240 °C a uma taxa de 30 °C min⁻¹ e o volume de amostra foi 400 µL. A amostra foi coletada diretamente no reator, com a seringa própria para gases e imediatamente analisada.

A pressão foi obtida a partir do equipamento Oxitop® o qual possui um sistema para quantificação da pressão exercida no “headspace”. O volume de hidrogênio produzido foi determinado segundo a equação dos gases ideais, Equação 1:

$$P \times V = n \times R \times T \quad (1)$$

A demanda química de oxigênio (DQO) e o pH foram determinados segundo metodologia APHA (2005). Os ácidos orgânicos voláteis (AOV) foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (SHIMADZU), segundo metodologia descrita por Cerqueira et al. (2010).

A determinação da concentração de glicerol foi realizada a partir de cromatografia a gás (VARIAN, STAR 3400 CX), com detector por ionização de chama (FID), coluna BPX 5 (SGE). As temperaturas do injetor e detector foram 300 °C e 280 °C, respectivamente. A temperatura inicial da coluna foi de 50 °C por 1 min, até 300 °C a uma taxa de 15 °C min⁻¹ e mantida durante 5 min na temperatura de 300 °C, o volume de amostra foi de 1 µL e a injeção foi realizada com Split na razão 1:10. O gás de arraste foi hidrogênio, com vazão de 1,25 mL min⁻¹, e para a chama foi utilizada a combinação de nitrogênio (30 mL min⁻¹) e ar sintético (300 mL min⁻¹).

Para o preparo das amostras foram utilizados 150 µL de amostra, colocando-as em bloco digestor a 60 °C com injeção de nitrogênio (100 mL min⁻¹) para evaporação da fase líquida, após adicionando 150 µL de piridina e 100 µL de derivatizante N-Metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA). Após agitou-se a solução em agitador vortex, deixando em repouso durante 20 min a 30 °C. A curva padrão foi realizada da mesma maneira, variando a concentração de glicerol P.A de 5 µg mL⁻¹ a 200 µg mL⁻¹, para pontos acima da curva foi realizada diluição em piridina.

A remoção de DQO e glicerol foram determinados segundo a Equação 2, onde C_i é a concentração inicial e C_f é a concentração final.

$$\% \text{ Remoção}_{cumulativa} = \frac{C_i - C_f}{C_i} \times 100 \quad (2)$$

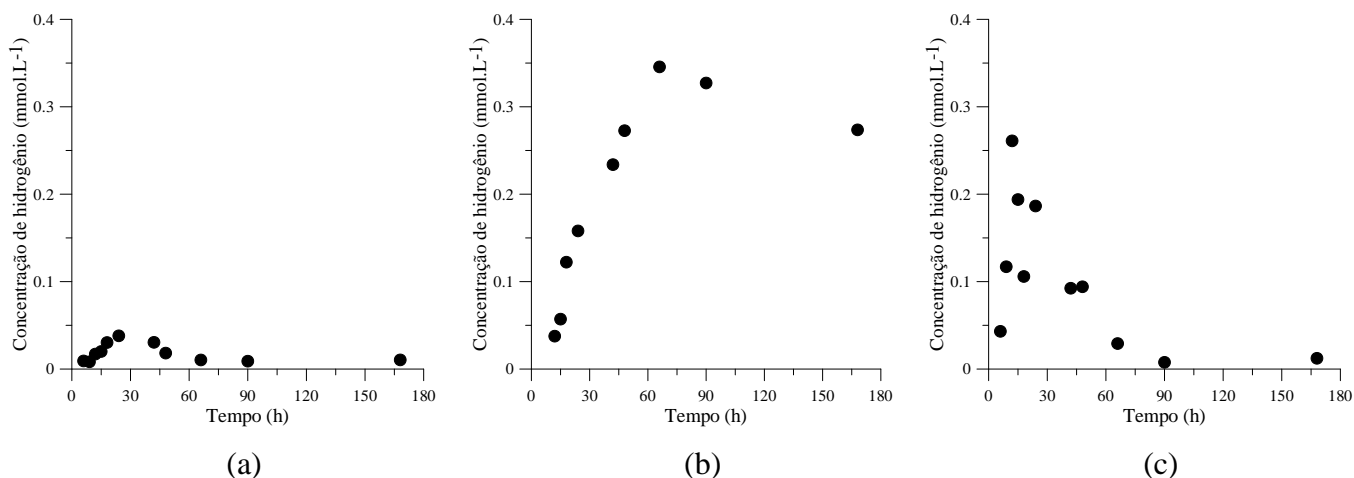
4.2.3 Resultados e discussão

A aplicação do tratamento térmico ao inóculo apresentou influência na produção de hidrogênio, como verificado na Figura 1. A máxima concentração de hidrogênio foi 0,345 mmol L⁻¹, obtida na condição em que o inóculo foi tratado a 105 °C durante 15 h (Figura 1, b). Neste ensaio não houve produção de metano durante todo processo, podendo justificar a queda da concentração de hidrogênio devido a oxidação do hidrogênio gerando outros substratos que são utilizados pelos micro-organismos. No tratamento a 80 °C durante 30 min (Figura 1, c) a produção de hidrogênio foi verificada apenas nas primeiras 24 h, alcançando a concentração de 0,261 mmol L⁻¹. Após houve a produção de metano, o que pode explicar a queda na produção de hidrogênio. Um ensaio controle foi realizado para comparação com lodo sem tratamento, apresentando baixa produção de hidrogênio (0,038 mmol L⁻¹) com a produção de metano identificada a partir de 9 h da digestão anaeróbia (Figura 1, a).

Fernandes (2008) realizou ensaios utilizando glicerol como fonte de carbono para a produção de hidrogênio, aplicando tratamento térmico de 100 °C durante 10 min e obteve concentração de hidrogênio de aproximadamente 1 mmol L⁻¹. Segundo o autor a produção de hidrogênio foi menor com o uso de glicerol quando comparado com sacarose, vinhaça e esgoto sanitário. Conforme Fernandes (2008) o consumo de glicerol total ocorreu em 10 h de digestão anaeróbia. No presente trabalho o consumo total de glicerol ocorreu apenas no tratamento de 80 °C durante 30 min, ao final de 168 h, obtendo remoção de 99,74 %. Os fatores que podem ter influenciado no consumo de glicerol e na produção de hidrogênio, foram o inóculo utilizado, a temperatura e a concentração de glicerol.

Segundo Costa (2010), o glicerol foi consumido totalmente em 32 h na produção de hidrogênio em reator batelada, porém não houve a eliminação de micro-organismos metanogênicos. Quando Costa (2010) aplicou o tratamento térmico (100 °C durante 15 min) a remoção de glicerol em 36 h foi de aproximadamente 65 %, mesmo percentual de remoção foi obtido no presente estudo quando aplicado o tratamento de dessecação (105 °C durante 2 h).

Figura 1 – Cinética de produção de hidrogênio (mmol L^{-1}) durante a digestão anaeróbia nos ensaios sem tratamento térmico (a), com tratamento térmico $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 h (b) e com tratamento térmico $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 min (c).

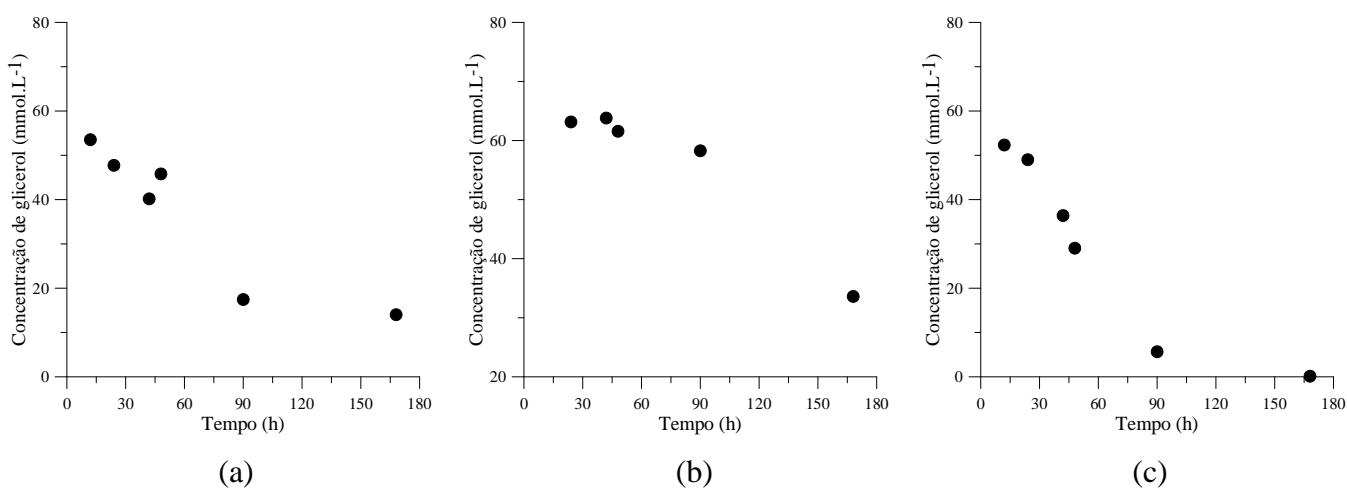


A produção de hidrogênio foi identificada a partir de 12 h de fermentação, o que no trabalho de Costa (2010) ocorreu após 24 h, havendo também tratamento ao inóculo. A máxima remoção ocorreu nos ensaios com tratamento de $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 min (Figura 2, c), quando no final de 168 h removeu-se 99,74 % de glicerol inicial. Quando aplicou-se um tratamento mais extremo aos micro-organismos, $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 h (Figura 2, b) a remoção de glicerol ocorreu de forma mais lenta, o que pode ter ocasionado a perda de grande parte dos micro-organismos presentes no lodo anaeróbio, chegando ao final de 168 h com a concentração de glicerol de $33,61\text{ mmol L}^{-1}$, correspondendo a remoção de 58,00 % de glicerol inicial.

Segundo Sarma et al. (2014) a remoção de glicerol máxima foi de 20 %, em 50 h de processo, em ensaio utilizando cultura pura. Foi realizado um ensaio controle (Figura 2, a), em que a concentração de glicerol tornou-se estável a partir de 90 h, havendo baixo consumo até o final da digestão anaeróbia ($14,02\text{ mmol L}^{-1}$), removendo 73,81 %. Alguns estudos relatam que a remoção total de glicerol ocorre em torno de 32 h. Porém, deve-se destacar que não houve agitação do meio reacional no presente trabalho, o que pode ter causado esta diferença, outro fator que pode ter influenciado, foi a concentração de inicial de glicerol e também este ser glicerol residual, possuindo compostos que podem ter causado toxicidade aos micro-organismos. Quando avaliou-se a remoção da DQO ao final de 168 h entre os ensaios obteve-se resultados próximos, no ensaio sem tratamento térmico a remoção foi 45 %, com a aplicação do tratamento térmico de $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 h foi 43,65 % e no tratamento a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$

durante 30 min foi 48,41 %, evidenciando, a quantificação de metabólitos secundários produzidos durante a digestão anaeróbia.

Figura 2 – Cinética de consumo de glicerol (mmol L^{-1}) durante a digestão anaeróbia nos ensaios sem tratamento térmico (a), com tratamento térmico $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 h (b) e $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 min (c).



A aplicação dos pré-tratamentos ao inóculo apresentou diferença significativa quanto à degradação do glicerol no final de 168 h de processo. No ensaio controle, a partir de 90 h, a remoção de glicerol não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$). No ensaio com aplicação de $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 h, a remoção de glicerol não foi significativa, no final de 168 h a remoção de glicerol foi 58,00 %, apresentando diferença significativa apenas neste ponto do processo. A aplicação de $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 min apresentou diferença significativa durante todo tempo analisado, alcançando ao final de 168 h remoção de 99,74 %.

Costa (2010) quando avaliou a eficiência de remoção do glicerol em 36 h, não obteve diferença significativa entre o tratamento térmico e a dessecação da biomassa. Este perfil não foi identificado nos presentes ensaios, avaliando no tempo de processo de 48 h entre os tratamentos térmicos de $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 h e $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 min, houve diferença significativa na remoção de glicerol, havendo maior percentual de remoção no tratamento de $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 min. Pode-se atribuir esta diferença devido ao tempo em que o inóculo foi dessecado, visto que a dessecação de Costa (2010) foi realizada em $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante apenas 2 h. Desta forma inativando maior número de micro-organismos, assim reduzindo de forma

mais lenta o glicerol. Também esta diferença pode estar associada que neste trabalho utilizou-se glicerol residual e não glicerol P.A.

Outro parâmetro importante é o pH, que manteve-se próximo em todos os ensaios, finalizando as 168 h em 5,1. Segundo a literatura este é um valor de pH ótimo para a produção de hidrogênio. Fang e Liu (2002) relataram que o pH favorável, obtido por ensaios para a produção de hidrogênio, foi de 5,5 e no pH em torno de 4,5, a produção de ácidos orgânicos voláteis era favorecida.

Tabela 3–Percentual de remoção de glicerol nos diferentes tratamentos aplicados ao inóculo.

Ensaio	Sem tratamento (%)	105 °C – 15 h (%)	80 °C – 30 min (%)
Tempo (h)			
24	10,82±0,062 ^{a,A}	21,19±6,15 ^{a,A}	4,67±4,63 ^{a,A}
48	14,44±5,23 ^{a,A}	22,99±0,02 ^{a,A}	43,52±0,93 ^{b,B}
90	67,41±0,06 ^{a,B}	27,36±0,43 ^{b,A}	88,98±0,63 ^{c,C}
168	73,81±0,09 ^{a,B}	58,00±1,24 ^{b,B}	99,74±0,01 ^{c,D}

*Valores médios de ensaios realizados em duplicata e ± desvio padrão. Letras minúsculas iguais na mesma linha e letras maiúsculas iguais na mesma coluna representam que não houve diferença significativa estatisticamente ($p < 0,05$).

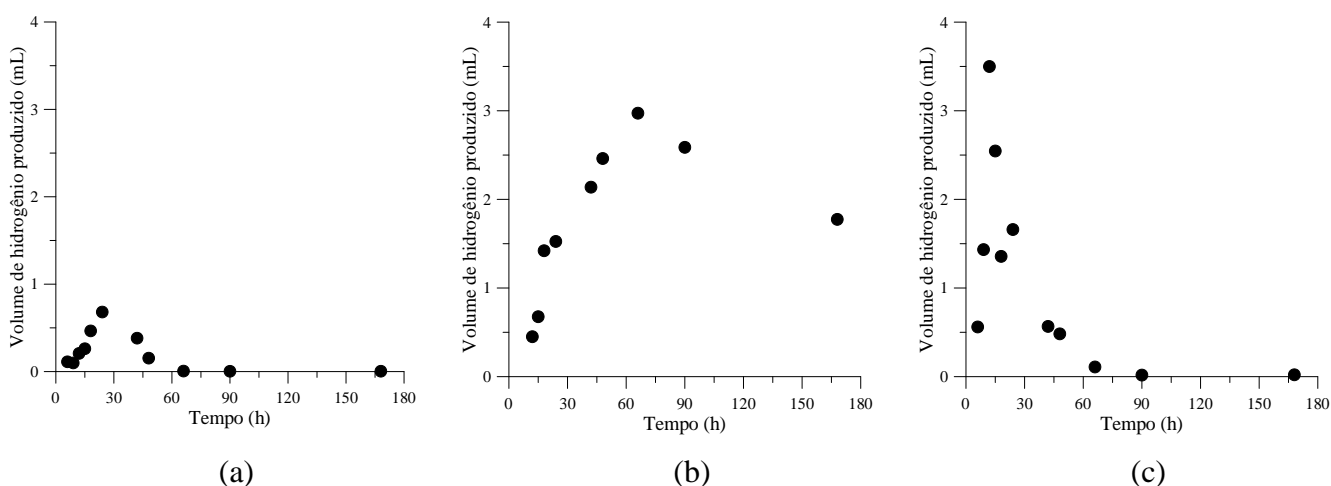
O máximo volume de hidrogênio produzido alcançou 3,5 mL, no ensaio realizado com aplicação do tratamento de 80 °C durante 30 min (Figura 3, c), obtido em 12 h de digestão anaeróbia. Após este tempo, houve uma redução drástica no volume de hidrogênio produzido e neste ensaio, a partir de 24 h de cultivo, iniciou-se a produção de metano, revelando a ineficiência deste tratamento para a eliminação dos micro-organismos metanogênicos. No ensaio com o tratamento de 105 °C durante 15 h (Figura 3, b) o volume máximo produzido de hidrogênio foi de 3 mL, em 66 h.

No ensaio controle (Figura 3, a), a produção de hidrogênio foi mínima, evidenciando a importância do tratamento térmico na inativação dos micro-organismos metanogênicos, representando 0,7 mL de hidrogênio em 24 h. Em outros trabalhos desenvolvidos em digestão anaeróbia de água residual de cultivo de microalga em dois estágios, para a produção de hidrogênio o volume deste gás foi superior (YAHNG et al., 2011). Segundo Yahng et al. (2011) que aplicou tratamento térmico de 95 °C durante 30 min, em 70 h de processo a presença de metano não foi identificada, acumulando volume de hidrogênio de 80 mL. Esta

diferença no volume de hidrogênio obtido pode estar relacionada ao inóculo, a fonte de carbono ser o glicerol residual e agitação, além do que durante a utilização do tratamento de 105 °C durante 15 h, pode ter ocasionado a inativação de algumas bactérias produtoras de hidrogênio, reduzindo a produção deste gás. Também pode estar relacionado com a produção de metabólitos secundários, como 1,3-propanodiol, o qual a produção de hidrogênio é desfavorecida.

Desta forma o volume máximo de hidrogênio produzido foi no ensaio com tratamento de 80 °C durante 30 min, porém este tratamento não foi eficiente para eliminação das bactérias metanogênicas. Devido a falta de agitação nos ensaios, o hidrogênio produzido pode ter permanecido solúvel no meio de cultivo, embora a temperatura utilizada favoreça as condições termodinâmicas do sistema (FERREIRA, 2014).

Figura 3 - Volume de hidrogênio produzido nos ensaios sem tratamento térmico (a), com tratamento térmico 105 °C durante 15 h (b) e 80 °C durante 30 min (c).



O fator de conversão de substrato em produto ficou abaixo do identificado na literatura utilizando glicerol, havendo máxima conversão no ensaio com tratamento de 80 °C durante 30 min em 24 h do processo, $0,344 \text{ mol H}_2 \text{ mol glicerol}^{-1}$. No final de 168 h a máxima conversão de glicerol em hidrogênio foi no ensaio com tratamento de 105 °C durante 15 h, alcançando $0,0815 \text{ mol H}_2 \text{ mol glicerol}^{-1}$. Ferreira (2014) obteve fator de conversão de glicerol residual em hidrogênio de $1,2 \text{ mol H}_2 \text{ mol glicerol}^{-1}$, aplicando tempo de retenção hidráulico de 14 h.

A conversão máxima de glicerol em hidrogênio pode ser alcançada quando existe a produção do intermediário, ácido acético, correspondendo a $3 \text{ mol}_{\text{H}_2} \text{ mol}_{\text{glicerol}}^{-1}$. Quando há a produção de ácido butírico o fator de conversão teórico alcança $2 \text{ mol}_{\text{H}_2} \text{ mol}_{\text{glicerol}}^{-1}$.

Os resultados encontrados no presente trabalho foram abaixo do rendimento teórico para este substrato, podendo existir a produção de algum metabólito secundário que causa influência negativa na produção de hidrogênio, como o 1,3-propanodiol, sendo este um produto com alto valor agregado. O 1,3-propanodiol é um produto que pode ser obtido a partir da digestão anaeróbia do glicerol, a principal estirpe de micro-organismos que pode produzir este produto é *Clostridium butyricum*, cepa que é favorecida com a utilização de pré-tratamento a $105 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 h (POSADA; RINCÓN; CARDONA, 2012).

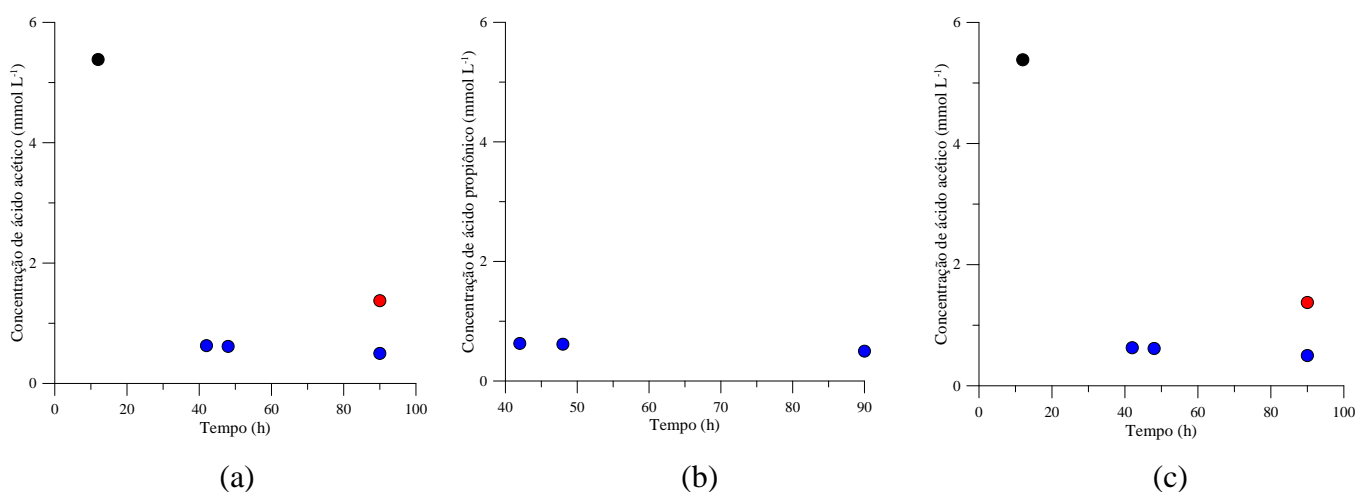
Tabela 4 - Fator de conversão de substrato em produto nos diferentes tratamentos aplicados.

Ensaio	Sem tratamento ($\text{mol}_{\text{H}_2} \text{ mol}_{\text{glicerol}}^{-1}$)	105 °C – 15 h ($\text{mol}_{\text{H}_2} \text{ mol}_{\text{glicerol}}^{-1}$)	80 °C – 30 min ($\text{mol}_{\text{H}_2} \text{ mol}_{\text{glicerol}}^{-1}$)
Tempo (h)			
24	0,0411	0,0033	0,3440
42	0,0143	0,0059	0,0355
48	0,0148	0,0093	0,0247
90	0,0016	0,0602	0,0010
168	0,0017	0,0815	0,0014

No ensaio com tratamento de $105 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 h identificou-se a presença de ácido acético e butírico, porém a concentração de ácido acético foi reduzida ao longo do processo, não sendo identificado após 42 h de cultivo. O ácido butírico foi identificado apenas em 12 h de processo. No ensaio sem tratamento térmico a concentração de ácido acético foi crescente ao longo da digestão anaeróbia, porém como não houve tratamento térmico a produção de hidrogênio não foi favorecida, podendo haver outros metabólitos que influenciam na produção de hidrogênio. Segundo ensaios realizados por De Sá et al. (2013) que utilizou cultura mista e glicerol em reatores em batelada os principais metabólitos secundários encontrados foram 1,3-propanodiol e ácidos acético e butírico, onde obtiveram a máxima produção de hidrogênio.

A presença de etanol na digestão anaeróbia favoreceu a produção de hidrogênio, conforme estudo realizado por Koskinen et al. (2007), que utilizou cultura mista e glicose como fonte carbono, estes ensaios foram realizados em condições termofílicas. Em outro estudo realizado por Koskinen et al. (2007), utilizando glicerol como fonte de carbono, em condições mesofílicas e cultura mista, houve a presença de predominante de 1,3-propanodiol e ácido acético.

Figura 4 - Concentração de ácidos acético (a), propiônico (b) e butírico (c) durante os ensaios sem tratamento (■), 105 °C durante 15 h (■) e 80 °C durante 30 min (■).



Outros metabólitos foram observados ao longo do processo, porém não foram quantificados. A produção de alguns metabólitos, como 1,3 – propanodiol, pode diminuir a produção de hidrogênio, podendo assim justificar a baixa conversão de glicerol em hidrogênio. Altas concentrações de ácido propiônico não são favoráveis para a produção de hidrogênio (WANG et al, 2006; KOSKINEN et al., 2007), podendo justificar a queda da conversão do glicerol em hidrogênio no ensaio com tratamento de 80 °C durante 30 min, além de haver a produção de metano a partir de 24 h.

Dentre os trabalhos citados, a concentração dos ácidos orgânicos voláteis obtidos no presente trabalho, foi inferior. Justificando-o devido a utilização de cultura mista, ocasionando diferentes rotas metabólicas simultaneamente na digestão anaeróbia do glicerol. Além de apresentar outros metabólitos os quais não foram quantificados neste trabalho. Podendo ser uma das causas para a baixa produção de hidrogênio e conversão de substrato em produto obtida neste trabalho.

4.2.4 Conclusões

Através dos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir que o tratamento térmico de 105 °C durante 15 h foi eficiente para a produção de hidrogênio, não apresentando a geração de metano ao longo das 168 h de processo. A concentração de hidrogênio máxima foi 0,345 mmol_{H₂} L⁻¹, a conversão de glicerol em hidrogênio foi de 0,0815 mol_{H₂} mol_{glicerol}⁻¹, neste ensaio os ácidos acético e butírico foram identificados apenas nas primeiras horas de processo, já o ácido propiônico não foi identificado. No ensaio com tratamento térmico de 80 °C durante 30 min a presença de metano foi identificada em 24 h de processo, desta forma este tratamento não foi eficiente para a inibição das bactérias metanogênicas. A máxima produção de hidrogênio ocorreu em 12 h na concentração de 0,261 mmol L⁻¹, a máxima conversão de glicerol em hidrogênio ocorreu em 24 h, 0,344 mol_{H₂} mol_{glicerol}⁻¹, neste ensaio foi identificado os ácidos acético, propiônico e butírico.

O ensaio controle (sem tratamento térmico) obteve presença de metano desde 9 h de ensaio, a produção de hidrogênio foi de 0,038 mmol L⁻¹ e fator de conversão máximo de 0,041 mol_{H₂} mol_{glicerol}⁻¹ em 24 h de processo. Neste ensaio foi identificado predominância de ácido acético durante todo o processo e ao final, houve a presença de ácido butírico.

Portanto, o tratamento térmico de 105 °C durante 15 h a produção de hidrogênio foi favorecida, porém houve baixa produção de hidrogênio que pode estar associado a este pré-tratamento ser muito agressivo aos micro-organismos e também por produzir outros metabólitos secundários que prejudicam a produção deste gás de interesse. Desta forma, necessita-se um conhecimento mais aprofundado a respeito das rotas metabólicas envolvidas neste processo, identificando os demais produtos que são produzidos a partir da digestão anaeróbia de glicerol.

4.2.5 Referências bibliográficas

BUNDHOO, M. A. Z.; MOHEE, R.; HASSAN, M. A. Effects of pre treatment Technologies on dark fermentative biohydrogen production: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 157, p. 20 – 48, 2015.

CERQUEIRA, M. B. R.; DIAS, A. N.; CALDAS, S. S.; SANTANA, F. B.; D'OCA, M. G. M.; PRIMEL, E. G. Validação de métodos para determinação de ácidos orgânicos

voláteis em efluentes de reatores anaeróbios empregado cromatografia líquido. **Química Nova**, n. 1, v. 34, p. 156 – 159, 2011.

COSTA, J. B. **Produção biotecnológica de hidrogênio, etanol e outros produtos a partir da reação de formação de biodiesel**. Dissertação mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.

DE SÁ, L. R. V.; CAMMAROTA, M. C.; OLIVEIRA, T. C.; OLIVEIRA, E. M. M.; MATOS, A.; FERREIRA-LEITÃO, V. S. Pentoses, hexoses and glycerin as substrates for biohydrogen production: Na approach for Brazilian biofuel integration. **Hydrogen Energy**, v. 38, p. 2986 – 2997, 2013.

DILLIS, S. S. APPERSON, A.; SCHMIDT, M. R.; SAIER, M. H. **Microbiology Rev.** v. 44, p. 385, 1980.

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

FERREIRA, J. **Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidizado a partir de glicerol bruto sob condições termofílicas**. Dissertação mestrado. Universidade Federal de São Carlos. 2014.

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

GOMES NETO, E. H. Hidrogênio, Evoluir sem poluir: a era do hidrogênio, das energias renováveis e das células a combustível. **Brasil H₂ Fuel Cell Energy**. Curitiba – PR, 2005.

KOSKINEN, P. E. P.; KASKSONEN, A. H.; PUHAKKA, J. A.; The relationship between instability of H₂ production and compositions of bacterial communities within a dark fermentation fluidized-bed reactor. **Biotechnology Bioenergy**, v. 97, p. 742 – 758, 2007.

LAMAISON, F. C. **Aplicação da água residuária do processamento da mandioca como substrato para a produção de hidrogênio por processo fermentativo**. Dissertação mestrado Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina, 2009.

PACHAPUR, V. L.; SARMA, S. J.; BRAR, S. K.; BIHAM, Y. B.; BUELMA G.; VERMA, M. Biohydrogen production by co-fermentation of crude glycerol and apple pomace hydroly sate using co-culture of *Enterobacter aerogenes* and *Clostridium butyricum*. **Bioresource Technology**, v. 193, p. 297-306, 2015.

POSADA, J. A.; RINCÓN, L. E.; CARDONA, C. A. Design and analysis of biorefineries based on raw glycerol: Addressing the glycerol problem. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 282 – 293, 2012.

SIQUEIRA, M. R.; REGINATTO, V. Inhibition of fermentative H₂ production by

hydrolysis byproducts of lignocellulosic substrates. **Renewable Energy**, v. 80, 109-116, 2015.

SANTOS, F. M. S. M.; SANTOS, F. A. C. M. O COMBUSTÍVEL “HIDROGÊNIO”. **Revista Millenium**, n. 31, p. 252-270, 2005.

SARMA, S. J.; BRAR, S. K.; BIHAN, Y. L.; BUELNA, G.; SOCCOL, C. R. Mitigation of the inhibitory effect of soap by magnesium salt treatment of crude glycerol – A novel approach for enhanced biohydrogen production from the biodiesel industry waste. **Bioresource Technology**, v. 151, p. 49 – 53, 2014.

SAWATDEENARUNAT, C.; NGUYED, D.; SURENDRA, K. C.; SHERESTHA, S.; RAJENDRAN, K.; OECHSNER, H.; XIE, L.; KHANAL, S. K. Anaerobic biorefinery: Current status, challenges, and opportunities. **Bioresource Technology**. v. 215, p. 304-313, 2016.

SILVA, G. P. D.; MACK, M.; CONTIEIRO, J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology Advances**. v. 9, p. 27-30, 2009.

SIRGH, L.; ZULARISAM, A. W. Methods for enhancing bio-hydrogen productions from biological process: A review. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**. V. 21, p. 70-80, 2015.

TANG, J.; YUAN, Y.; GUO, W-Q; REN, N-Q. Inhibitory effects of acetate and ethanol on biohydrogen production of *Ethanoligenens harbinense* B49. **International Journal of Hydrogen Energy**. v. 37, p. 741-747, 2012.

VALDEZ-VASQUEZ, I.; POGGI-VARALDO, H. M. Hydrogen production by fermentative consortia. **Renewable Sustainable Energy Review**, v. 13, p. 1000-1013, 2009.

WANG, L.; ZHOU, Q.; LI, F. T. Avoiding propionic acid accumulation in the anaerobic process for biohydrogen production. **Biomass Bioenergy**, v. 30, p. 177 – 182, 2006.

XIU, Z-L.; CHEN, X.; SUN, T-Q.; ZHANG, D-J. **Biochemical Engineering Journal**, v. 33, p. 42, 2007.

4.3 ARTIGO 3 – PRODUÇÃO DE ENERGIA A PARTIR DO GLICEROL RESIDUAL EM SISTEMA INTEGRADO: DIGESTÃO ANAERÓBIA E CÉLULA COMBUSTÍVEL MICROBIANA

Bracher, Eduarda Holz^a; Santana, Fabricio^b Hoffmann, Ronaldo^a

^aDepartamento Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, Santa Maria, Brasil. ^bEscola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande – UFRGS, Rio Grande, Brasil.

4.3.1 Resumo

A busca por fontes alternativas de energia vem desenvolvendo novas pesquisas que viabilizem os bioprocessos para a produção de energia. Com isso a utilização de resíduos industriais como fonte de nutrientes torna-se comum em estudos científicos, como por exemplo o glicerol, sub-produto altamente assimilável por micro-organismos. A associação de bioprocessos para o aproveitamento máximo de energia é um conceito atual que ainda possui poucos estudos. Bioprocessos como a digestão anaeróbia associada a célula combustível microbiana (MFC) traz um conceito inovador para a produção de energia. Visando a produção de hidrogênio, baixos tempos de retenção hidráulico são propostos pela literatura, desta forma havendo um resíduo com alta concentração de matéria orgânica. A partir do que foi exposto, o objetivo deste trabalho foi verificar a produção de energia através da associação da digestão anaeróbia e de uma célula combustível microbiana utilizando glicerol residual como fonte de carbono. Foi utilizado um reator UASB com volume útil de 1,75 L, utilizou-se como inóculo lodo anaeróbio oriundo de reator UASB de água de parboilização do arroz, os ensaios foram realizados com aplicação de tratamento térmico ao inóculo e sem aplicação de tratamento ao inóculo. O meio de cultivo utilizado foi Del Nery (1985) e glicerol foi adicionado como fonte de carbono, as relações C/N estudadas foi 40 e 120 e tempo de retenção hidráulico de 24 h. O pH na saída do reator UASB foi corrigido em 7 e foi utilizada como alimentação da MFC, os reatores foram alimentados de forma contínua. A partir dos resultados obtidos verificou-se que o tratamento ao inóculo se faz necessário, visto que foi identificado metano no biogás produzido e com isso baixa concentração de hidrogênio. O tratamento térmico afetou a

concentração de ácidos orgânicos voláteis, havendo uma redução na concentração quando aplicado o tratamento térmico. A relação C/N 120 apresentou maior densidade de potência, associando a condutividade elétrica ser superior aos demais ensaios. Na relação C/N 40 a produção de energia na MFC se manteve próxima em relação a aplicação de pré-tratamento. Portanto para melhorar a eficiência de processo se faz necessário aplicação de um pré-tratamento mais agressivo ao inóculo para favorecer as bactéria produtoras de hidrogênio, assim como melhorar a relação de DQO:P:N, ou diluir a alimentação no reator MFC, para melhorar a densidade de corrente e potência gerados no reator.

4.3.2 Introdução

Com a busca por novas fontes de energia, as quais possam incrementar as fontes já existentes, vem sendo desenvolvidos processos biológicos, como a digestão anaeróbia. Este bioprocessos vem sendo utilizado durante muitos anos, porém seu objetivo era estabilizar a matéria orgânica. Devido a limitada reserva que se tem de energia não renovável, principalmente o combustível fóssil, este bioprocessos é investigado para a valorização do biogás produzido e também o tratamento dos efluentes industriais.

A digestão anaeróbia é um processo importante no que diz respeito ao tratamento de efluentes, degradando a matéria orgânica para a produção de energia, neste caso o metano. Pesquisas para o desenvolvimento de um processo que favoreça a produção de hidrogênio a partir da digestão anaeróbia vem sendo investigadas, onde a aplicação de tratamento térmico ao inóculo torna-se uma alternativa atraente para o favorecimento deste gás (BUITRÓN; CARVAJAL, 2010; FERREIRA, 2015; FONSECA; GUAZZARONI; REGINATTO, 2016). Porém além do pré-tratamento outros fatores são importantes para haver a produção de hidrogênio através da digestão anaeróbia, como o tempo de retenção hidráulico (TRH), temperatura de processo e pH.

Na produção de hidrogênio utiliza-se tempo de retenção hidráulico (TRH) muito baixos, o que causa baixa remoção de demanda química de oxigênio (DQO) e com isso baixa eficiência no tratamento de resíduos (FERREIRA, 2014). Em vista disso, estudos associando a digestão anaeróbia a outro processo vêm sendo desenvolvidos, como as células combustíveis microbianas (MFC).

As células combustíveis microbianas são biorreatores eletroquímicos e consistem em utilizar matéria orgânica para a geração de eletricidade. Este processo ocorre devido a uma diferença de potencial (ddp) gerada entre o ânodo (compartimento com a presença de micro-organismos exoeletrogênicos) e cátodo (compartimento que é o receptor final dos elétrons), estes dois compartimentos são separados por uma membrana de permuta iônica e um circuito externo. A utilização de uma membrana catiônica permite que os prótons sejam movidos na direção do ânodo para o cátodo (LOGAN; REGAN, 2006).

As MFC são consideradas uma estratégia promissora para atender a demanda de energia, tornando-se ainda mais interessantes quando utilizado resíduos industriais. Existe um gama de substratos que podem ser utilizados por MFC, como glicose, sacarose, acetato, propionato, butirato, lactato, etanol, glicerol, bem como demais substâncias orgânicas oriundas de alimentos e águas residuais (ZUO et al., 2008; MIN et al., 2005).

Para um bom desempenho das MFC alguns fatores são importantes como a concentração de substrato, inóculo, resistência interna e externa no sistema, força iônica da solução, material utilizado como condutor e espaçamento entre os eletrodos (LOGAN et al., 2006). O controle do pH é um parâmetro crucial, pois em pH neutro ocorre o crescimento ótimo das bactérias e também a geração de eletricidade (ROZANDAL et al., 2006).

Devido a necessidade e redução de custos de processo o uso de resíduos industriais torna-se atrativo para a geração de energia, neste caso, devido a elevada produção de glicerol (sub-produto da produção de biodiesel), aliada a necessidade de tratamento deste resíduo, o uso como fonte de carbono torna-se atrativo. O glicerol é um composto orgânico e possui elementos nutricionais importantes para o crescimento de micro-organismos, como fósforo, enxofre, magnésio, cálcio, nitrogênio e sódio (XIU et al., 2007), sendo assim altamente assimilável por bactérias e leveduras (DILLIS et al., 1980).

A associação dos processos de digestão anaeróbia e células combustíveis microbianas é um conceito relativamente novo e na literatura existe poucos estudos aprofundados a respeito deste integração. Um primeiro estudo desenvolvido por Premier et al. (2013) verificou a eficiência de remoção de DQO, em outro momento Fradler et al. (2014) verificou de forma mais abrangente o desempenho deste sistema de integração. Trabalhos estão sendo desenvolvidos buscando esclarecer de forma mais aprofundada a associação destes dois sistemas, bem como a utilização de novas fontes de carbono (SCHIEVANO et al., 2016; KIM et al., 2015). Em vista do que foi exposto, o objetivo deste trabalho foi verificar a produção de

energia através da associação da digestão anaeróbia e célula combustível microbiana utilizando glicerol residual.

4.3.3 Material e Métodos

4.3.3.1 Digestão anaeróbia em reator UASB

Os ensaios foram realizados em reator UASB, construído de PVC de diâmetro 75 mm, com volume útil de 1,75 L e volume de headspace de 0,91 L, mantidos em estufa na temperatura 35 °C. Foram realizados ensaios com a relação C/N 40 e 120, determinadas pela estequiometria, sendo utilizada ureia como fonte de nitrogênio. O tempo de retenção hidráulico (TRH) foi de 24 h com alimentação contínua, servindo como fator de seleção dos micro-organismos produtores de hidrogênio. A carga orgânica da alimentação no reator na relação C/N 40 foi 7,98 g L⁻¹d⁻¹ e na relação C/N 120 foi 31,11 g L⁻¹d⁻¹.

O lodo anaeróbio foi obtido de um reator de fluxo ascendente com manta de lodo (UASB) para tratamento de água de parboilização de arroz (Rio Grande do Sul, Brasil), com características de sólidos totais de 19,70 g L⁻¹ e sólidos voláteis de 11,23 g L⁻¹. Foi realizado um pré-tratamento térmico ao inóculo de 80 °C durante 30 min e após resfriado em banho de gelo até temperatura ambiente, também foi realizado um ensaio sem o tratamento térmico. A concentração inicial de inóculo foi de 2 g L⁻¹ de sólidos voláteis (SV) e o restante preenchido com meio de cultivo.

O glicerol utilizado como fonte de carbono foi fornecido pela empresa BSBIOS (Rio Grande do Sul, Brasil), sua composição esta descrita na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição do glicerol residual.

Parâmetro	Resultado (%)
Umidade	12,15
Glicerol	82,69
Cinzas	3,26
Cloreto de sódio	3,61
pH	5,34
Teor de metanol	0,04

Fonte: BSBIOS

O glicerol foi adicionado ao meio de cultivo Del Nery, representando uma água residual e a composição do meio encontra-se na Tabela 2. Para a solubilização do glicerol ao meio de cultivo foi necessário o aquecimento do mesmo a 60 °C durante 20 min.

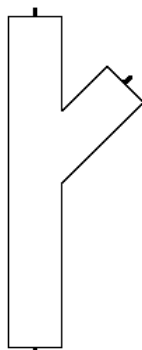
Tabela 2 - Composição do meio de cultivo utilizado no reator.

Composição	Concentração (mg L⁻¹)
Ureia	125,00
Fosfato de potássio monobásico	85,00
Fosfato de potássio dibásico	21,70
Fosfato de sódio dibásico	33,40
Cloreto de cálcio	47,00
Sulfato de níquel	1,00
Sulfato ferroso	5,00
Cloreto férrico	0,50
Cloreto de cobalto	0,08

Fonte: Del Nery, 1987.

Foi injetado gás argônio para eliminar o oxigênio dissolvido no meio e o pH da alimentação foi ajustado diariamente para próximo de 7. A Figura 1 ilustra a configuração do reator UASB utilizado nestes ensaios.

Figura 1 - Reator UASB utilizado no trabalho.



4.3.3.2 Célula combustível microbiana (MFC)

A célula combustível microbiana foi construída de acrílico, mantida em estufa na temperatura de 35 °C, a célula combustível foi dividida em dois compartimentos, catódico e anódico. Uma tela de aço inox (304, 32 mesh, fio 0,25mm - TEGAPE) foi utilizada como coletor de corrente elétrica, localizada no interior do ânodo e do cátodo. Os compartimentos foram separados por uma membrana catiônica (CMI-7000S - Membranas International Inc.). Esta tela envolvia a membrana internamente e externamente e também foi utilizada como distribuidor do fluxo, localizada na base do compartimento do ânodo.

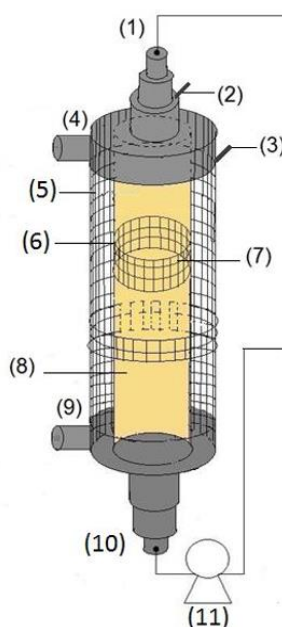
A diferença de potencial (ddp) foi monitorada a partir de um microcontrolador Arduino, responsável pela aquisição e registro dos dados a cada 2 min. Para fechar este circuito foi utilizada uma resistência externa, a qual era reduzida quando havia estabilidade de ddp.

O compartimento catódico (Figura 2, 3) é o receptor final dos elétrons, foi utilizado ferricianeto de potássio 50 mM, o qual foi trocado a cada dois dias. O compartimento anódico (Figura 2, 2) possui área de 54,86 cm², foi preenchido com 388,73 g de grafite, 246 mL de inóculo e meio de cultivo para inoculação, descrito na Tabela 3, correspondendo a uma fração volumétrica de 0,6. O inóculo foi recolhido no canal de acesso do Porto de Rio Grande – RS, o qual é um sedimento que possui capacidade exoeletrogênica.

Tabela 3 - Meio de cultivo para inoculação da MFC.

Reagente	Concentração (g L ⁻¹)
NaHCO ₃	2,5
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,1
KCl	0,1
NH ₄ Cl	1,5
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0,6
Na ₂ HPO ₄ .12 H ₂ O	1,87
NaCl	0,1
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,1
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,005
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,001
C ₂ H ₃ NaO ₂	5
Extrato de levedura	0,05

Figura 2 - Ilustração da célula combustível microbiana (MFC).

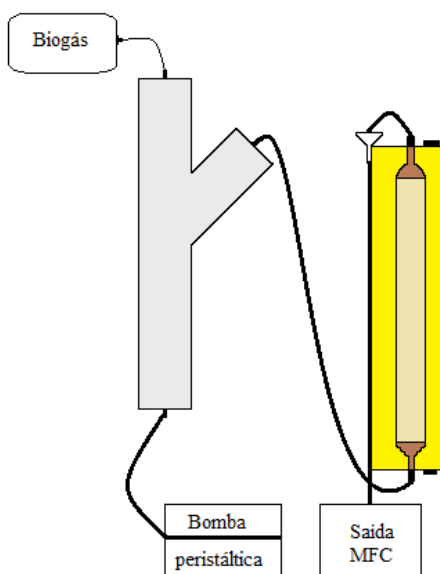


Onde: 1 = Saída do líquido fluidizante (meio de cultivo), 2 = Terminal anódico, 3 = Terminal catódico, 4 = Entrada fluido aceptor de elétrons, 5 = Tela de aço inoxidável externa a membrana, 6 = Membrana, 7 = Tela de aço inoxidável interna a membrana, 8 = eletrodo de grafite no interior do cilindro interno (ânodo), 9 = Saída do fluido aceptor de elétrons, 10 = Entrada do líquido fluidizante (fluxo ascendente) e 11 = Bomba peristáltica.

Após inoculado o reator MFC, o mesmo era alimentado com o efluente de saída do reator UASB com uma vazão de aproximadamente $1,7 \text{ L d}^{-1}$.

A Figura 3 mostra uma visão geral de como foram realizados estes ensaios com associação dos reatores UASB e MFC.

Figura 3 - Visão geral da associação do reator UASB e MFC para realização dos ensaios.



4.3.3.3 Respostas avaliadas

4.3.3.3.1 Produção de biogás no reator UASB

Nos ensaios foi avaliado a produção de hidrogênio, utilizando cromatógrafo gasoso (SHIMADZU, GC-2014), com detector de condutividade térmica (TCD), coluna Carboxen 1000 (Supelco), a temperatura do injetor e detector foi $280 \text{ }^\circ\text{C}$, e o gás de arraste utilizado foi argônio, com vazão de 30 mL min^{-1} . A rampa de aquecimento da coluna foi inicialmente na temperatura de $100 \text{ }^\circ\text{C}$ até $240 \text{ }^\circ\text{C}$ a uma taxa de $30 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ e o volume de amostra coletado foi $400 \text{ }\mu\text{L}$. A amostra foi coletada diretamente no reator e imediatamente analisada. A pressão foi obtida a partir da utilização de manômetro em tubo em U, utilizando água destilada, o qual foi verificada 3 vezes na semana. O volume de biogás produzido foi determinado segundo a equação dos gases ideais e corrigido segundo CNTP, Equação 1:

$$P \times V = n \times R \times T \quad (1)$$

4.3.3.3.2 Produção de ácidos orgânicos voláteis nos reatores UASB e MFC

Os ácidos orgânicos voláteis (AOV) foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (SHIMADZU), segundo metodologia descrita por Cerqueira et al., (2010). Foram analisadas amostras da saída dos reatores UASB e MFC.

4.3.3.3.3 Remoção de matéria orgânica e pH nos reatores UASB e MFC

A demanda química de oxigênio (DQO) e pH (TEKNA, T -1000) foram determinados segundo metodologia APHA (2005). As leituras das absorvâncias foram feitas em espectrofotômetro (SP-22) a 600 nm. Foi preparada uma curva padrão utilizando biftalato de potássio. A amostra foi coletada da alimentação, saída reator UASB e saída reator MFC.

A remoção de DQO foi determinado segundo a Equação 2, onde C_i é a concentração inicial e C_f é a concentração final.

$$\% \text{ Remoção}_{cumulativa} = \frac{C_i - C_f}{C_i} \times 100 \quad (2)$$

4.3.3.3.4 Condutividade elétrica nos reatores UASB e MFC

A condutividade foi monitorada 3 vezes na semana, utilizando condutivímetro (HANNA, EC – 125). Foi verificada a condutividade nas amostras da alimentação, reator UASB e MFC.

4.3.3.3.5 Densidade de corrente e potência elétrica no reator MFC

Foi determinada a densidade de corrente e potência através da coleta de dados de diferença de potencial (ddp) utilizando o microcontrolador Arduino. A área do ânodo ($A_{\text{ânodo}}$) foi 54,86 cm² e as Equações 3 e 4 foram utilizadas para determinação da corrente (I , mA m⁻²) e potência (P , mW m⁻²) elétrica produzida na célula combustível microbiana, respectivamente.

Sendo R_{externa} a resistência externa utilizada (Ω) e $V_{\text{célula}}$ é a tensão elétrica produzida na célula (V). A resistência externa variou de 1000 Ω a 55 Ω .

$$I = \frac{V_{\text{célula}}}{R_{\text{externa}} \times A_{\text{ânodo}}} \quad (3)$$

$$P = V_{\text{célula}} \times I \quad (4)$$

Foi também determinada a Eficiência Coulomb (EC) este parâmetro é utilizado para avaliar o desempenho de uma MFC, pois ela expressa a fração de carga transferida para o circuito em função da quantidade total de carga disponível para o doador de elétrons. Na operação de um reator em batelada, a EC pode ser calculada através da Equação 5 (LOGAN, 2008).

$$EC = \frac{I \times M \times t}{b \times V_{\text{ânodo}} \times F \times \Delta DQO} \quad (5)$$

Sendo I a máxima densidade de corrente ($A \text{ m}^{-2}$), M a massa molar do O_2 ($g \text{ mol}^{-1}$), t o tempo de duração da operação em batelada (s), b a quantidade total de elétrons que pode ser oxidada, $V_{\text{ânodo}}$ o volume de solução no compartimento anódico (m^3), F a constante de Faraday e ΔDQO ($g \text{ L}^{-1}$) é a DQO de entrada menos a DQO de saída (após 24h).

4.3.3.3.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia das partículas de grafite que compôs o eletrodo anódico, foram verificadas no início e fim do processo experimental, através da análise de microscopia eletrônica de varredura, utilizando um microscópio eletrônico (JEOL, JSM 6060, JAPÃO). As amostras foram metalizadas com ouro e foram utilizadas acelerações de voltagem de 5 e 10 kV e faixa de magnificação variando de 30 a 10.000 vezes.

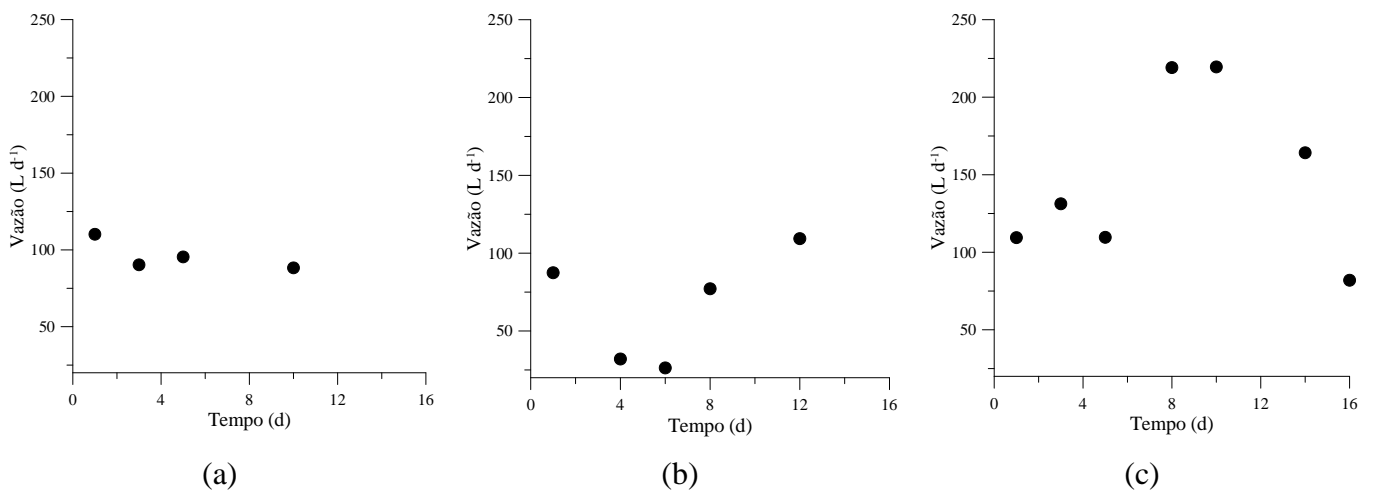
4.3.4 Resultados e discussão

4.3.4.1 Produção de biogás no reator UASB

A máxima produção de biogás foi obtida no experimento sem aplicação de tratamento térmico ao inóculo, alcançando uma vazão de aproximadamente 220 L d⁻¹, com 8 d. Após este período a produção de biogás reduziu, finalizando em 16 d a vazão de biogás de aproximadamente 80 L d⁻¹ (Figura 4, c). Nos ensaios com tratamento térmico ao inóculo a produção de biogás foi menor (Figura 4). Verificando que o tratamento térmico de 80 °C durante 30 min causou redução da presença de micro-organismos ao inóculo, já que em ambos os ensaios que o tratamento térmico foi aplicado o volume de biogás foi reduzido. No ensaio com relação C/N 40 o volume de biogás estabilizou-se em 10 d de acompanhamento.

Na relação C/N 120 inicialmente houve uma redução da produção de biogás, o que pode ter sido ocasionado devido a alta concentração de matéria orgânica, causando um choque ao inóculo. Após, a produção de biogás aumentou alcançando aproximadamente 100 L d⁻¹. Esta redução inicial está associada ao fato de o inóculo, inicialmente, ter sido alimentado na relação C/N 40 e, após 10 d de acompanhamento, sido foi alterada para a relação C/N 120.

Figura 4 – Produção de biogás no reator UASB na relação C/N 40 com tratamento térmico (a), relação C/N 120 com tratamento térmico (b) e relação C/N 40 sem tratamento térmico (c).



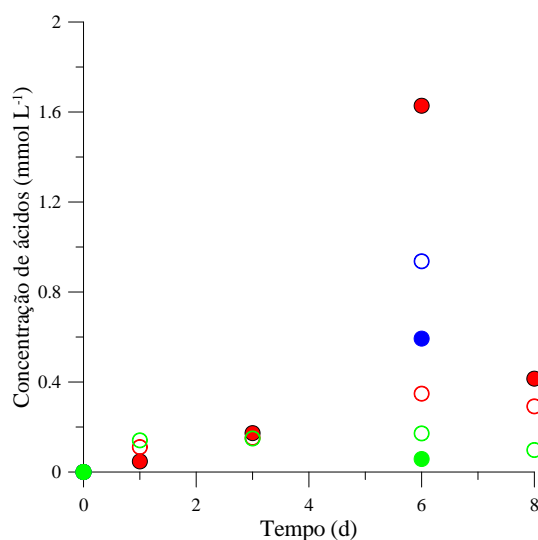
Em todos os ensaios houve a produção de metano ao longo do processo. Apenas no ensaio com a relação C/N 40, sem tratamento térmico, foi quantificada a produção de hidrogênio. Nos demais ensaios não foi possível devido a problemas ocorridos para configuração do equipamento. Apresentando neste ensaio máxima concentração de hidrogênio de $1,17 \text{ mmol L}^{-1}$, ocorrendo após uma redução drástica na concentração de hidrogênio ($0,07 \text{ mmol L}^{-1}$), Também pode ter ocorrido perdas de hidrogênio, devido a vazamentos. Em ensaios realizados com cultura pura, a concentração de hidrogênio produzida, utilizando 10 g L^{-1} de glicerol e 10 g L^{-1} de bagaço de maçã, alcançou $20,71 \text{ mmol L}^{-1}$ (PACHAPUR et al., 2015).

Em estudos para o favorecimento da produção de hidrogênio o volume de biogás produzido é reduzido em relação quando busca-se a produção de metano. Para Fernández et al. (2015) o uso de um único estágio para a produção de hidrogênio apresentou maior produção de biogás, cerca de 60 L d^{-1} , em sistemas de dois estágios e utilizando um reator acidogênico, a produção de biogás reduziu-se, alcançando 3 L d^{-1} e, quando utilizou-se os dois estágios e reator metanogênico, a produção de biogás máximo foi de 40 L d^{-1} . Já nestes ensaios foi identificado durante todo processo a produção de metano, havendo apenas um pico de produção de hidrogênio no ensaio sem tratamento térmico na relação C/N 40. Este fato pode estar associado a instabilidade do processo, também quanto a possíveis vazamentos do sistema.

4.3.4.2 Produção de ácidos orgânicos voláteis nos reatores UASB e MFC

No ensaio na relação C/N 40 com tratamento térmico ao inóculo (Figura 5) a concentração de ácido acético é visível durante todo processo, havendo uma redução na concentração deste metabólito na MFC. Desta forma este ácido foi utilizado para geração de energia. O ácido propiônico e butirico foram quantificados apenas no 6º dia no reator UASB, já na MFC a presença destes ácidos foi verificada ao longo do processo, sendo produzido nesta etapa.

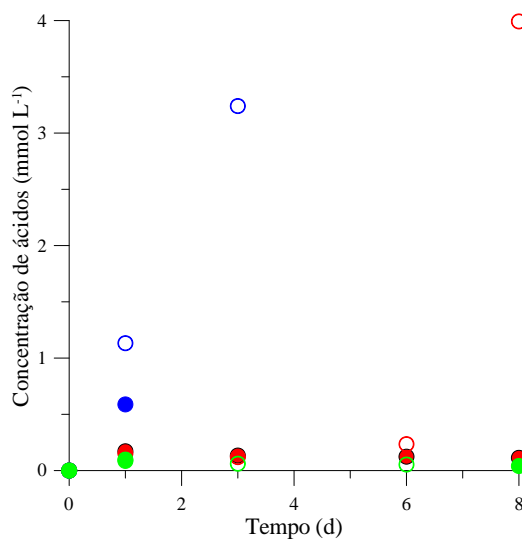
Figura 5 – Concentração de ácido acético (●, ○), propiônico (●, ○) e butírico (●, ○) nos ensaios em reator UASB (●) e MFC (○) na relação C/N 40 com tratamento térmico.



Na Figura 6 o ácido acético foi encontrado em todos os pontos analisado do reator UASB, porém em baixa concentração. Na MFC a concentração deste ácido foi superior ao reator UASB, verificando que houve a formação deste ácido ou a acumulação dele na MFC. O ácido propiônico no reator UASB foi quantificado no 1º e no 8º dia de ensaio, nos demais dias este metabólito foi quantificado na MFC.

O ácido butírico foi quantificado apenas no 1º dia no reator UASB, como no estudo anterior a concentração deste ácido foi superior na MFC do que no reator UASB, evidenciando que existe um acúmulo deste componente na MFC. Também pode-se atribuir este incremento devido a alimentação ser contínua de ambos os reatores, assim os micro-organismos presentes no reator UASB pode estar presente também na MFC.

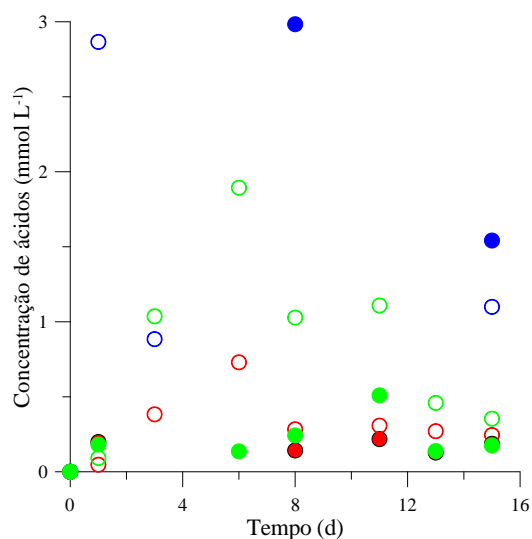
Figura 6 - Concentração de ácido acético (●, ○), propiônico (●, ○) e butírico (●, ○) nos ensaios em reator UASB (●) e MFC (○) na relação C/N 120 com tratamento térmico.



No ensaio que não foi aplicado o tratamento térmico ao inóculo houve a presença de maior concentração dos ácidos orgânicos analisados. O ácido propiônico foi quantificado durante todo o processo em ambos reatores, porém a concentração deste metabólito foi superior na MFC, alcançando aproximadamente 2 mmol L⁻¹. O ácido butírico apresentou redução da concentração na MFC em comparação ao reator UASB. Havendo o consumo deste nutriente pelas bactérias para a produção de energia.

A concentração de ácido acético foi baixa em ambos os reatores, porém na MFC não houve remoção deste nutriente para a geração de energia, assim havendo a produção de este metabólito ou então o acúmulo do mesmo na MFC.

Figura 7 - Concentração de ácido acético (●, ○), propiônico (●, ○) e butírico (●, ○) nos ensaios em reator UASB (●) e MFC (○) na relação C/N 40 sem tratamento térmico.



Segundo Reugsang et al. (2013), os principais metabólitos encontrados em reator UASB utilizando como inóculo *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 e glicerol bruto, foram 1,3-propanodiol, ácido láctico, fórmico, propiônico e butírico. Vale ressaltar que foram obtidos mais compostos nas análises dos ácidos orgânicos voláteis, porém apenas quantificado os principais (ácido acético, propiônico e butírico), os quais seriam de maior relevância para determinar o ciclo metabólico para a produção de hidrogênio (FERREIRA, 2014). A presença de altas concentrações de ácido propiônico causa uma redução na produção de hidrogênio (WANG et al, 2006; KOSKINEN et al., 2007) e, devido a presença deste ácido durante todo processo, a produção de hidrogênio pode ter sido desfavorecida, além de não haver o tratamento para inibição dos micro-organismos metanogênicos.

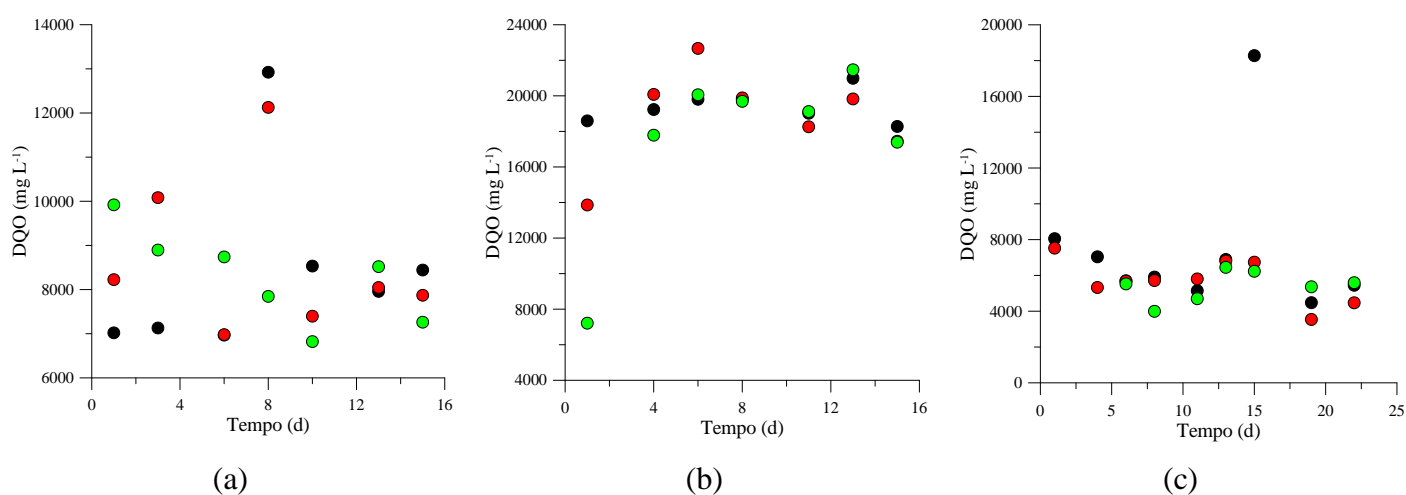
Esperava-se que ocorresse a redução destes ácidos no reator MFC, devido sua degradação pelas bactérias exoeletrogênicas, favorecendo, assim, a produção de eletricidade. Este comportamento pode ser identificado apenas no ensaio com relação C/N 40, com tratamento térmico, porém não favoreceu a produção de energia, como pode ser visto mais adiante na Figura 10. Além do que a produção de energia pode estar associado ao consumo do glicerol residual do reator UASB.

4.3.4.3 Remoção de matéria orgânica e pH nos reatores UASB e MFC

A remoção de matéria orgânica não se manteve estável ao longo dos ensaios, sugerindo maior tempo de acompanhamento do reator UASB. Em alguns pontos, a DQO dos reatores, UASB e MFC, foi superior à alimentação, isto se deu devido a presença de ácidos orgânicos voláteis. No ensaio com relação C/N 40 com tratamento térmico (Figura 8, a) ocorreu maior variação de DQO ao longo do ensaio, nas demais condições a variação da DQO foi menor. A eficiência de remoção de DQO do reator UASB, no ensaio na relação C/N 40, com tratamento térmico, foi de aproximadamente 6 %, já do reator MFC a eficiência ficou próxima de 7 % nos pontos finais de acompanhamento, porém inicialmente ocorreu variação na remoção de DQO entre 11 % e 35 %.

A relação C/N 120 no reator UASB também houve remoção próxima de 5%, e na MFC a remoção ficou próxima de 11 %, reduzindo este percentual ao longo do processo. Para reatores acidogênicos, a remoção de DQO é baixa, devido a remoção de micro-organismos metanogênicos e também ao tempo de retenção hidráulico utilizado, geralmente próximos de 24 h, ou até mesmo inferior a este (FERREIRA, 2014).

Figura 8 – Concentração de DQO na relação C/N 40 com tratamento térmico (a), relação C/N 120 com tratamento térmico e relação C/N 40 sem tratamento térmico, na alimentação (●), UASB (●) e MFC (●).



No ensaio com relação C/N 40 e sem tratamento térmico a remoção da DQO inicialmente variou entre 1 % e 3 %, porém nos últimos dias de acompanhamento, a remoção ficou próxima de 20 %. Na MFC, a remoção de DQO variou bastante, entre 2 % e 30 %, nos últimos dias de acompanhamento houve um aumento da DQO, o que pode estar associado a produção de metabólitos secundários, visto que a DQO também quantifica estes produtos.

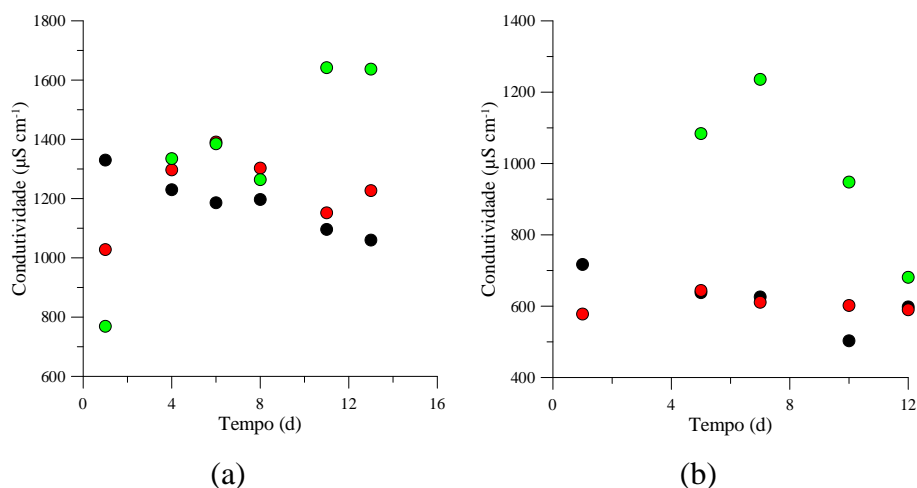
Segundo Kim et al. (2015) verificou-se que em uma associação do reator UASB e MFC para a remoção de nitrogênio e DQO, com o MFC obteve-se remoção da DQO de 61 %, sem realizar a diluição do efluente, e no reator UASB a remoção de DQO foi de 80 %, não havendo tratamento térmico ao inóculo.

Ferreira (2014) relatou que em reatores acidogênicos a remoção de DQO é reduzida. Em estudo para a produção de hidrogênio, utilizando glicerol como substrato para reator UASB, a remoção da DQO foi de 15 %, aplicou-se o tempo de retenção hidráulico de 14 h (FERREIRA, 2014). Também foi relatado por Manssouri que a máxima remoção de DQO foi de 18 %, a fonte de carbono deste trabalho foi a sacarose em reator AnSBBR, relatou também que com o aumento da relação C/N a remoção de DQO é afetada negativamente. Estes resultados são superiores aos obtidos neste trabalho, podendo estar associado a instabilidade do processo, necessitando maior tempo de acompanhamento para que estes parâmetros sejam estabilizados.

4.3.4.4 Condutividade elétrica nos reatores UASB e MFC

A condutividade na célula combustível microbiana foi superior à condutividade obtida na alimentação e no reator UASB. Segundo Penteado (2016), a condutividade é um fator importante para o desempenho de MFC, relatando que altos valores de condutividade auxiliam na redução da resistência interna do sistema, favorecendo a transferência de carga e geração de energia. Em um estudo que verificou a influência dos valores de condutividade, variando de $800 \mu\text{S cm}^{-1}$ para $10000 \mu\text{S cm}^{-1}$, e adição de tampão fosfato (100mM), obteve um acréscimo de 245 % na densidade de potência (HUANG e LOGAN, 2008), constatando a importância deste parâmetro para o bom desempenho de células combustíveis microbianas.

Figura 9 – Acompanhamento da condutividade nos ensaios na relação C/N 120 com tratamento térmico (a) e relação C/N 40 sem tratamento térmico (b), na alimentação (●), no reator UASB (●) e MFC (●).



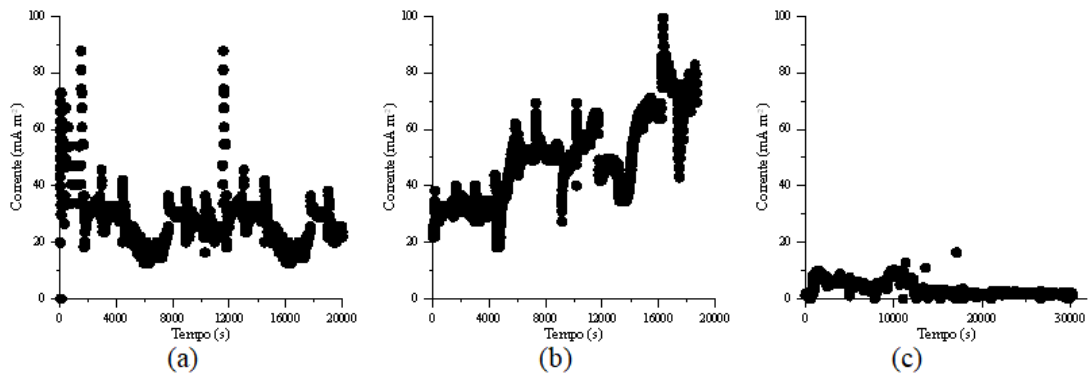
A condutividade no ensaio com relação C/N 120 obteve valor superior ao encontrado na relação C/N 40, podendo explicar a maior densidade de potência obtida naquele ensaio. A condutividade elétrica representa a presença de íons no meio líquido e a temperatura do sistema é um fator que influencia a condutividade. Também uma água residual que possui uma relação entre DQO:N:P de 700:10:1, possui um elevado potencial para gerar energia elétrica direta em uma MFC (PENTEADO, 2016). Desta forma, para melhorar o desempenho da MFC, seria necessário a suplementação do meio de cultivo, a fim de aumentar a condutividade e diminuir a resistência Ôhmica e a resistência à transferência de massa (RODRIGO et al., 2009).

4.3.4.5 Densidade de corrente e potência elétrica no reator MFC

A densidade de corrente nos ensaios com a relação C/N 40 foi próximo (Figura 10, a, c), mantendo-se estável ao final do tempo analisado, representando aproximadamente 25 mA m⁻². Com a utilização de maior concentração de carbono, relação C/N 120 (Figura 10, b), a densidade de corrente aumenta, mantendo-se próximo de 75 mA m⁻². Este mesmo perfil é verificado para a densidade de potência, obtendo nos ensaios com relação C/N 40 cerca de 4 mW m⁻², na relação C/N 120 a densidade de potência obtido foi próximo de 20 mW m⁻².

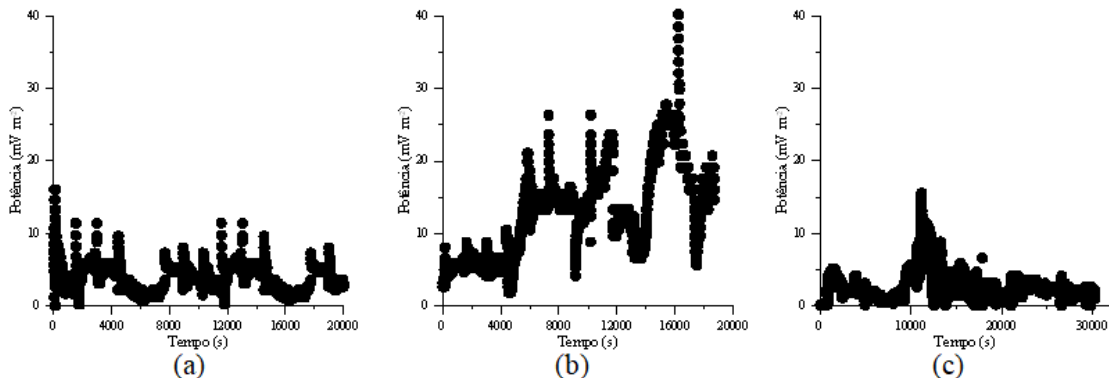
Os valores obtidos nestes ensaios ressaltam a importância da condutividade para o bom desenvolvimento de células combustíveis microbianas, visto que nos ensaios em que a condutividade elétrica foi baixa a densidade de energia produzida também foi inferior.

Figura 10 - Densidade de corrente elétrica produzida na célula combustível microbiana na relação C/N 40 com tratamento térmico (a), relação C/N 120 com tratamento térmico (b) e relação C/N 40 sem tratamento térmico (c).



Estudo realizado por Schievano et al. (2016), relataram que a diluição da alimentação do reator MFC ocasiona densidades de corrente mais estáveis, alcançando 1167 mA m^{-2} e, quando realizado a alimentação sem diluição a corrente elétrica produzida foi instável e com baixa produção. Desta forma, para melhorar o desempenho da MFC, seria conveniente a diluição da alimentação da MFC, aumentando a densidade de energia produzida.

Figura 11 – Densidade de potência elétrica produzida na célula combustível microbiana na relação C/N 40 com tratamento térmico (a), relação C/N 120 com tratamento térmico (b) e relação C/N 40 sem tratamento térmico (c).



Min e Logan (2004) utilizando MFC alimentada com água residual de suinocultura que corresponde a uma DQO de 8320 mg L^{-1} , obtiveram densidade de potência de 45 mW m^{-2} . Outro estudo, utilizando MFC e esgoto sanitário, obteve-se a densidade de potência de 2 mW m^{-2} , com resistência externa de 50Ω (MARCON, 2011). Densidade de potência superiores também são obtidas, como por exemplo utilizando água residual da produção de vinho, obtendo cerca de 465 mW m^{-2} e eficiência Coulombica (EC) de 14,7% (PENTEADO, 2016).

A eficiência Coulombica foi de 3,12 %, no ensaio na relação C/N 120. Este parâmetro refere-se a energia convertida do substrato para produção de energia elétrica direta. Valores obtidos por Penteado (2016), em período inicial dos ensaios, a eficiência Coulombica foi de 0,004 %, valor este ainda inferior ao obtido no presente trabalho. A baixa EC obtida neste trabalho pode estar associado com a utilização dos nutrientes por outros micro-organismos presentes no inóculo, como por exemplo, os metanogênicos.

Tabela 4 – Valores máximos de remoção de DQO e eficiência Coulombica (EC) nos ensaios na relação C/N 40 sem tratamento térmico e com tratamento térmico, relação C/N 120 com tratamento térmico na célula combustível microbiana.

Ensaio	Remoção DQO_{cumulativa} (%)	Eficiência Coulomb (%)
Relação C/N 40 sem tratamento térmico	6,32	3,07
Relação C/N 40 com tratamento térmico	9,10	2,73
Relação C/N 120 com tratamento térmico	11,46	3,12

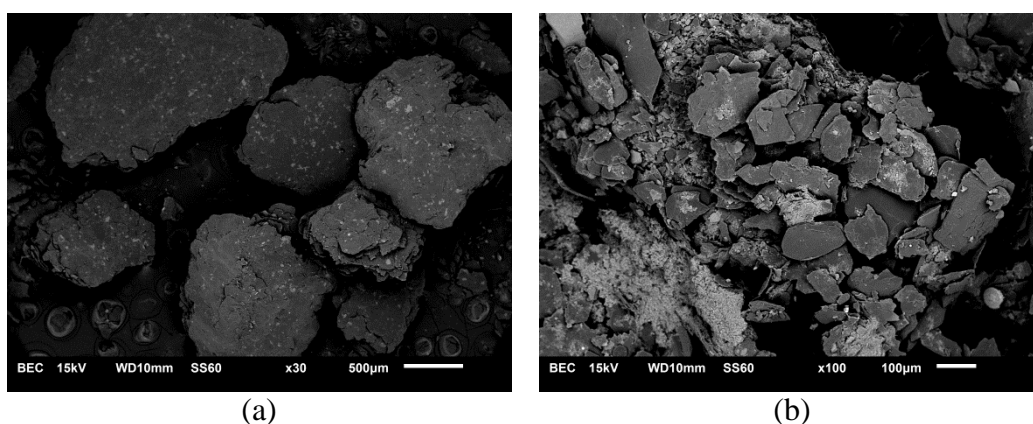
Estudo utilizando glicerol como fonte de carbono, em reator para produção de hidrogênio e MFC, apresentou eficiência Coulombica de 23 %, e segundo o autor, o valor de EC foi baixo, associando a redução com a perda de elétrons para a realização de outras atividades, além da geração de eletricidade (NIMJE et al., 2011). A máxima eficiência Coulombica que MFC podem obter para culturas puras é de 40 %, sendo este o valor típico de consumo catabólico da matéria orgânica (RODRIGO et al., 2009).

A Figura 12 mostra a análise de microscopia eletrônica de varredura realizada no início dos ensaios (apenas grafite, Figura 12, a) e ao final dos ensaios (Figura 12, b). Estas

imagens foram realizadas com o BEC, onde as regiões mais claras apresentam maior massa molecular, evidenciando a existência de micro-organismos, comparando-se as duas imagens.

Nas imagens obtidas não foi possível identificar claramente os micro-organismos aderidos ao grafite, a dificuldade encontrada pode estar relacionada com o preparo da amostra, necessitando de um tratamento mais complexo para melhor visualização dos micro-organismos.

Figura 12 - Análise de microscopia eletrônica de varredura no início (a) e ao final (b) dos ensaios realizados com a célula combustível microbiana (MFC).



4.3.5 Conclusões

A produção de hidrogênio não foi favorecida com a utilização de tempo de retenção de 24 h, necessitando mais estudos para favorecer a produção deste biogás. Em todos os ensaios foi detectado outros produtos intermediários, além dos ácidos acético, propiônico e butírico, houve também um incremento da concentração de ácidos na MFC. A remoção de matéria orgânica foi instável ao longo dos ensaios, variando entre 3 % a 20 % no reator UASB e na MFC a remoção de DQO variou entre 11 % a 35 %. A condutividade elétrica foi superior no ensaio com relação C/N 120, fator importante para a produção de energia, verificando que a máxima densidade de potência obtida foi neste ensaio. A máxima densidade de corrente foi de 75 mA m⁻² e densidade de potência de 20 mW m⁻², nos ensaios com relação C/N 120. Portanto, para melhorar o desempenho do processo seria necessário melhorar as condições de processo, como inibir os micro-organismo metanogênicos no reator UASB e também melhorar a relação DQO:P:N e/ou diluir o efluente para alimentação da MFC, otimizando a geração de energia.

4.3.6 Referências bibliográficas

BUITRÓN, G.; CARVAJAL, C. Biohydrogen production from tequila vinasses in an anaerobic sequencing batch reactor: Effect of initial substrate concentration, temperature and hydraulic retention time. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 9071 – 9077, 2010.

CERQUEIRA, M. B. R.; DIAS, A. N.; CALDAS, S. S.; SANTANA, F. B.; D'OCA, M. G. M.; PRIMEL, E. G. Validação de métodos para determinação de ácidos orgânicos voláteis em efluentes de reatores anaeróbios empregado cromatografia líquido. **Química Nova**, n. 1, v. 34, p. 156 – 159, 2011.

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

DILLIS, S. S. APPERSON, A.; SCHMIDT, M. R.; SAIER, M. H. **Microbiology Rev.** v. 44, p. 385, 1980.

FERNÁNDEZ, C.; CUETOS, M. J.; MARTÍNEZ, E. J.; GÓMEZ, X. Thermophilic anaerobic digestion of cheese whey: Coupling H₂ and CH₄ production. **Biomass and Bioenergy**, v. 81, p. 55 – 62, 2015.

FERREIRA, J. **Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leite fluidizado a partir de glicerol bruto sob condições termofílicas**. Dissertação mestrado. Universidade Federal de São Carlos. 2014.

FONSECA, B. C.; GUAZZARONI, M-E.; REGINATTO, V. Fermentative production of H₂ from different concentration of galactose by the new isolate *Clostridium beijerinckii* Br 21. **Internation Journal of Hydrogen Energy**, Ed. 46, v. 41, p. 21109 – 21120, 2016.

FRADLER, K. R.; LIM, J. R.; SHIPLEY, G.; MASSANET-NICOLAU, J.; DINSDALE, R. M.; GUWY, A. J.; PREMIER, G. C. Operation of a bioelectrochemical system as a bioelectrochemical system as a polishing stage for the effluente from a two-stage biohydrogen and biomethane production process. **Biochemical Engineering Journal**, v. 85, p. 125 – 131, 2014.

HUANG, L.; LOGAN, B. E. Electricity generation and treatment of paper recycling wastewater using a microbial fuel cell. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 80, p. 349 – 355, 2008.

KIM, T.; AN, J.; JANG, J. K.; CHANG, I. S. Coupling of anaerobic digester and microbial fuel cell for COD removal and ammonia recovery. **Bioresource Technology**, v. 195, p. 217 – 222, 2015.

KOSKINEN, P. E. P.; KASKSONEN, A. H.; PUHAKKA, J. A.; The relationship between instability of H₂ production and compositions of bacterial communities within a dark fermentation fluidized-bed reactor. **Biotechnology Bioenergy**, v. 97, p. 742 – 758, 2007.

LOGAN, B. E. **Microbial fuel cells, Wiley-Interscience Microbial fuel cells**. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New York, 2008.

MANSSOURI, M. E. **Influência da carga orgânica na produção de biohidrogênio em Asbbr com agitação tratando água residuária sintética**. Dissertação de mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento. Universidade de São Paulo. 2012.

MARCON, L. R. C. **Potencialidade da célula combustível microbiana para geração de energia elétrica a partir de esgoto sanitário**. Dissertação mestrado. Universidade de São Paulo, 2011

MIN, B.; KIM, J. R.; OH, S. E.; REGAN, J. M.; LOGAN, B. E. Electricity generation from swine wastewater using microbial fuel cells. **Water Resources**, v. 39, p. 4961 – 4968, 2005.

NIMJE, V. R.; CHEN, C-Y.; CHEN, C-C.; CHEN, H-R.; TSENG, M-J.; JEAN, J-S.; CHANG, Y-F. Glycerol degradation in single-chamber microbial fuel cells. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 2629 – 2634, 2011.

PACHAPUR, V. L.; SARMA, S. J.; BRAR, S. K.; BIHAM, Y. B.; BUELMA G.; VERMA, M. Biohydrogen production by co-fermentation of crude glycerol and apple pomacehydroly sate using co-culture of *Enterobacteraerogenes* and *Clostridium butyricum*. **Bioresource Technology**, v. 193, p. 297-306, 2015.

PENTEADO, E. D. **Tratamento de água residuária em célula a combustível microbiana e geração de energia direta: fundamentos e aplicações**. Tese doutorado. Universidade de São Paulo. 2016.

PREMIER, G.C., KIM, J.R., MASSANET-NICOLAU, J., KYAZZE, G., ESTEVES, S.R.R., PENUMATHSA, B.K.V., RODRÍGUEZ, J., MADDY, J., DINSDALE, R.M., GUWY, A.J. Integration of Biohydrogen, Biomethane and Bioelectrochemical Systems. **Renewable Energy**. V. 49, 188–192, 2013.

RODRIGO, M. A.; CAÑIZARES, P.; GARCIA, H.; LINARES, J. J. LOBATO, J. Study of the acclimation stage and of the effect of the biodegradability on the performance of a microbial fuel cell. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 4704 – 4710, 2009.

ROZENDAL, R. A.; HAMELERS, H. V.; BUISMAN, C. J. Effects of membran cation transport on pH and microbial fuel cell performance. **Environmental Science & Technology**, v. 40, p. 5206 – 5211, 2006.

SCHIEVANO, A.; SCIARRIA, T. P.; GAO, Y. C.; SCAGLIA, B.; SALATI, S.; ZANARDO, M.; QUIAO, W.; DONG, R.; ADANI, F. Dark fermentation, anaerobic digestion and microbial fuel cells: An integrated system to valorize swine manure and rice bran. **Waste Management**. V. 56, p. 519 – 529, 2016.

WANG, L.; ZHOU, Q.; LI, F. T. Avoiding propionic acid accumulation in the anaerobic process for biohydrogen production. **Biomass Bioenergy**, v. 30, p. 177 – 182, 2006.

XIU, Z-L.; CHEN, X.; SUN, T-Q.; ZHANG, D-J. **Biochemical Engineering Journal**, v. 33, p. 42, 2007.

ZUO, Y.; XING, D.; REGAN, J. M.; LOGAN, B. E. Isolation of the exoelectrogenic bacterium *Ochrobactrum anthropi* YZ-1 by using a U-tube microbial fuel cell. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 3130 – 3137, 2008.

5. DISCUSSÃO GERAL

Neste trabalho buscou-se agregar a remoção de matéria orgânica, a produção de hidrogênio e de energia. Inicialmente foram realizados ensaios para buscar a melhor condição de trabalho para degradar a matéria orgânica, estudando a relação C/N e também a agitação (contínua, 4 h e sem agitação) aplicando o tratamento térmico ao inóculo de 80 °C durante 30 min. Nesta fase inicial da pesquisa a melhor condição de trabalho foi a relação C/N de 40 sem agitação, resultando em uma remoção de demanda química de oxigênio (DQO) de 62,22 %. A relação C/N apresentou diferença significativa nos ensaios sem agitação, quando a agitação foi de 4 h a relação C/N 40 apresentou maior remoção de DQO, 51,12 %, nos ensaios com relação C/N 80 e 120 a remoção de DQO não foi significativa.

A elevada carga orgânica para o processo de digestão anaeróbia causa uma redução na eficiência de remoção da DQO, segundo Hutnan et al. (2009), a degradação do glicerol com aplicação de elevada concentração o processo se torna sensível. A agitação contínua não apresentou diferença significativa entre as relações C/N estudadas, concluindo que a máxima carga orgânica aplicada não foi um fator influente quando os ensaios foram realizados com agitação contínua. Devido aos custos envolvidos com a agitação e a remoção de DQO não houve diferença significativa entre as formas de agitação em uma mesma relação C/N, optou-se por utilizar a condição da relação C/N 40 sem agitação nas próximas etapas do trabalho.

Quando aplicada estas condições no ensaio para verificação da produção de hidrogênio, foi observado que o tratamento térmico ao inóculo de 80 °C durante 30 min não foi eficiente para eliminação dos micro-organismos metanogênicos, produzindo 0,261 mmol L⁻¹ de hidrogênio e, representando um fator de conversão de substrato em produto de 0,344 mol H₂ mol glicerol⁻¹. Desta forma, para as condições estudadas a aplicação do pré-tratamento de 80 °C durante 30 min não se mostrou eficiente como é encontrado na bibliografia,

tornando-se necessário pesquisar outro tratamento térmico que seja eficiente para remoção dos micro-organismos produtores de metano. Então, foi estudado a produção de hidrogênio com aplicação do tratamento térmico ao inóculo de 105 °C durante 15 h, sem agitação e na relação C/N 40, obtendo a concentração de hidrogênio máxima de 0,345 mmol L⁻¹, havendo uma tendência há aumentar a conversão de substrato em produto, no final de 168 h obteve a conversão de 0,081 mol H₂ mol glicerol⁻¹. Neste tratamento a produção de hidrogênio foi favorecida, não havendo produção de metano ao longo do processo, 168 h. A produção de hidrogênio ocorreu de forma mais lenta, quando comparado com o tratamento térmico de 80 °C durante 30min, porém o mesmo apresentou produção de metano em 24 h de processo. Revelando a necessidade de manter o processo com um TRH de menor que 24 h para a eliminação dos micro-organismos produtores de metano do reator UASB.

No tratamento térmico de 80 °C durante 30 min, a presença de metano foi identificada em apenas 24 h, após este tempo houve a redução na produção de hidrogênio, devido ao consumo deste gás pelos micro-organismos metanogênicos. Segundo Wang et al. (2006) e Koskinen et al. (2007), a presença de alguns metabólitos secundários, como o 1,3-propanodiol e ácido propiônico, podem afetar negativamente a produção de hidrogênio. Um ensaio controle foi realizado para fins de comparação, ocorrendo a produção de hidrogênio mínima, e a produção de metano foi identificada em apenas 9 h de ensaio, resultando em produção máxima de hidrogênio de 0,038 mmol L⁻¹. Também pode-se atribuir a baixa produção de hidrogênio devido ao glicerol utilizado ser residual, podendo ter presença de algum componente tóxico aos micro-organismos, assim reduzindo a produção de biogás. A remoção de glicerol máxima foi obtida no ensaio com tratamento térmico de 80 °C durante 30 min, resultando em 99,74 %, no ensaio controle a remoção de glicerol foi de 73,81 % e no ensaio com aplicação de 105 °C durante 15 h a remoção ao final de 168 h foi 58 %.

A fim de ampliar a escala foi realizado ensaios em reator UASB para estudar o tempo de retenção hidráulico de 24 h, como fator para controlar a presença dos micro-organismos metanogênicos. Devido a alta carga orgânica presente na saída de reatores acidogênicos, foi associado a célula combustível microbiana, a fim de utilizar a matéria orgânica residual no reator UASB para a geração de energia na forma direta em célula combustível microbiana. Nestes ensaios não foi favorecido a produção de hidrogênio no ensaio com relação C/N 40 sem tratamento térmico, havendo a necessidade de outro processo, como o tratamento térmico ao inóculo, para que os micro-organismos metanogênicos sejam eliminadas. A vazão de

biogás nos ensaios com a aplicação do tratamento térmico foi próximo, não apresentando grande diferença entre a aplicação da relação C/N 40 e 120, quando no inóculo não houve aplicação de tratamento a produção de biogás aumentou, obtendo valor próximo de 225 L d^{-1} . A produção de energia foi favorecida quando utilizou a relação C/N 120, alcançando densidade de potência de 120 mW m^{-2} , este valor pode ser explicado devido a alta condutividade obtida neste ensaio, o que na relação C/N 40 foi menor.

Devido a produção de ácidos orgânicos voláteis ser superior na MFC em relação ao reator UASB, a produção de energia pode estar associada ao consumo do glicerol residual ainda presente após o consumo no reator UASB. Conforme o estudo realizado quanto ao consumo do glicerol residual, após 7 d de ensaio em reatores sem agitação e sem tratamento térmico, a remoção de glicerol foi de aproximadamente 70 %. Desta forma, no reator UASB com TRH de 24 h o consumo do glicerol não foi total, assim sendo consumido na MFC para a geração de energia.

A remoção de matéria orgânica foi instável ao longo dos processos, havendo máxima remoção de DQO no ensaio de relação C/N 120, 11,46 %. Estes valores obtidos com o reator UASB foram inferiores aos encontrados em demais estudos, necessitando melhor controle de parâmetros no reator UASB, bem como melhor homogeneização da alimentação do reator. Na MFC a diluição do meio de cultivo e ajuste da condutividade do meio de cultivo podem ser alternativas para obtenção de melhores resultados, necessitando mais estudos.

6. CONCLUSÃO GERAL

A produção de hidrogênio utilizando glicerol como fonte de carbono foi possível, obtendo melhor condição para remoção de matéria orgânica na relação C/N 40 sem agitação, reduzindo a DQO em 62,22 %. Porém quando foi quantificado a produção de hidrogênio, o tratamento térmico de $80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 min não foi eficiente ($0,261 \text{ mmol H}_2 \text{ L}^{-1}$), havendo presença de metano em apenas 24 h de processo e remoção de glicerol de 99,74 % ao final de 168 h. O tratamento de $105 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 h a presença de metano não foi identificado ao longo de 168 h ($0,345 \text{ mmol H}_2 \text{ L}^{-1}$) e a remoção de glicerol foi de 58 %. Nos ensaios em que utilizou-se o tempo de retenção hidráulico como parâmetro para controle dos micro-organismos metanogênicos, a presença de metano foi identificada, não sendo uma forma eficiente de seleção para micro-organismos produtores de hidrogênio, houve a produção de

energia elétrica nas células combustíveis microbiana. Na relação C/N 120, foi o ensaio em que a produção de energia foi favorecida, obtendo densidade de potência de aproximadamente 20 mW m^{-2} . Assim o tratamento ao inóculo é um fator de grande importância para a produção de hidrogênio, necessitando de mais estudo a respeito do tratamento térmico ao inóculo, bem como devido a utilização de glicerol residual, pode ter ocorrido a inibição dos microorganismos devido algum composto presente ao glicerol. A associação das células combustíveis microbianas tornam-se um processo interessante para a associação na digestão anaeróbia de glicerol, auxiliando na redução de matéria orgânica e produzindo energia, porém ainda existe pouco estudo referente a esta associação, necessitando um conhecimento ainda maior a fim de obter correntes elétricas maiores.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar a produção de hidrogênio em outras relações C/N utilizando glicerol;
- Estudar a influência da agitação na produção de hidrogênio;
- Utilizar outras fontes de carbono na produção de hidrogênio;
- Aprimorar os parâmetros de processo no reator UASB para favorecer a produção de hidrogênio em maior escala.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEL (ANP). **Boletim mensal do biodiesel**. Janeiro, 2015.

Al Seadi, T.; et al. **Biogas handbook**. Biogas for Eastern Europe project, University of Southern Denmark, Esbjerg, 2008.

ANZOLA-ROJAS, M.del P.; FONSECA, S. G.; SILVA, C. C.; OLIVEIRA, V. M.; ZAIAT, M. The use of the carbono/nitrogen ratio and specific organic loading rate as tools for improving biohydrogen production in fixed-bed reactors. **Biotechnology Reports**. v. 5, p. 46 – 54, 2015.

APHA – American Public Health Association; AWWA –American Water Works Association; WEF – Water Environment Federation. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. Washington, D. C, 2005.

ARRUDA, P. V. de; RODRIGUES, R. de C. L. B.; FELIPE, M. das G. de A. Glicerol : um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. **Revista Analytica**, n. 26, p. 56–62, 2007.

BECKERS, L.; MASSET, J.; HAMILTON, C.; DELVIGNE, F.; TOYE, D.; CRINE, M.; THONART, P.; HILIGSMANN, S. Investigation of the links between mass transfer conditions, dissolved hydrogen concentration and biohydrogen production by pure strain *Clostridium butyricum* CWBI1009. **Biochemical Engineering Journal**. v. 98, p. 18 – 28. 2015.

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

BOROWSKI S. Temperature-phased anaerobic digestion of the hydromechanically separated organic fraction of municipal solid waste with sewage sludge. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 105, p. 106-113, 2005.

BUITRÓN, G.; CARVAJAL, C. Biohydrogen production from tequila vinasses in an anaerobic sequencieng bacth reactor: Effect of initial substrate concentration, temperatura and hydraulic retention time. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 9071 – 9077, 2010.

BUNDHOO, M. A. Z.; MOHEE, R.; HASSAN, M. A. Effects of pre treatment Technologies on dark fermentative biohydrogen production: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 157, p. 20 – 48, 2015.

CAMPBELL, M. K.; FARRELL, S. O. **Bioquímica**. Trad. de A. Tasks. v. 3, Ed. 5º , São Paulo: Thomson Learning, 2008.

CERQUEIRA, M. B. R.; DIAS, A. N.; CALDAS, S. S.; SANTANA, F. B.; D’OCA, M. G. M.; PRIMEL, E. G. Validação de métodos para determinação de ácidos orgânicos voláteis em

efluentes de reatores anaeróbios empregado cromatografia líquido. **Química Nova**, n. 1, v. 34, p. 156 – 159, 2011.

CHEN, C. C.; LIN, C. Y.; CHANG, J. S. Kinetics of hydrogen production with continuous anaerobic culture utilizing sucrose as the limiting substrate. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 57, p. 56 – 64, 2001.

CONRAD, R.; PHELPS, T. J.; ZEIKUS, J. G. Gas metabolism evidence in support of the juxtaposition of hydrogen-producing and methanogenic bacteria in sewage sludge and lake sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, p. 595-601, 1985.

COSTA, J. B. **Produção biotecnológica de hidrogênio, etanol e outros produtos a partir da reação de formação de biodiesel**. Dissertação mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.

Cristiano Varrone, **Crude glycerol fermenting process for the production of ethanol and hydrogen**. C12P7/06, C112P7/14. US 20140295515A1. 12 set. 2012: 4 jun. 2014. 2 out. 2014.

DAS, D., VEZEROGEN, T. N. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. **International Journal of Hydrogen Energy**. V. 26, p. 13-28. 2001.

DE SÁ, L. R. V.; CAMMAROTA, M. C.; OLIVEIRA, T. C.; OLIVEIRA, E. M. M.; MATOS, A.; FERREIRA-LEITÃO, V. S. Pentoses, hexoses and glycerin as substrates for biohydrogen production: Na approach for Brazilian biofuel integration. **Hydrogen Energy**, v. 38, p. 2986 – 2997, 2013.

DEEPANRAJ, B.; SIVASUBRAMANIAN, V.; JAYARAJ S. Kinetic study on the effect of temperature on biogás production using a lab scale batch reactor. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 121, p. 100-104, 2015.

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

DILLIS, S. S. APPERSON, A.; SCHMIDT, M. R.; SAIER, M. H. **Microbiology Rev.** v. 44, p. 385, 1980.

DONG, L.; ZHENHONG, Y.; YONGMING, S.; LONGLONG, M. Evaluation of pretreatment methods on harvesting hydrogen producing seeds from anaerobic digested organic fraction of municipal solid waste (OFMSW). **Hydrogen Energy**. v. 35, p. 8234 – 8240. 2010.

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

FERNANDES, B. S. **Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo**. Tese doutorado. Universidade de São Paulo. 2008.

FERNÁNDEZ, C.; CUETOS, M. J.; MARTÍNEZ, E. J.; GÓMEZ, X. Thermophilic anaerobic digestion of cheese whey: Coupling H₂ and CH₄ production. **Biomass and Bioenergy**, v. 81, p. 55 – 62, 2015.

FERREIRA, J. **Produção de hidrogênio em reator anaeróbico de leite fluidizado a partir de glicerol bruto sob condições termofílicas**. Dissertação mestrado. Universidade Federal de São Carlos. 2014.

FONSECA, B. C.; GUAZZARONI, M-E.; REGINATTO, V. Fermentative production of H₂ from different concentration of galactose by the new isolate *Clostridium beijerinckii* Br 21. **International Journal of Hydrogen Energy**, Ed. 46, v. 41, p. 21109 – 21120, 2016.

FONSECA, M. M.; TEIXEIRA, J. A. **Reactores Biológicos fundamentos e aplicações**. Editora: Lidel, 2007.

FRADLER, K. R.; LIM, J. R.; SHIPLEY, G.; MASSANET-NICOLAU, J.; DINSDALE, R. M.; GUWY, A. J.; PREMIER, G. C. Operation of a bioelectrochemical system as a bioelectrochemical system as a polishing stage for the effluent from a two-stage biohydrogen and biomethane production process. **Biochemical Engineering Journal**, v. 85, p. 125 – 131, 2014.

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

GERARDI M. H. **The microbiology of anaerobic digesters**. John Wiley & Sons, New Jersey, Canadá: 188 p, 2003.

GOMES NETO, E. H. Hidrogênio, Evoluir sem poluir: a era do hidrogênio, das energias renováveis e das células a combustível. **Brasil H₂ Fuel Cell Energy**. Curitiba – PR, 2005.

GRAVALA, H. N.; SKIADAS, L. V.; AHRING, B. K. Biological hydrogen production in suspended and attached growth anaerobic reactor systems. **International Journal of Hydrogen Energy**. v. 31, p. 1164 – 1175, 2006.

GREENFIELD SPECIALTY ALCOHOLS INC. Hisham Mohamed Hafez. **Biohydrogen production method and reactor**. C12P03/00, C01B3/50, C02F11/04, C12M1/107, C12P5/02, C12P7/02, C12P7/40. WO 2015058295A1. 21 out. 2013: 20 out. 2014. 30 abril 2015.

HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, F. J.; de los RIOS, A. P.; SOLAR-GARCIA, M. J.; ORTIZ-MARTÍNEZ, V. M.; LOZANO-BLANCO, L. J.; GODÍNEZ, C.; TOMÁS-ALONSO, F.; QUESADA-MEDINA, J. Recent progress and perspectives in microbial fuel cells for bioenergy generation and wastewater treatment. **Fuel Processing Technology**, v. 138, p. 284 – 297, 2015.

HOFFMAN, R. A.; GARCIA, M. L.; VAEKIVAR, M.; KARIM, K.; AL-DAHMAN, M. H.; ANGENENT, L. T. Effect of shear on performance and microbial ecology of continuously stirred anaerobic digesters treating animal manure. **Biotechnology Bioengineering**, v. 100, p. 38-48, 2008.

HUANG, L.; LOGAN, B. E. Electricity generation and treatment of paper recycling wastewater using a microbial fuel cell. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 80, p. 349 – 355, 2008.

JAIN, S.; JAIN, S.; WOLF, I. T.; LEE, J.; TONG, Y. W. A comprehensive review on operating parameters and different pretreatment methodologies for anaerobic digestion of municipal solid waste. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 52, p. 142–154, 2015.

KAWAGOSHI, Y.; HINO, N.; FUJIMOTO, A.; NAKAO, M.; FUJITA, Y.; SUGIMURA, S.; FURUKAWA, K. Effect of inoculum conditioning on hydrogen fermentation and pH on bacterial community relevant to hydrogen production. **Journal of Biotechnology and Bioengineering**, v. 100, p. 524 – 530, 2005.

KIELY, P. D.; REGAN, J.; M., LOGAN, B. E. The electric picnic: Synergistic requirements for exoelectrogenic microbial communities. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 3, p. 378–385, 2011.

KIM, T.; AN, J.; JANG, J. K.; CHANG, I. S. Coupling of anaerobic digester and microbial fuel cell for COD removal and ammonia recovery. **Bioresource Technology**, v. 195, p. 217 – 222, 2015.

KOKOSSIS, A. C.; TSAKALOVA, M.; PYRGAKIS, K. Design of integrated biorefineries. v. 81, p. 40–56, 2015.

KOSKINEN, P. E. P.; KASKSONEN, A. H.; PUHAKKA, J. A.; The relationship between instability of H₂ production and compositions of bacterial communities within a dark fermentation fluidized-bed reactor. **Biotechnology Bioenergy**, v. 97, p. 742 – 758, 2007.

LAMAISON, F. C. **Aplicação da água residuária do processamento da mandioca como substrato para a produção de hidrogênio por processo fermentativo**. Dissertação mestrado Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina, 2009.

LARROSA-GUERRERO, A.; SCOTT, K.; HEAD, I. M.; MATEO, F.; GINESTA, A.; GODÍNES, C. Effect of temperature on the performance of microbial fuel cells. **Fuel**, v. 89, ed. 12, p. 3985 – 3994, 2010.

LI Y, PARK SY & ZHU J. Solid-state anaerobic digestion for methane production from organic waste. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, p. 821–826, 2011.

LORENCINI, P.; SIQUEIRA, M.R.; MANIGLIA, B.C.; TAPIA, D. R.; MAINTINGUER, S. I.; REGINATTO, V. Biohydrogen Production from Liquid and Solid Fractions of

Sugarcane Bagasse After Optimized Pretreatment with Hydrochloric Acid. **Waste Biomass Valor**, 7: 1017, 2016.

LOGAN, B. E. **Microbial fuel cells, Wiley-Interscience Microbial fuel cells**. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New York, 2008.

LOGAN, B. E.; RABAEY, K. Conversion of wastes into bioelectricity and chemicals by using microbial electrochemical technologies. **Science**, v. 337, p. 686 – 690, 2012.

LU, Y.; ZHAO, H.; ZHANG, C.; XING, X-H. Insights into global regulation of anaerobic metabolism for improved biohydrogen production. **Bioresource Technology**. v. 200, p. 35-41, 2016.

MANSSOURI, M. E. **Influência da carga orgânica na produção de biohidrogênio em Asbbr com agitação tratando água residuária sintética**. Dissertação mestrado. Universidade de São Paulo. 2012.

MARCON, L. R. C. **Potencialidade da célula combustível microbiana para geração de energia elétrica a partir de esgoto sanitário**. Dissertação mestrado. Universidade de São Paulo, 2011

MIN, B.; KIM, J. R.; OH, S. E.; REGAN, J. M.; LOGAN, B. E. Electricity generation from swine wastewater using microbial fuel cells. **Water Resources**, v. 39, p. 4961 – 4968, 2005.

MOTA, C. J. A.; SILVA, C. X. A.; GONÇALVES, V. L. C. Gliceriquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 639-648, 2009.

MU, Y.; WANG, G.; YU, H-Q. Response surface methodological analysis on biohydrogen production by enriched anaerobic cultures. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 38, p. 905 – 913, 2006.

NIMJE, V. R.; CHEN, C-Y.; CHEN, C-C.; CHEN, H-R.; TSENG, M-J.; JEAN, J-S.; CHANG, Y-F. Glycerol degradation in single-chamber microbial fuel cells. **Bioresource Tecnology**, v. 102, p. 2629 – 2634, 2011.

OOI, T. L.; YONG, K. C.; HAZIMAH, A. H.; DZULKEFLY, K.; WAN YUNUS, W. M. Z. Glycerol Residue-A Rich Source of Glycerol and Medium Chain Fatty Acids. **Journal of Oleo Science**, v. 53, n. 1, p. 29–33, 2004.

OZTEKIN, R.; KAPDAN, I. K.; KARGI, F. ARGUM, H. Optimization of media composition for hydrogen gas production from hydrolyzed wheat starch by dark fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**. v. 33, p. 4083 – 4090, 2008.

PACHAPUR, V. L.; SARMA, S. J.; BRAR, S. K.; BIHAM, Y. B.; BUELMA G.; VERMA, M. Biohydrogen production by co-fermentation of crude glycerol and apple pomacehydroly sate using co-culture of *Enterobacter aerogenes* and *Clostridium butyricum*. **Bioresource Technology**, v. 193, p. 297-306, 2015.

PACHAURI, N.; HE, B. **Value-added utilization of crude glycerol from biodiesel production: a survey of current research activities**. In Proceeding of ASABE Annual International Meeting, 2006.

PAP, B.; GYÖRKEI, A.; BOBOESCU, I. Z.; NAGY, I. K.; BÍRO, T.; KONDOROSI, É.; MARÓTI, G. Temperature-dependent transformation of biogas-producing microbial communities points to the increased importance of hydrogenotrophicmethanogenesis under thermophilic operation. **Bioresource Technology**. v. 177, p. 375 – 380, 2015.

PENTEADO, E. D. **Tratamento de água residuária em célula a combustível microbiana e geração de energia direta: fundamentos e aplicações**. Tese doutorado. Universidade de São Paulo. 2016.

PREMIER, G.C., KIM, J.R., MASSANET-NICOLAU, J., KYAZZE, G., ESTEVES, S.R.R., PENUMATHSA, B.K.V., RODRÍGUEZ, J., MADDY, J., DINSDALE, R.M., GUWY, A.J. Integration of Biohydrogen, Biomethane and Bioelectrochemical Systems. **Renewable Energy**. V. 49, 188–192, 2013.

PUYUELO B.; PONSÁ S.; GEA T.; SÁNCHEZ A. Determining C/N ratios for typical organic wastes using biodegradable fractions. **Chemosphere**, v. 85, p. 653–659, 2011.

QIANG, L.; VRIENZE, J. D; GUIHUA, E.; LI, X.; LI, J. Temperature regulates methane production through the function centralization of microbial community in anaerobic digestion. **Bioresource Technology**, v. 216, p. 150-158, 2016.

QIANG, L.; VRIENZE, J. D.; LI, J.; LI, X.; Temperature affects microbial abundance, activity and interacions in digestion anaerobis. **Bioresource Technology**. v. 209, p. 228 – 236, 2016.

RAZAVIARANI, V.; BUCHANAN, I. D. Anaerobic co-digestion of waste biodiesel glycerin with sludge municipal wastewater microbial community structure and dynamics reactor performance. **Bioresource Technology**, v. 182, p. 8-17, 2015.

RIVALDI, J. D.; SARROUH, B. F.; FIORILO, R.; SILVA, S. S. Glicerol de biodiesel: Estratégias biotecnológicas para o aproveitamento do glicerol gerado da produção de biodiesel. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 37, p. 44-51, 2007.

RODRIGO, M. A.; CAÑIZARES, P.; GARCIA, H.; LINARES, J. J. LOBATO, J. Study of the acclimation stage and of the effect of the biodegradability on the performance of a microbial fuel cell. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 4704 – 4710, 2009.

ROSSI, D. M.; COSTA, J. B.; SOUZA, E. A.; PERALBA, M. C. R.; SAMIOS, D.; AYUB, M. A. Z. Comparasion of different pretreatment methods for hydrogen production using environmental microbial consortia on residual glycerol from biodiesel. **Hydrogen Energy**. v. 36, p. 4814 – 4819. 2011.

ROZENDAL, R. A.; HAMELERS, H. V.; BUISMAN, C. J. Effects of membran cation transport on pH and microbial fuel cell performance. **Environmental Science & Technology**, v. 40, p. 5206 – 5211, 2006.

SANTOS, F. M. S. M.; SANTOS, F. A. C. M. O COMBUSTÍVEL “HIDROGÊNIO”. **Revista Millenium**, n. 31, p. 252-270, 2005.

SARMA, S. J.; BRAR, S. K.; BIHAN, Y. L.; BUELNA, G.; SOCCOL, C. R. Mitigation of the inhibitory effect of soap by magnesium salt treatment of crude glycerol – A novel approach for enhanced biohydrogen production from the biodiesel industry waste. **Bioresource Technology**, v. 151, p. 49 – 53, 2014.

SAWATDEENARUNAT, C.; NGUYED, D.; SURENDRA, K. C.; SHERESTHA, S.; RAJENDRAN, K.; OECHSNER, H.; XIE, L.; KHANAL, S. K. Anaerobic biorefinery: Current status, challenges, and opportunities. **Bioresource Technology**. v. 215, p. 304-313, 2016.

SCHIEVANO, A.; SCIARRIA, T. P.; GAO, Y. C.; SCAGLIA, B.; SALATI, S.; ZANARDO, M.; QUIAO, W.; DONG, R.; ADANI, F. Dark fermentation, anaerobic digestion and microbial fuel cells: An integrated system to valorize swine manure and rice bran. **Waste Management**. V. 56, p. 519 – 529, 2016.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. de A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia industrial**. São Paulo: Edgard Blücher, v. 2, 2001.

SILVA, G. P. D.; MACK, M.; CONTIEIRO, J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology Advances**. v. 9, p. 27-30, 2009.

SIRGH, L.; ZULARISAM, A. W. Methods for enhancing bio-hydrogen productions from biological process: A review. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**. V. 21, p. 70-80, 2015.

STROOT, P. G.; MACMAHON, K. D.; MACKIE, R. I.; RASKIN, L. Anaerobic codigestion of municipal solid waste and biosolids under various mixing conditions—I. Digester performance. **Water Resource**, v. 35, p. 1804-1816, 2001.

TAN, H. W.; AZIZ, A. R. A.; 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

TANG, J.; YUAN, Y.; GUO, W-Q; REN, N-Q. Inhibitory effects of acetate and ethanol on biohydrogen production of *Ethanoligenens harbinense* B49. **International Journal of Hydrogen Energy**. v. 37, p. 741-747, 2012.

TELEKEN, J. T. **Modelagem matemática da geração de corrente elétrica em uma célula combustível microbiana inoculada com micro-organismos marinhos**. Dissertação mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

VALDEZ-VASQUEZ, I.; POGGI-VARALDO, H. M. Hydrogen production by fermentative consortia. **Renewable Sustainable Energy Review**, v. 13, p. 1000-1013, 2009.

WANG, J.; WAN, W. Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, p. 799 – 811, 2009.

WANG, L.; ZHOU, Q.; LI, F. T. Avoiding propionic acid accumulation in the anaerobic process for biohydrogen production. **Biomass Bioenergy**, v. 30, p. 177 – 182, 2006.

WANG, Y.; CAI, D. Applications of fish oil lipid emulsion in severe acute pancreatitis. **Pharmaceutical Care and Research**, V. 11, p. 390-393, 2011.

WILSON, C. A.; MURTHY, S. M.; FANG, Y.; NOVAK, J. T. The effects of temperature on the performance and stability of thermophilic anaerobic digestion. **Water Science Technology**, v. 57, p. 297 – 304, 2008.

XIU, Z-L.; CHEN, X.; SUN, T-Q.; ZHANG, D-J. **Biochemical Engineering Journal**, v. 33, p. 42, 2007.

YAZDANI, S. S.; GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, p. 213-219, 2007.

ZHANG, C.; HAIJIA, S.; BAEYENS, J.; TAN, T. Reviewing the anaerobic digestion of food waste for biogas production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 38, p. 383–392, 2014.

ZUO, Y.; XING, D.; REGAN, J. M.; LOGAN, B. E. Isolation of the exoelectrogenic bacterium *Ochrobactrum anthropi* YZ-1 by using a U-tube microbial fuel cell. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 3130 – 3137, 2008.