

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

THOMPSON RICARDO WEISER MEIER

**PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO E METANO A PARTIR DE MANIPUEIRA COM
ADIÇÃO DE GLICEROL RESIDUAL POR BIODIGESTÃO ANAERÓBIA**

TOLEDO

2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Trabalho apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Edson da Silva.

Co-Orientador: Prof. Dr. Joel Gustavo Teleken.

TOLEDO

2020

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

MEIER, THOMPSON RICARDO WEISER

Produção de hidrogênio e metano a partir de manipueira com adição de glicerol residual por biodigestão anaeróbia / THOMPSON RICARDO WEISER MEIER; orientador(a), EDSON ANTÔNIO DA SILVA; coorientador(a), JOEL GUSTAVO TELEKEN, 2020.
68 f.

Tese (doutorado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Toledo, Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2020.

1. BIOENERGIA. 2. HIDROGÊNIO. 3. METANO. 4. OTIMIZAÇÃO.
I. DA SILVA, EDSON ANTÔNIO. II. TELEKEN, JOEL GUSTAVO. III. Título.

RESUMO

No Brasil, embora a maior parte da demanda energética ser suprida por meio de energia hidrelétrica, o estudo e otimização de outras fontes renováveis de energia tem crescido devido à preocupação com o grande impacto local causado pela instalação desses empreendimentos, além da constante baixa dos níveis dos reservatórios de água observados nos últimos anos. Neste contexto, a produção de biogás vem ganhando cada vez mais a atenção de pesquisadores, que tem visado principalmente a otimização do processo através da codigestão de dois ou mais resíduos. Apesar do incremento significativo da produção de biogás e metano proporcionado pela adição de glicerol a resíduos agroindustriais quando submetidos a biodigestão anaeróbia, poucos estudos são direcionados a produção de hidrogênio utilizando este resíduo. Assim, o presente trabalho avaliou a biodigestão anaeróbia em dois estágios da manuseira com adição de glicerol residual, visando maximizar a produção de hidrogênio e metano. Neste estudo foi utilizado inóculo de água residual de suinocultura, que foi avaliado pelo isolamento dos microrganismos anaeróbios, extração do DNA e sequenciamento genético, revelando que este inóculo continha bactérias do gênero *Brevundimonas*, do subgrupo *Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus*, e uma da espécie *Bacillus licheniformis*. Para o estudo da produção de gás, delineou-se planejamento fatorial 3^2 visando avaliar os efeitos da temperatura e concentração de glicerol na produção de hidrogênio, e o efeito da temperatura e adição de bicarbonato de sódio, um agente tamponante, na produção de metano. Verificou-se que a adição de glicerol proporcionou um aumento da produção de hidrogênio. Enquanto a produção de hidrogênio nos tratamentos sem a adição de glicerol variou de 215,1 a 243,5 mL, nas melhores condições obtidas neste estudo (4% de glicerol e temperatura de 38,5 °C), a produção foi de 1102,6 mL, um incremento superior a 400 % quando comparados aos tratamentos sem adição deste resíduo. A análise dos efluentes destes experimentos evidenciou a necessidade de um tratamento adicional. Desta forma, foi realizado o estudo da biodigestão em dois estágios, que emprega o uso de reatores acidogênico e metanogênico separados fisicamente. Nesta etapa foi otimizada a produção de metano, avaliando os efeitos da temperatura na faixa entre 36,0 e 39,0 °C e da concentração de bicarbonato de sódio (entre 2,0 e 6,0 gL⁻¹), que foi adicionado ao efluente de um biodigestor acidogênico de escala piloto com volume útil de 50 L e que operava nas condições otimizadas de produção de hidrogênio. As melhores condições obtidas para o estágio metanogênico foram em temperatura de 39,0 °C e concentração de bicarbonato de sódio de 5,0 gL⁻¹. Nestas condições, a remoção de DQO foi de 93,4 %, sendo produzido biogás com 64,5 % de metano, o que resultou em um volume de 2819,4 mL deste biocombustível. Desta forma, o emprego da biodigestão em dois estágios tornou possível maximizar a tanto a produção de hidrogênio quanto a de metano, sendo obtidos 861,4 mLH₂ e 1762,1 mLCH₄ a cada litro de resíduo tratado. Assim, conclui-se que os substratos e inóculo empregados no estudo são adequados ao processo de biodigestão anaeróbia, e podem contribuir para a redução da dependência das fontes fósseis de energia.

Palavras Chave: Otimização; Bioenergia; Resíduos Agroindustriais.

ABSTRACT

In Brazil, although most energy demand is supplied through hydroelectric power, the study and optimization of other renewable energy sources has grown due to concern about the constant low levels of water reservoirs observed in recent years. In this context, biogas production has increasingly gained the attention of researchers, who have mainly aimed at optimizing the process through the codigestion of two or more waste. Despite the significant increase in biogas and methane production provided by the addition of glycerol to agroindustrial residues when subjected to anaerobic biodigestion, few studies are directed to the production of hydrogen using this residue. Thus, the present study evaluated the anaerobic biodigestion in two stages of Manipueira with the addition of residual glycerol, aiming to maximize the production of hydrogen and methane. In this study we used inoculum of residual swine water, which was evaluated by the isolation of anaerobic microorganisms, DNA extraction and genetic sequencing, revealing that this inoculum contained bacteria of the genus *Brevundimonas*, from the subgroup *Bacillus subtilis* and *Bacillus Cereus*, and one of the species *Bacillus licheniformis*. For the study of gas production, a 3² factorial design was delineated aiming to evaluate the effects of glycerol temperature and concentration on the production of hydrogen and methane, and it was verified that the addition of glycerol provided an increase in the production of Hydrogen. While the production of hydrogen in the treatments without the addition of glycerol ranged from 215.1 to 243.5 mL, in the best conditions obtained in this study (4% of glycerol and temperature of 38.5 °C), the production was 1102.6 mL, an increment higher than 400%. The effluent analysis of these treatments evidenced the need for additional treatment. Thus, a two-stage biodigestion study was carried out, which employs the use of physically separated acidogenic and methanogenic reactors. At this stage the methane production was optimized, evaluating the effects of temperature in the range between 36.0 and 39.0 oC and the concentration of sodium bicarbonate (between 2.0 and 6.0 gL⁻¹), which was added to the effluent of a pilot-scale acidogenic biodigester with volume of 50 L and operating in the optimized conditions of hydrogen production. The ideal conditions for the methanogenic stage were at a temperature of 39.0 °C and a concentration of sodium bicarbonate of 5.0 gL⁻¹. In these conditions, the removal of COD was 93.4%, and biogas was produced with 64.5% of methane, which resulted in a volume of 2819.4 mL of this biofuel. Thus, the use of two-stage biodigestion made it possible to maximize both hydrogen and methane production, and 861.4 mLH₂ and 1762.1 mLCH₄ were obtained for each liter of treated waste. Thus, it is concluded that the substrates and inoculum used in the study are adequate to the anaerobic biodigestion process, and can contribute to the reduction of dependence on fossil energy sources.

Keywords: Optimization, bioenergy, agro-industrial waste.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas do processo de biodigestão anaeróbia.....	16
Figura 2. Fluxograma contendo as etapas experimentais do estudo.....	22
Figura 3. Esquema construtivo dos biodigestores e gasômetros.....	26
Figura 4. Esquema ilustrativo dos biodigestores contendo as amostras dos efluentes...	27
Figura 5. Superfície de resposta para a produção de hidrogênio, Concentração, Velocidade específica máxima e tempo de duração da fase lag.....	36
Figura 6. Cinética de Produção de hidrogênio em temperatura constante.....	37
Figura 7. Tratamentos que obtiveram o melhor pior ajuste do modelo de Gompertz.....	38
Figura 8. Perfil de produção de ácidos voláteis nos tratamentos realizados a 40 °C.....	40
Figura 9. Superfície de resposta para as Remoções de DQO, ART, ST, SV e Conversão de carga orgânica em Hidrogênio.....	42
Figura 10. Gráfico de desejabilidade para otimização dos parâmetros.....	44
Figura 11. Gráfico de desejabilidade para estimação dos parâmetros cinéticos.....	44
Figura 12. Produção de hidrogênio no reator acidogênico.....	46
Figura 13. Perfil de ácidos orgânicos para a digestão acidogênica.....	48
Figura 14. Modelos de Gompertz ajustados aos dados de produção acumulada de metano para os tratamentos estudados.....	50
Figura 15. Superfícies de resposta para as variáveis produção de metano e concentração de metano para os tratamentos estudados.....	51
Figura 16. Superfícies de resposta referentes a remoção de carga orgânica nas variáveis dependentes Remoção de ST, SV e DQO.....	52
Figura 17. Ácidos orgânicos presentes no efluente nas condições otimizada.....	53
Figura 18. Cinéticas de produção de gás na biodigestão em duas etapas.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tabela 1. Aplicações do Hidrogênio.....	20
Tabela 2 - Métodos empregados na determinação dos parâmetros físico-químicos.....	24
Tabela 3. Composição dos Tratamentos para produção de hidrogênio.....	27
Tabela 4. Condições experimentais dos Tratamentos para produção de metano.....	31
Tabela 5. Parâmetros dos resíduos empregados na biodigestão.....	33
Tabela 6. Produção de H ₂ e Estudo da cinética pela Equação de Gompertz.....	35
Tabela 7. Comparação entre os resultados experimentais e previstos pelo modelo para a produção de Hidrogênio.....	45
Tabela 8. Características dos substratos e efluente do reator acidogênico.....	47
Tabela 9. Resultados de produção de gás e parâmetros cinéticos obtidos para os diferentes tratamentos estudados.....	49
Tabela 10. Comparação entre os resultados experimentais e previstos pelo modelo para a produção de Metano.....	53
Tabela 11. Parâmetros cinéticos da biodigestão em 2 estágios.....	55
Tabela 12. Comparação do rendimento da biodigestão em dois estágios tendo manipueira como substrato.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS

ART – Açúcares redutores totais
BLAST - Basic Local Alignment Search Tool
BOD – Demanda biológica de oxigênio
CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência
CNTP – condições normais de temperatura e pressão
DNA – Ácido Desoxiribonucleico
DQO – Demanda química de oxigênio
LB – Luria Bertani
NCBI - *National Center for Biotechnology Information*
pH – Potencial hidrogeniônico
PCR - Reação de polimerização em cadeia
PDEE – Plano Decenal de Expansão de Energia
PVC – polivinilcarbonila
RART - Remoção de açúcares redutores totais
RNA – ácido ribonucleico
RDQO – remoção da demanda química de oxigênio
RST – remoção de sólidos totais
RSV – remoção de sólidos voláteis
ST – Sólidos totais
SV – Sólidos voláteis
TCD – Detector de condutividade térmica
TRH – Tempo de retenção hidráulica
UASB- Reator anaeróbio de fluxo ascendente
UV – Ultra Violeta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. OBJETIVOS.....	11
2.1. OBJETIVO GERAL.....	11
2.2. OBJETIVOS ESPECÍCOS.....	11
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
3.1. CENÁRIO ENERGÉTICO.....	12
3.2. BIODIESEL.....	13
3.3. GLICEROL.....	13
3.4. MANIPUEIRA.....	14
3.5. BIODIGESTÃO ANAERÓBIA.....	14
3.6. BIODIGESTÃO EM DOIS ESTÁGIOS.....	17
3.7. INÓCULO PARA BIODIGESTÃO.....	17
3.8. BIOGÁS.....	18
3.9. METANO.....	19
3.10. HIDROGÊNIO.....	19
3.11. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
4.1. SUBSTRATO PARA BIODIGESTÃO E INÓCULO.....	22
4.2. AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO INÓCULO.....	23
4.3. PARÂMETROS DE ENTRADA E DE SAÍDA DOS REATORES.....	24
4.4. CARACTERIZAÇÃO DO GÁS PRODUZIDO.....	25
4.5. MAXIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO.....	25
4.5.1. BIODIGESTORES DE ESTÁGIO ACIDOGÊNICO.....	25
4.5.2. BIODIGESTORES PARA ANÁLISE DOS EFLUENTES.....	26
4.5.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA MAXIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO.....	27
4.6. MAXIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE METANO EM BIODIGESTÃO DE DOIS ESTÁGIOS.....	30
4.6.1. 1º ESTÁGIO - BIODIGESTOR DE ESCALA PILOTO DE ESTÁGIO ACIDOGÊNICO OPERADO NAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS.....	30
4.6.2. 2º ESTÁGIO - BIODIGESTORES DE ESTÁGIO METANOGÊNICO.....	30

4.6.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA MAXIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE METANO	31
4.6.4. ESTUDO DA CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO E METANO OBTIDOS NA BIODIGESTÃO DE DOIS ESTÁGIOS.....	32
4.6.5. AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO DA BIODIGESTÃO EM DOIS ESTÁGIOS	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1. SUBSTRATOS PARA BIODIGESTÃO E INÓCULO	33
5.2. AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO INÓCULO	34
5.3. MAXIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO	34
5.3.1. COMPORTAMENTO DA ÁCIDEZ VOLÁTIL E CARGA ORGÂNICA DO EFLUENTES NOS BIODIGESTORES ACIDOGÊNICOS	40
5.3.2. PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO NAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS	43
5.4. MAXIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE METANO NA BIODIGESTÃO DE DOIS ESTÁGIOS	46
5.4.1. 1º ESTÁGIO - BIODIGESTOR DE ESCALA PILOTO DE ESTÁGIO ACIDOGÊNICO	46
5.4.2. CARACTERÍSTICAS DO EFLUENTE DO REATOR DE ESCALA PILOTO ..	47
5.4.3. 2º ESTÁGIO - BIODIGESTORES DE ESTÁGIO METANOGÊNICO	48
5.4.4. MAXIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE METANO	52
5.5. ESTUDO DA CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO E METANO OBTIDOS NA BIODIGESTÃO DE DOIS ESTÁGIOS.....	54
5.6. AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DA BIODIGESTÃO EM DOIS ESTÁGIOS	56
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
7. REFERÊNCIAS	59

1. INTRODUÇÃO

A elevada dependência das fontes fósseis de energia, sobretudo do petróleo e seus derivados, tem gerado nas últimas décadas um grande interesse de pesquisadores do mundo todo no desenvolvimento de tecnologias que visem cada vez mais a utilização de fontes renováveis de energia, dentre as quais tem ganho destaque a biomassa moderna. No Brasil, apesar da maior parte da demanda energética ser suprida por meio de energia hidrelétrica, que é caracterizada como uma fonte renovável de energia, o estudo de novas fontes energéticas tem crescido devido à preocupação com a constante baixa dos níveis dos reservatórios de água observados nos últimos anos.

Outro fator que tem alavancado os estudos destas fontes de energia é o crescente aumento da população mundial, da industrialização e das atividades agrícolas, uma vez que além proporcionar um aumento da demanda energética, tem contribuído também para a geração excessiva de resíduos orgânicos e inorgânicos (Gupta e Suhas, 2009).

Nesta perspectiva, a biodigestão anaeróbia tem sido utilizada como uma alternativa de minimização de um passivo ambiental provindo principalmente da agroindústria. O principal produto deste processo é o biogás, cujo poder calorífico pode variar de 5000 a 7000 kcal m⁻³ dependendo da porcentagem de metano presente (Oliver, 2008). Entretanto, este método de tratamento pode ser utilizado também para a geração de hidrogênio, que apresenta a vantagem frente ao metano de não liberar gases do efeito estufa na sua queima ou conversão de energia química em energia elétrica, além de possuir poder calorífico superior ao do metano.

Considerando esses aspectos, este trabalho propõe a otimização da produção de hidrogênio e de metano por biodigestão anaeróbia em dois estágios a partir de manipueira com adição de glicerol residual da produção de biodiesel.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como principal objetivo avaliar e maximizar a produção de hidrogênio e metano pelo processo de biodigestão anaeróbia em dois estágios empregando como substrato manipueira com adição de glicerol bruto.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para alcançar o objetivo principal do trabalho, foram definidos os seguintes objetivos específicos:

- Caracterização físico-química dos substratos e inóculo utilizado;
- Estudo microbiológica do inóculo utilizado por técnicas de biologia molecular;
- Produção e quantificação de hidrogênio e metano em reatores com operação em batelada;
- Estudo da cinética de produção de hidrogênio e metano;
- Determinação da mistura ótima de substratos e temperatura visando maximizar a produção de hidrogênio e de metano;
- Produção e quantificação de hidrogênio e metano em reator de dois estágios utilizando as melhores condições encontradas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. CENÁRIO ENERGÉTICO

A utilização da energia tem um papel fundamental na sociedade moderna, afetando os aspectos do desenvolvimento social, e sendo decisivo no sucesso econômico e ambiental (Amigun et al., 2008). Apesar da elevada dependência dos combustíveis fósseis, que foi agravada a partir da revolução industrial, a matriz energética brasileira tem se destacado devido a sua forte participação com fontes renováveis, com a energia hidrelétrica suprimindo cerca de 70 % da necessidade do país.

A necessidade em reduzir a utilização de combustíveis fósseis tem atraído atenção pelo fato da demanda de energia estar aumentando anualmente no mundo (BP, 2010- 2014). Neste cenário, o Brasil é visto como referência energética ambiental, possuindo inúmeras alternativas de produção de energia, elevada oferta de matéria-prima e capacidade de produção em larga escala (Morato et al., 2018; Bradsaw et al., 2019).

O estudo Plano Decenal de Expansão de Energia (PDEE, 2018), desenvolvido pela Empresa de Pesquisa Energética, aponta que, no Brasil, haverá uma participação das fontes renováveis de 48% em 2027 ante os 44% apresentados em 2017, contando ainda com um crescimento na oferta de energia, previsto até 2027, de 3,1% ao ano.

Neste sentido, a biomassa vem ganhando destaque pela sua possibilidade de conversão em uma variedade de formas de energia como calor, eletricidade, hidrogênio, metanol, etanol, biodiesel e biogás (Chynoweth et al., 2001).

Dentre as novas formas de biomassa, cita-se o biodiesel como biocombustível líquido que visa complementar a matriz energética brasileira através da sua mistura com o diesel petroquímico (Osaki e Batalha, 2011; Candeia et al., 2009).

Já o biogás é uma mistura de gases obtido a partir da biomassa através da biodigestão anaeróbia e composto majoritariamente por metano. É um biocombustível importante no controle e coleta de resíduos orgânicos e produção de biofertilizantes para uso na agricultura, além de ser um processo de baixa sofisticação (Chynoweth et al., 2001; Taleghani e Kia, 2005).

Entretanto, alterando alguns parâmetros durante a biodigestão anaeróbia o processo pode também ser utilizado para a produção gás rico em de hidrogênio (Gomes et al., 2014).

3.2. BIODIESEL

No processo de produção de biodiesel, ocorre a reação de óleos ou gorduras provenientes tanto de fontes vegetais quanto animais com um álcool de cadeia curta (usualmente metanol ou etanol), tendo como produtos da reação ésteres de ácidos graxos (biodiesel) e glicerol (Carmo et al., 2014).

A produção global de biodiesel tem crescido nos últimos anos. Em 2016, foram produzidos cerca de 31 milhões de m³ (Mm³), 7,5% a mais do que em 2015. Os principais países produtores em 2016 foram os Estados Unidos (5,5 Mm³), Brasil (3,8 Mm³), Alemanha (3,0 Mm³), Indonésia (3,0 Mm³) e Argentina (3,0 Mm³) (Ren21, 2017)

A OECD (Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico) estima que no futuro, a produção de biodiesel alcance 41 Mm³ em 2022, e que países como Argentina, Estados Unidos, Brasil, Tailândia e Indonésia continuem a liderar este mercado (OECD, 2013).

No Brasil, o principal obstáculo que dificulta o crescimento do biodiesel na sua matriz energética é o volume de glicerol produzido durante a sua obtenção (Adi et al., 2009; Silva et al., 2009). Enquanto a demanda estimada por glicerol no Brasil é de 30.000 toneladas por ano, em 2015 foram produzidas cerca de 250 mil toneladas de glicerol (Pit et al., 2019).

3.3. GLICEROL

Glicerol é um produto químico conhecido comercialmente como glicerina, que é incolor, inodoro e viscoso. É classificado como um álcool, de acordo com o IUPAC o nome 1,2,3 - propanotriol, com miscibilidade em todas as proporções com água. Possui natureza higroscópica provenientes dos três grupos hidroxil. O termo refere-se a um produto comercial (glicerina) com pureza acima de 95% (Pitt et al., 2019).

O glicerol resultante da reação transesterificação geralmente tem baixa pureza, e varia de acordo com os métodos de conversão e o tipo de álcool e catalisador utilizado. Ele também contém excesso de álcool, catalisador e resíduos de sabão, tornando-se um produto de baixo valor comercial com aplicações restritas e, portanto, geralmente é descartado como resíduos em aterros sanitários (Nurul et al., 2017).

Buscando tecnologias que utilizem o glicerol residual sem a necessidade de refino, vários pesquisadores têm utilizado este produto como aditivo em processos de biodigestão anaeróbia a substratos com menor carga orgânica, como água residual de suinocultura e manipueira, relatando incrementos significativos na produção de biogás (Serrano et al., 2014; Athanasoulia et al., 2014; Martín et al., 2013; Astals et al., 2013;

Rivero et al., 2014, Nartker et al., 2014), visto que o glicerol é uma molécula de alto conteúdo energético, com grande disponibilidade de carbono e hidrogênio, e que apresenta vantagens por ser altamente digerível e facilmente armazenável durante longos períodos de tempo.

3.4. MANIPUEIRA

A manipueira é o resíduo do processamento da mandioca por meio da prensagem da massa ralada durante a produção de farinha ou amido. É um resíduo líquido rico em macro e micronutrientes, como minerais e carboidratos, possuindo também concentrações significativas de glicosídeos cianogênicos, como a linamarina (Nasu et al., 2015; Cassoni e Cereda, 2011).

Para cada tonelada de raiz processada de mandioca, são gerados entre 250 e 420 litros de manipueira (Del Bianchi, 1998), cuja composição pode variar de acordo com a tecnologia utilizada no processamento da mandioca. O estado do Paraná é o principal produtor de mandioca da região sul e o segundo maior do país, perdendo apenas para o Pará. Nos últimos anos, a produção se manteve acima das 300 mil toneladas/ano (SEAB, 2012). Desta forma, um volume considerável de manipueira é produzido anualmente, tornando essencial o tratamento deste resíduo.

O processo de biodigestão anaeróbia de resíduos de mandioca é um método de tratamento atrativo devido ao alto teor de amido presente nestes efluentes (Glampracha et al., 2016), entretanto, a presença de cianeto tem efeito inibitório em alguns microrganismos que atuam no processo de biodigestão (Mekuto et al., 2016).

Neste sentido, Glampracha et al. (2016) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar o efeito da concentração de cianeto na codigestão de polpa de mandioca com resíduo de suinocultura. Os autores verificaram que o cianeto presente na polpa de mandioca foi metabolizado e degradado. Assim, o estudo concluiu que não houve qualquer efeito inibitório do cianeto contido na polpa de mandioca sobre os microrganismos presentes no resíduo suíno.

3.5. BIODIGESTÃO ANAERÓBIA

A biodigestão anaeróbia é um processo de tratamento de resíduos líquidos onde a partir da degradação da matéria orgânica são gerados como produto final um gás constituído principalmente de metano (CH₄) e dióxido de carbono (CO₂), um efluente

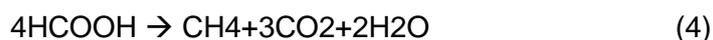
líquido de baixa carga orgânica, e o lodo que pode ser utilizado como biofertilizante (Demirer e Chen, 2005).

A biodigestão anaeróbia pode ser descrita como o consumo de matéria orgânica por diferentes microrganismos heterotróficos, até a última etapa de metanogênese, onde o biogás é liberado (Gabiatti et al., 2009)

De acordo com Cremones et al. (2019), as etapas envolvidas no processo de biodigestão são: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese. Na etapa de hidrólise o material particulado é transformado em compostos de menor peso molecular facilitando absorção pelas células. Na acidogênese, estes compostos reduzidos são absorvidos pelas células das bactérias fermentativas, e excretados como forma de ácidos graxos voláteis, alcoóis e ácido láctico, além de outras substâncias orgânicas simples. Na etapa de acetogênese, esses produtos oriundos da acidogênese formam os substratos para produção do metano, sendo eles o acetato, hidrogênio e dióxido de carbono. As principais reações que envolvem esta etapa estão apresentadas abaixo.



Finalmente ocorre o processo de metanogênese, onde o metano é produzido por bactérias acetotróficas, com a redução do ácido acético, ou pelas bactérias hidrogenotróficas com a utilização do CO_2 , neste caso, com o consumo do hidrogênio produzido na etapa anterior, conforme consta nas reações abaixo.



Na Figura 1 estão apresentadas as etapas metabólicas do processo de biodigestão.

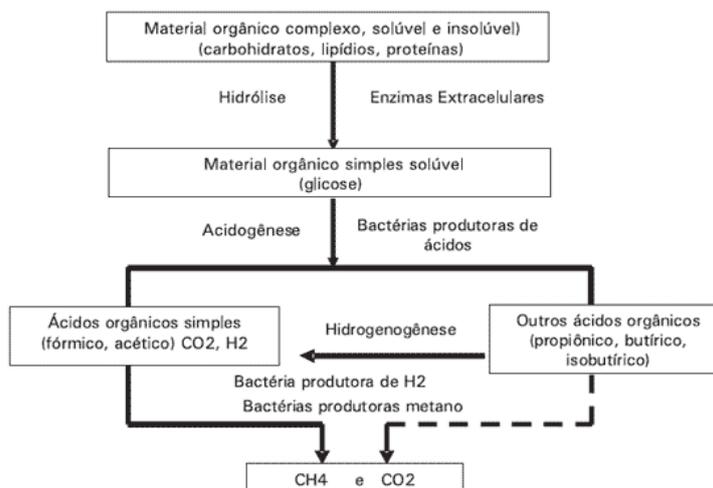


Figura 1. Etapas do processo de biodigestão anaeróbia. Fonte: Adaptado de Mao et al. (2015).

Desta forma, quando o produto de interesse é o hidrogênio, devem ser utilizados parâmetros operacionais que desfavoreçam a ação dos microrganismos metanogênicos, interrompendo a última fase do processo de biodigestão anaeróbia, onde pode haver o seu consumo para a formação de metano.

Um dos fatores mais importantes que interfere significativamente no processo de biodigestão é a razão entre a alcalinidade total e a acidez volátil do substrato, que pode ser medida indiretamente através do pH. Segundo Foresti (1998), o pH ótimo para a biodigestão anaeróbia visando a produção de metano é de 6,8 a 7,5, no entanto, o processo continua de forma eficiente num limite de pH entre 6 e 8, embora em taxa menos elevada. Moura (2012), afirma que em meios alcalinos, a atividade enzimática das bactérias é nula, enquanto que em meio ácidos, a fermentação produz hidrogênio.

Outro fator que afeta o processo de biodigestão de resíduos orgânicos é a temperatura (Cheunbarn e Pagilla, 2000). Segundo Salomon e Lora (2009), as faixas de temperatura associadas ao crescimento microbiano e eficiência do processo podem ser classificadas como: psicofílicas (< 20 °C); mesofílicas (20 – 40 °C); termofílicas (> 45 °C).

De maneira geral, em temperaturas medianas, a velocidade das reações biológicas é maior, resultando numa operação mais eficiente e um menor Tempo de Retenção Hidráulica (TRH). Desta forma, a temperatura ideal no processo de biodigestão visando produção de biogás se encontra na faixa mesofílica, entretanto, temperaturas na faixa termofílica propiciam a produção de hidrogênio por desfavorecer a etapa metanogênica do processo de biodigestão (Bond e Templeton, 2011).

3.6. BIODIGESTÃO EM DOIS ESTÁGIOS

No decorrer do processo de biodigestão anaeróbia, são produzidos os gases hidrogênio e metano, que são os componentes que agregam poder calorífico ao biogás. O hidrogênio entretanto, é um intermediário importante na degradação anaeróbia de matéria orgânica, que pode ser consumido na etapa final do processo (Liu et al., 2006).

Portanto, visando um alto rendimento de hidrogênio é necessário interromper o processo de digestão anaeróbia na etapa acidogênica (Silva et. al, 2018), e para que isso seja possível, devem ser estabelecidas condições de funcionamento favoráveis para as bactérias acidogênicas (Ntaikou et al., 2010).

No entanto, durante a etapa acidogênica, baixas quantidades de carga orgânica são consumidas, de modo que seus produtos metabólicos, como os ácidos orgânicos por exemplo, permanecem na fase líquida (Cooney et al., 2007; Schievano et al., 2012).

Desta forma, uma segunda etapa de tratamento pode ser combinada com a fase de produção de hidrogênio visando otimizar o uso da matéria orgânica remanescente (Silva et. al., 2018).

Neste contexto, a digestão anaeróbia em dois estágios tem sido identificada como um método promissor, uma vez que permite a redução da carga orgânica e aumenta a eficiência global de conversão de energia com a produção de dois gases com alto conteúdo energético (Liu et al., 2013).

Esta separação das etapas de acidogênese e metanogênese pode aumentar a estabilidade de todo o processo e controlar a fase de acidificação na produção de hidrogênio (primeira fase) e, conseqüentemente, impedindo a inibição da população metanogênica durante a fase de geração de metano (segunda etapa) (Fu et al., 2017).

3.7. INÓCULO PARA BIODIGESTÃO

A adição de inóculo ao substrato é uma prática comum em processos de biodigestão anaeróbia. O início operacional de um reator, ou partida, é de fundamental importância para o sucesso no tratamento de resíduos e na produção de biogás, estando diretamente ligado à sequência das transformações metabólicas no processo de biodigestão anaeróbia (Liu et al., 2016).

O inóculo utilizado é fator essencial no processo. Geralmente adiciona-se nos reatores algum substrato rico em microrganismos ativos.

Muitas culturas puras de bactérias podem ser empregadas para produzir hidrogênio e metano a partir de vários substratos (Wang & Wan, 2009^a), sendo que as bactérias do gênero *Clostridium* e *Enterobacter* são as mais empregadas na produção de hidrogênio (Wang & Wan, 2009^a; Li et al., 2017).

Atualmente no entanto, as culturas mistas de bactérias têm sido amplamente utilizadas como inóculo (Li et al., 2017). De forma geral, os processos fermentativos usando culturas mistas são mais práticos do que aqueles que usam culturas puras, pois são mais simples de operar, mais fáceis de controlar, e podem ter uma fonte mais ampla de matéria-prima (Wang & Wan, 2009^a; Li et al., 2017).

Para garantir a presença de bactérias adaptadas ao ambiente pode ser adicionado lodo proveniente de lagoas de tratamentos do mesmo substrato a ser tratado (Pedroza et al., 2010; Dal et al., 2016).

Entretanto, dejetos de animais, como suínos e bovinos, também vem sendo estudados, pois costumam ser excelentes inóculos (Zhang et al., 2016), uma vez que além de conter um consórcio de microrganismos, geralmente são ricos em nitrogênio e fósforo e isso representa uma ameaça ao meio ambiente, como eutrofização da água, poluição do ar e degradação do solo, mas pode-se mitigar estes impactos com aplicação da biodigestão (Godos et al., 2010).

3.8. BIOGÁS

Por muito tempo o biogás foi considerado um subproduto da decomposição de resíduos orgânicos em anaerobiose (ausência de oxigênio), entretanto, com a ocorrência de períodos de crise energética, passou a ser o foco de inúmeras pesquisas e conseqüentemente investimentos em sua cadeia produtiva (Salomon e Lora, 2009).

O biogás, pode ser amplamente utilizado como combustível, uma vez que possui composição volumétrica que varia de 55 a 70% de metano e 20 a 45% de dióxido de carbono, além de outros gases como 500-4000 ppm de sulfeto de hidrogênio, 100-800 ppm de nitrogênio amoniacal, hidrogênio, água e oxigênio em menores proporções (Kohn et al., 2014; Patel et al., 2016; Shan et al., 2016).

Este gás apresenta elevado poder calorífico pela presença do metano e hidrogênio, e pode ser obtido através de três diferentes rotas: combustão direta, gaseificação e processos de fermentação anaeróbia de compostos orgânicos, sendo que este último é o mais utilizado, com origem a partir de resíduos orgânicos, em sua maioria em fase líquida (Alves et al., 2013).

Segundo Coimbra-Araújo et al. (2014), pelo fato de os efluentes agroindustriais orgânicos e os resíduos do confinamento de suínos possuírem alto potencial para a produção deste biocombustível, a região Oeste do Estado do Paraná se destaca por ser detentora de enorme potencial para a produção de biogás.

O biogás pode ser direcionado para diversas aplicações, como: queima direta em caldeiras, aquecimento, cocção, promoção de movimento em motores de combustão interna, utilizados para movimentar meios de locomoção ou utilizar este para produzir energia elétrica para diversos fins (Kaur; Phutela, 2016).

3.9. METANO

Por ser um dos compostos que conferem poder calorífico ao biogás, o metano é de grande interesse e sua concentração está diretamente relacionada ao substrato utilizado no processo de biodigestão e com a eficiência do processo (Okudoh et al., 2014).

Conforme Alves (2013), a composição média do biogás varia de 55 % a 70 % de metano, assim, o poder calorífico do biogás também varia conforme sua composição, sendo aproximadamente de 22.500 a 25.000 kJ m⁻³, assumindo que o metano possua 35.800 kJ m⁻³ (Seman et al., 2019).

3.10. HIDROGÊNIO

O hidrogênio é o elemento químico mais leve conhecido, possuindo um único próton, um elétron e nenhum nêutron em sua forma estável mais comum (Cruz, 2010). Geralmente apresenta-se em sua forma molecular, formando o gás diatômico (H₂).

O H₂ possui grande poder calorífico, detendo a maior quantidade de energia por unidade de massa que qualquer outra substância conhecida (121.000 kJ/kg). Além disso, durante sua queima ou conversão em energia elétrica não são gerados gases causadores do efeito estufa como é o caso dos combustíveis fósseis e até mesmo do biogás.

A expectativa é que nas próximas décadas, o hidrogênio possa gerar energia para residências, comércios, indústrias e transporte. As suas principais vantagens são: apresentar uma densidade mássica superior a muitos outros combustíveis, não ser tóxico, produzir uma quantidade significativamente menor de poluentes atmosféricos

que os combustíveis fósseis, e ser obtido por uma fonte renovável podendo ser produzido “*on site*” (Gonzalez, 2008).

Além disso, o H₂ possui papel importante na indústria, sendo aplicado em diversos segmentos como insumo químico. A Tabela 1 contém as aplicações mais comuns do hidrogênio.

Tabela 1. Aplicações do Hidrogênio

Segmento Industrial	Aplicação
Petróleo	Dessulfurização e hidrocrackeamento
Farmacêutica	Fabricação de Sorbitol, utilizado em cosméticos, vitaminas, surfactantes
Alimentícia	Hidrogenação de óleos e saturação de gorduras
Energia	Fonte de energia térmica em queimadores ou como insumo de células a combustível

Fonte: Adaptado de Cruz (2010).

A obtenção de hidrogênio pode ser realizada a partir de várias fontes utilizando diferentes rotas de produção: através da eletrólise da água, reforma de petróleo, gaseificação de biomassa, e biodigestão anaeróbia de resíduos orgânicos (Parizzi, 2008). Desta forma, visando identificar o hidrogênio produzido através de processos biológicos, surgiu o termo Biohidrogênio.

3.11. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização dos combustíveis fósseis vem provocando uma poluição ambiental bastante severa, e serão cada vez mais escassos nas próximas décadas. Assim, é necessário encontrar fontes alternativas de energia que sejam renováveis e que tenham menor potencial poluidor (Wang & Wan, 2009^a).

Neste cenário, o hidrogênio é uma alternativa bastante viável, uma vez que pode ser obtido através de várias rotas químicas e biológicas e de diferentes matérias primas, o que o caracteriza como um combustível renovável (Hawkes et al., 2002, Kapdan et al., 2016).

Além disso, durante sua combustão para geração de energia, é formado apenas água, o que o torna bastante ecológico, não possuindo potencial poluidor (Kapdan et al., 2016).

Dentre os métodos utilizados para sua obtenção, a produção biológica via fermentação anaeróbia é um dos mais atrativos, uma vez que possui fácil operação,

baixo gasto energético por operar em temperaturas e pressões baixas, e ainda tem a vantagem do tratamento de resíduos orgânicos (Li et al., 2017).

Contudo, o tratamento dos resíduos durante a produção de hidrogênio não é eficiente, pois no meio líquido ainda estarão presentes uma grande quantidade de ácidos orgânicos, tornando possível um segundo estágio fermentativo, onde é obtido o metano (Liu et al., 2013).

Assim, visando contribuir com a diminuição da dependência dos combustíveis fósseis através do emprego do hidrogênio e metano contidos no biogás como fonte energética, foi realizado neste estudo a otimização da biodigestão anaeróbia em dois estágios, empregando como substratos dois efluentes agroindustriais gerados em grandes quantidades na região oeste do Paraná e com elevado potencial poluidor, a manipueira e o glicerol.

Um dos principais diferenciais deste trabalho, além de adotar um sistema de biodigestão em dois estágios, é o potencial de incremento na produção de hidrogênio e metano que pode ser obtido com a adição do glicerol, mesmo que em baixas concentrações.

O inóculo utilizado também difere este trabalho dos encontrados na literatura no tratamentos destes substratos, e como também é produzido em grandes quantidades no Paraná e não necessita de nenhum tratamento muito complexo, faz com que este estudo possa servir como guia para a aplicação da biodigestão anaeróbia em dois estágios em fecularias, onde o hidrogênio e metano produzidos podem ser utilizados na própria planta industrial para geração de energia.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

As etapas experimentais foram realizadas conforme fluxograma que consta na Figura 4.

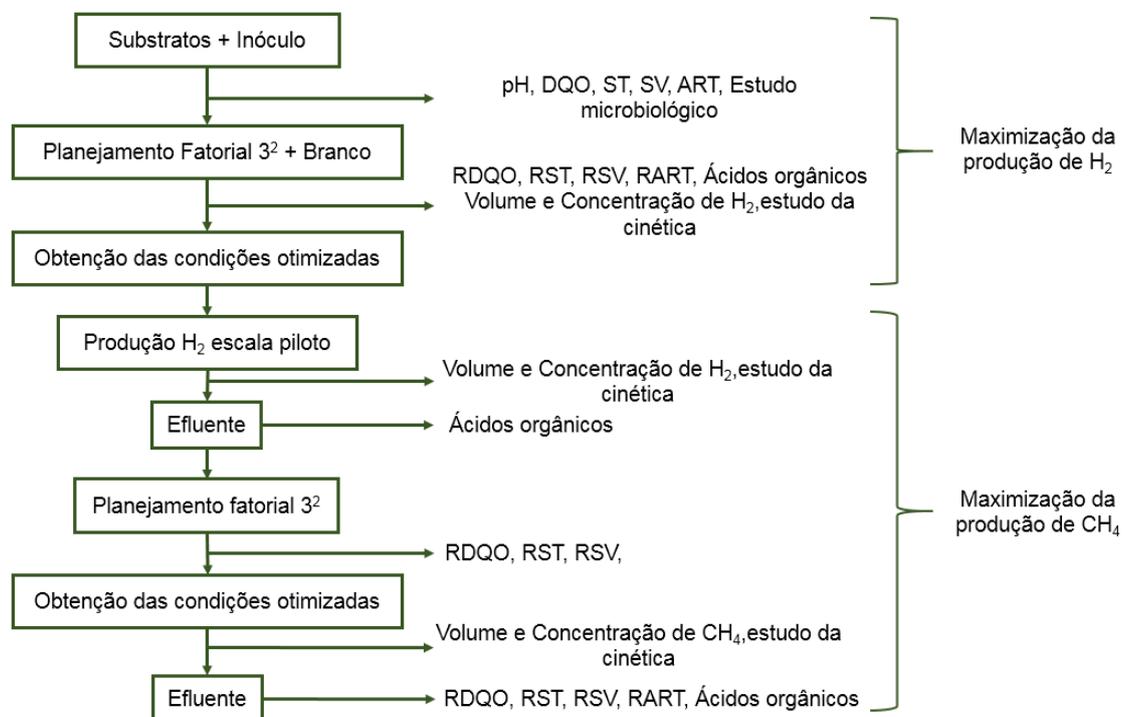


Figura 2. Fluxograma contendo as etapas experimentais do estudo.

4.1. SUBSTRATO PARA BIODIGESTÃO E INÓCULO

Para a realização dos experimentos foram utilizados como substratos: glicerol bruto e manipueira. O glicerol empregado é proveniente da produção de biodiesel com óleo residual da cocção de alimentos por catálise homogênea básica com hidróxido de sódio e metanol. Na reação de transesterificação foi utilizado 0,5 % em massa de catalisador e relação álcool/óleo de 6/1. Já a manipueira foi proveniente de uma indústria de processamento de mandioca localizada no município de Terra Roxa – PR.

O inóculo utilizado nos reatores foi obtido em biodigestor modelo canadense operado com resíduos líquidos de suinocultura de um matrizeiro de suínos com capacidade para 900 animais localizado na cidade de Palotina – PR.

O inóculo utilizado no reator acidogênico foi submetido a um tratamento térmico de 100 °C durante um período de 30 minutos, de modo a inibir o desenvolvimento de microrganismos produtores de metano, de acordo com recomendado por Chang et al.

(2011), Pendyala et al. (2012), Penteado et al. (2013).

Este processo é amplamente utilizado para o tratamento de microflora mista quando se tem interesse em bactérias produtoras de hidrogênio (Wong et al., 2014; Zumar Bundhoo et al., 2015)

4.2. AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO INÓCULO

Foi realizado um estudo dos microrganismos presentes no inóculo de água residual de suinocultura e que são potenciais produtores de hidrogênio e metano. Desta forma, o isolamento de microrganismos foi direcionado para aqueles que são anaeróbios e mesofílicos. Assim, foram inoculados 200 µL do inóculo em tubo de ensaio contendo 10 mL de meio LB (Luria Bertani) líquido e incubado em jarra de anaerobiose por 48 horas à 35 °C em estufa BOD para enriquecimento da amostra e seleção de microrganismos tolerantes a anaerobiose.

A partir desse cultivo, foram inoculados 100 µL em placas de Petri contendo meio LB ágar. As placas foram novamente incubadas em jarra de anaerobiose por 48 h à 35 °C. Após o cultivo as colônias isoladas foram purificadas pela técnica de esgotamento em novas placas em meio LB ágar por 48 h à 35 °C. A partir das colônias isoladas, as bactérias foram crescidas em meio LB líquido, novamente por 24 h a 35 °C para crescimento bacteriano suficiente para a extração de DNA.

Para a análise molecular foram centrifugados por 4 minutos à 13.000 rpm em temperatura ambiente 1,5 mL de meio LB de cada isolado para obtenção da massa de células para realizar a extração de DNA, utilizando-se o Kit de extração de DNA genômico Wizard (Promega®). Após a extração, o DNA foi quantificado por eletroforese em gel de agarose por comparação com 5 µL de DNA padrão ladder 100 pb.

A PCR (reação de polimerização em cadeia) para amplificação parcial do gene 16S rRNA, foi realizada com os *primers* universais 27F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) e 1492R (CGGTTACCTTGTTACGACTT) que tem se mostrado útil no estabelecimento de relações filogenéticas entre espécies de Eubactérias (WEISBURG *et al.*, 1991)

As condições de reação foram um passo de 95 °C por 2 min, seguido de 35 ciclos de 95 °C por 40 seg para desnaturação, 51 °C por 40 seg para anelamento dos *primers* e 72 °C por 1 minuto para a extensão, além de um passo final de 10 minutos a 72 °C. A reação de PCR com volume final de 30 µL foi realizada em termociclador *SimpliAmp* da marca *Applied Biosystems*.

As quantidades dos reagentes utilizados na PCR foram as recomendadas pelo fabricante da enzima Taq DNA polimerase e está representada a seguir: 3 µL de tampão

10X 1 μL de solução de dNTP (10 mM cada base), 0,5 μL de MgCl_2^{2+} (25 mM), 1 μL de cada um dos dois primers (10mM), 0,5 μL de Taq DNA Polimerase ($5\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), 3 μL de DNA ($10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) e H_2O ultrapura para completar o volume final. A confirmação da amplificação do gene ocorreu através da presença de uma banda de 1500 pb no gel de agarose 1% preparado com TBE 1X.

O produto do PCR foi purificado utilizando-se metodologia com PEG 8000 e preparado para envio para empresa de sequenciamento, utilizando-se o *primer* direto (F). As sequências foram analisadas com o algoritmo *nucleotide BLAST* (Basic Local Alignment Search Tool) no sítio do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) para encontrar sequências similares. As sequências selecionadas no BLAST foram utilizadas para o alinhamento e edição das bases sequenciadas incorretamente. Após a edição, as sequências foram analisadas novamente no BLAST para identificação molecular das espécies isoladas.

4.3. PARÂMETROS DE ENTRADA E DE SAÍDA DOS REATORES

A manipueira e o glicerol, foram submetidos às análises de potencial hidrogeniônico (pH), demanda química de oxigênio (DQO), sólidos totais (ST), sólidos totais voláteis (SV) e açúcares redutores totais (ART).

As análises foram realizadas no material de entrada de todos os reatores e também em seus efluentes, tornando possível a comparação e a avaliação da eficiência do processo de biodigestão anaeróbia das misturas. As metodologias empregadas nas análises estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Métodos empregados na determinação dos parâmetros físico-químicos.

Análise	Método
pH	Potenciométrico (4500-H* / APHA, 1995)
DQO	Colorimétrico (5220-D / APHA, 1995)
ST	Gravimétrico (2540-B / APHA, 1995)
SV	Gravimétrico (2540-E / APHA, 1995)
ART	Colorimétrico (2648-A / APHA, 1995)

Optou-se por realizar as análises de DQO, ST e SV pois estes parâmetros indicam a quantidade de carbono disponível para ser metabolizado pelos microrganismos.

Além destes parâmetros, foi realizada a quantificação dos ácidos orgânicos

presentes na fase líquida (acético, butírico, propiônico, fórmico e láctico) do experimento correspondente ao ponto central do planejamento fatorial empregado na maximização da produção de hidrogênio, uma vez que foi o tratamento com as maiores produções de hidrogênio do planejamento experimental. Esta análise foi realizada também nas melhores condições obtidas neste trabalho para a produção de hidrogênio e metano na biodigestão em dois estágios.

A análise foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em sistema Shimadzu® equipado com Coluna Aminex® HP-87H e detector UV com arranjo de diodos SPD-20A em comprimento de onda de 208 nm. A fase móvel foi composta por água ultrapura acidificada com 0,005 M (Penteado et al., 2013; Lazaro et al., 2012).

4.4. CARACTERIZAÇÃO DO GÁS PRODUZIDO

O gás foi coletado do sistema de biodigestores e gasômetros através de conexão, conforme ilustrado na Figura 2 E, e armazenado em ampolas gasométricas até a realização da análise.

A determinação da composição do biogás produzido em todos os reatores foi realizada por cromatografia gasosa em sistema Shimadzu® 2010, equipado com coluna capilar Carboxen® 1010 plot, utilizando argônio como gás de arraste. A temperatura do injetor foi ajustada para 200 °C e a detecção realizada em detector de condutividade térmica (TCD) à temperatura de 230 °C (Penteado et al., 2013).

4.5. MAXIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO

4.5.1. BIODIGESTORES DE ESTÁGIO ACIDOGÊNICO

O sistema de biodigestores e gasômetros utilizados para avaliar o efeito da temperatura e de glicerol na produção de hidrogênio foi construído conforme proposto por Cremonez (2016), e está ilustrado na Figura 3.

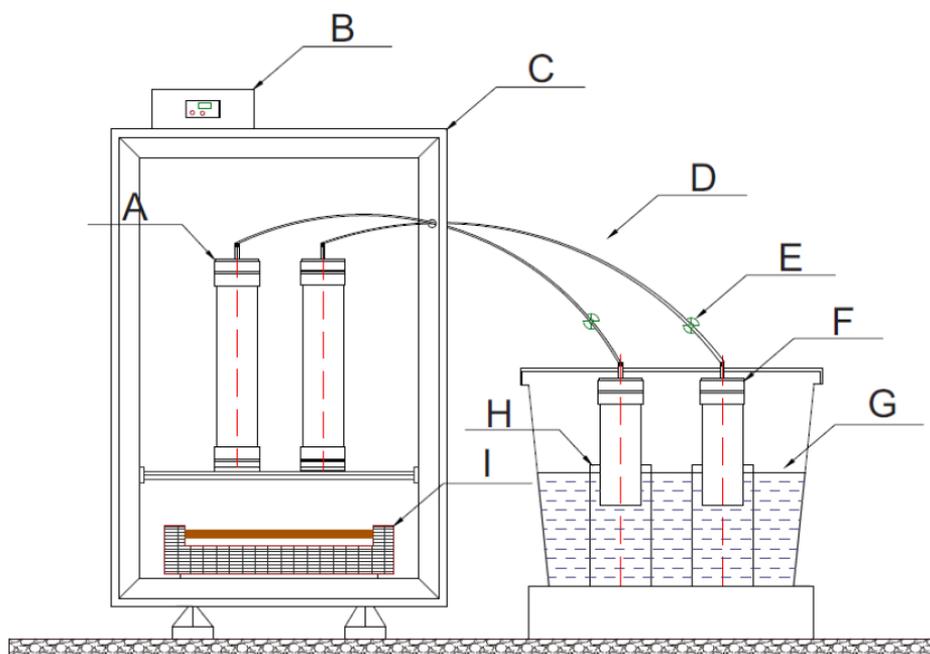


Figura 3. Esquema construtivo dos biodigestores e gasômetros, onde: A) reatores em PVC; B) Termostato para controle de temperatura; C) Estufa; D) Mangueira de silicone; E) Conexão para tomada de gás; F) Gasômetro em PVC; G) Selo de água; H) Guia dos gasômetros; I) Aquecedor. Fonte: Adaptado de Cremoniz et al (2015).

Os biodigestores foram confeccionados em material polietileno tereftalato com dimensões de 40 cm de altura e 8 cm de diâmetro, apresentando volume total de 2,00 L. O volume útil estipulado para o desenvolvimento do experimento foi de 1,6 L, mantendo-se volume morto de 20% do reator evitando que uma possível formação de espuma ou pressão causasse refluxo na saída de coleta de gás.

Os gasômetros foram confeccionados utilizando-se o mesmo material dos reatores, com dimensões de 30 cm de altura por 8 cm de diâmetro, apresentando volume útil de aproximadamente 1,50 L. Esses gasômetros foram imersos em selo de solução ácido salina de cloreto de sódio e de ácido sulfúrico, a fim de evitar o escape do gás produzido, além de impedir a dissolução do dióxido de carbono presente no biogás.

4.5.2. BIODIGESTORES PARA ANÁLISE DOS EFLUENTES

Para acompanhar o perfil de degradação inicial dos substratos, foram confeccionadas réplicas dos biodigestores usados para a produção de hidrogênio com volume total de 0,30 L contendo amostras de substrato mais inóculo, seguindo as mesmas proporções dos reatores anteriores e com 20% de volume morto, apresentando assim volume útil de 0,24 L. Esses reatores continham uma mangueira de saída de gás

imersa em uma solução aquosa onde o gás gerado borbulha de modo que oxigênio não entre no sistema.

Estas réplicas foram carregadas com substrato e inóculo nas mesmas proporções definidas no planejamento fatorial. Tanto os biodigestores utilizados nos experimentos de produção de hidrogênio quanto as réplicas utilizadas para a obtenção das amostras destrutivas foram dispostos em estufa com temperatura controlada de acordo com o delineamento experimental e com variação de $\pm 1,0$ °C, conforme ilustrado na Figura 4.

O tempo de retenção hidráulica utilizado foi de 90 horas, baseado no período em que a produção de biogás cessou.

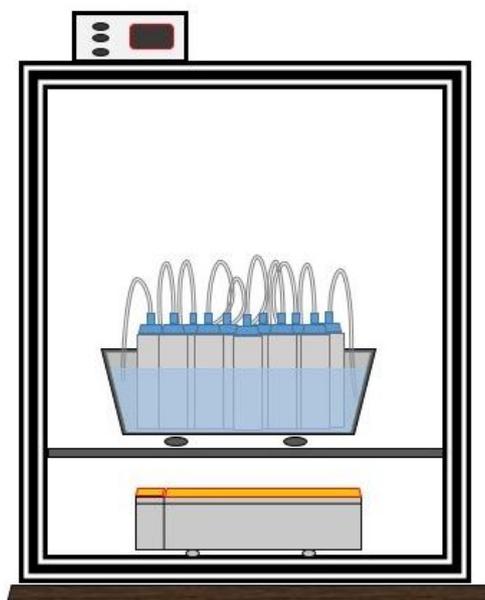


Figura 4. Esquema ilustrativo da estufa contendo os biodigestores para as amostras dos efluentes.

4.5.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA MAXIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO

Para a determinação das condições ótimas de produção de hidrogênio considerando as variáveis razão volumétrica de manipueira, glicerol e a temperatura foi realizado um planejamento fatorial 3^2 utilizando o Software Statistica v. 7.0. A soma dos componentes da mistura sempre foi igual a 1, ou 100 %, com a porcentagem de manipueira variando de 95 a 99 % e as porcentagens de glicerol residual de 1 a 5 %. A Tabela 3 contém a composição de cada um dos tratamentos realizados.

Tabela 3. Composição dos Tratamentos para produção de hidrogênio

Tratamento	Variáveis Codificadas		Variáveis Numéricas	
	G (%)	T (°C)	G (%)	T (°C)
1	-1	-1	1	37
2	-1	0	1	40
3	-1	1	1	43
4	0	-1	3	37
5	0	0	3	40
6	0	1	3	43
7	1	-1	5	37
8	1	0	5	40
9	1	1	5	43
Branco	-	-1	0	37
Branco	-	0	0	40
Branco	-	1	0	43

G- Glicerol; T- Temperatura.

Foram realizadas também 3 repetições no ponto central. Estes limites de concentrações foram definidos com base nos resultados encontrados na literatura para utilização do glicerol como aditivo em processos de biodigestão (Nartker et al., 2014; Silva et al., 2018; Astals et al., 2013; Serrano et al., 2014; Athanasoulia et al., 2014).

Já a temperatura, considerada um dos parâmetros que mais afeta o processo de biodigestão, variou de 37 a 43 °C, compreendendo temperaturas na faixa mesofílica e termofílica.

Além destes tratamentos, foi realizada a biodigestão da manipueira sem adição de glicerol residual nas mesmas temperaturas definidas no planejamento.

Foram avaliadas através do planejamento experimental as seguintes variáveis respostas: volume de hidrogênio produzido (mL), a concentração de hidrogênio (%), os parâmetros cinéticos da biodigestão (volume total de hidrogênio (mL), tempo de duração da fase lag (h) e velocidade específica máxima(h^{-1})), e as porcentagens de remoção de o teor inicial de açúcares redutores totais (ART), teor de sólidos totais (ST) e voláteis (SV), e demanda química de oxigênio (DQO)

Após a análise das variáveis respostas obtidas experimentalmente, utilizou-se a ferramenta de ajuste do software Statistica 7.0, para a obtenção da temperatura e porcentagem de glicerol de modo que se obtenha a maior produção de hidrogênio. Nesta etapa, foram consideradas apenas as variáveis resposta volume de hidrogênio

produzido e a concentração de hidrogênio.

Esta ferramenta permite a determinação das melhores condições de ajuste de processos, tornando possível a otimização simultânea de múltiplas respostas, minimizando-as, maximizando-as, ou buscando valores nominais de especificações, de acordo com a situação (Wang e Wan, 2009^b).

Essa função converte cada resposta em uma função individual de desejabilidade que varia de 0 a 1. Se a resposta for o valor mais desejável ela assume o valor de 1, caso contrário assume o valor de 0 e a resposta está fora da região aceitável. Assim, as variáveis independentes são escolhidas de modo a maximizar a desejabilidade global, que é dada pela média geométrica das desejabilidades individuais (Pimenta et al., 2014).

Uma vez obtidas as condições otimizadas, foram realizados ensaios em triplicata nestas condições a fim de se comparar os resultados experimentais com os previstos pelo modelo.

4.5.4. ESTUDO DA CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO

O modelo não linear de Gompertz (Equação 6), foi ajustado às cinéticas de produção de hidrogênio. Este modelo vem sendo utilizado recorrentemente para a descrição das cinéticas de produção de biogás em processos de biodigestão anaeróbia (Donoso et al., 2010; Li et al., 2012 Parameswaran et al., 2012), e recentemente empregado também para descrever a cinética de produção de hidrogênio (Silva et al., 2018).

$$M(t) = A \exp \left[-\exp\left(\frac{\mu_{max} H}{A} e(\lambda - t) + 1\right) \right] \quad (6)$$

Em que:

M – Volume de gás produzido (mL) em função do tempo (t).

A - volume máximo de gás (mL);

μ_{max} - velocidade específica máxima (mL.h⁻¹);

λ - tempo de duração da fase lag (h).

4.6. MAXIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE METANO EM BIODIGESTÃO DE DOIS ESTÁGIOS

4.6.1. 1º ESTÁGIO - BIODIGESTOR DE ESCALA PILOTO DE ESTÁGIO ACIDOGÊNICO OPERADO NAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS

O reator foi confeccionado em material policloreto de vinila, apresentando volume total de 65,0 L. O volume útil estipulado para o desenvolvimento do experimento foi de 50,0 L, mantendo-se volume morto de 20% do reator evitando que uma possível formação de espuma ou pressão causasse refluxo na saída de coleta de gás.

O reator foi disposto em estufa, com temperatura controlada e mantida na temperatura estabelecida como ideal, carregado com 10 L de inóculo e 40 L da mistura otimizada de substratos. Tanto a temperatura quanto a concentração de glicerol utilizadas nesta etapa foram definidas como ótimas para este processo através da ferramenta “desejabilidade” do software Statística 7.0.

O gasômetro foi confeccionado utilizando o mesmo material do reator, apresentando volume útil de aproximadamente 5,0 L. Esse gasômetro foi imerso em selo de solução ácido salina de cloreto de sódio e de ácido sulfúrico, a fim de evitar o escape do gás produzido, além de impedir a dissolução do dióxido de carbono presente no biogás.

4.6.2. 2º ESTÁGIO - BIODIGESTORES DE ESTÁGIO METANOGÊNICO

Os biodigestores foram confeccionados em material polietileno tereftalato, apresentando volume total de 2,50 L. O volume útil estipulado para o desenvolvimento do experimento foi de 2,0 L, mantendo-se volume morto de 20% do reator.

Os gasômetros foram confeccionados utilizando-se o mesmo material dos reatores, apresentando volume útil de aproximadamente 1,50 L. Esses gasômetros também ficaram imersos em selo de solução ácido salina de cloreto de sódio e de ácido sulfúrico.

Os reatores foram dispostos em estufa, com temperatura controlada, e carregados com 0,4 L de inóculo e 1,6 L do efluente do biodigestor acidogênico.

4.6.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA MAXIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE METANO

Uma vez que o efluente de reatores acidogênicos se encontram com valores de pH e concentração de ácidos orgânicos voláteis em faixas indadequadas para a etapa metanogênica, foi realizado um planejamento fatorial 3^2 utilizando o Software Statistica v. 7.0 visando determinar não só a temperatura ideal para este estágio, mas também a concentração ideal de bicarbonato de sódio, que atua como um tampão, maximizando a produção de metano. Nos experimentos, as temperaturas empregadas foram de 36,0; 37,5; e 39,0; enquanto que o bicarbonato foi adicionado nas concentrações de 2, 4 e 6 g.L⁻¹. A Tabela 4 contém as condições experimentais empregadas em cada um dos tratamentos.

Tabela 4. Condições experimentais dos Tratamentos para produção de metano

Tratamento	Variáveis Codificadas		Variáveis Numéricas	
	B (g.L ⁻¹)	T (°C)	B (g.L ⁻¹)	T (°C)
1	-1	-1	2	36
2	-1	0	2	37,5
3	-1	1	2	39,0
4	0	-1	4	36,0
5	0	0	4	37,5
6	0	1	4	39,0
7	1	-1	6	36,0
8	1	0	6	37,5
9	1	1	6	39,0

B- Bicarbonato de Sódio; T- Temperatura.

Foram avaliadas através do planejamento experimental as seguintes variáveis resposta: o volume de metano produzido, a concentração de metano, os parâmetros cinéticos da biodigestão (volume total de metano, tempo de duração da fase lag e velocidade específica máxima), e as porcentagens de remoção de sólidos totais (ST) e voláteis (SV), além da demanda química de oxigênio (DQO).

Após a análise das variáveis respostas obtidas experimentalmente, utilizou-se a ferramenta de ajuste do software Statistica 7.0, para a obtenção da temperatura e concentração de bicarbonato de sódio de modo que se obtenha a maior produção de metano, foram utilizadas todas as variáveis respostas nesta etapa. Uma vez obtidas as condições otimizadas, foram realizados ensaios em triplicata nestas condições a fim de se comparar os resultados experimentais com os previstos pelo modelo.

4.6.4. ESTUDO DA CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO E METANO OBTIDOS NA BIODIGESTÃO DE DOIS ESTÁGIOS

O modelo não linear de Gompertz (Equação 6), foi ajustado às cinéticas tanto de produção de hidrogênio no biodigestor acidogênico de escala piloto, quanto de produção de metano no biodigestor de fase metanogênica, ambos operando nas condições ideais determinadas neste estudo.

A partir dos resultados obtidos nestes biodigestores, foi plotado o gráfico de cinética de produção de biogás por unidade de volume útil do biodigestor. Para isso, foi utilizado a equação bisigmoidal de Gompertz (Equação 7), que consiste na soma de duas equações de Gompertz, a primeira correspondendo ao biogás produzido durante fase acidogênica, e a segunda ao biogás produzido durante a fase metanogênica.

$$M(t) = A_H \exp \left[-\exp \left(\frac{\mu_{maxH}}{A_H} e(\lambda_H - t) + 1 \right) \right] + A_M \exp \left[-\exp \left(\frac{\mu_{maxM}}{A_M} e(\lambda_M - t) + 1 \right) \right] \quad (7)$$

Em que:

M – Razão entre Volume de Biogás produzido e o volume do biodigestor (mL.L^{-1}) em função do tempo (t).

A_H - volume máximo de biogás produzido no biodigestor acidogênico (mL);

μ_{maxH} - velocidade específica máxima de biogás no biodigestor acidogênico ($\text{mL.dia}^{-1}.\text{L}^{-1}$);

λ_H - tempo de duração da fase lag do biodigestor acidogênico (dia).

A_M - volume máximo de biogás produzido no biodigestor metanogênico (mL.L^{-1});

μ_{maxM} - velocidade específica máxima de biogás no biodigestor metanogênico ($\text{mL.dia}^{-1}.\text{L}^{-1}$);

λ_M - tempo de duração da fase lag do biodigestor metanogênico (dia).

4.6.5. AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO DA BIODIGESTÃO EM DOIS ESTÁGIOS

Os cálculos da avaliação de desempenho do processo foram semelhantes aos relatados anteriormente por Patcharee et al. (2014) e Freda et al. (2007). Os rendimentos de H_2 e CH_4 foram determinados com base no volume de gás produzido por massa de DQO removida.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. SUBSTRATOS PARA BIODIGESTÃO E INÓCULO

Na Tabela 5 são apresentados os resultados da caracterização inicial dos substratos e inóculo utilizados nos experimentos. O pH da manipueira, componente majoritário das misturas testadas, apresentaram valores que indicam acidez do meio reacional, sendo considerado apropriada para digestão focada na produção de hidrogênio. Valores de pH na faixa de 5-6 são considerados por Guo et al. (2010) ideais para evitar a fase metanogênica e aumentar a geração de hidrogênio. Valores nesta mesma faixa também foram utilizados por Silva et al. (2018) na produção de hidrogênio a partir de resíduos de alimentos, lodo de esgoto e glicerol em reator de duas fases, sendo que nestes casos foi necessário o ajuste do pH .

Tanto a manipueira quanto o glicerol são efluentes líquidos que possuem estruturas químicas de fácil acesso e degradação por meio de microrganismos acidogênicos. Além disso, apresentam elevado percentual de sólidos voláteis dentre a fração total de sólidos (93,6% e 90,3%, respectivamente). Essas características são adequadas por favorecerem o acesso dos microrganismos e enzimas hidrolases aos compostos orgânicos e rápida degradação desses compostos em ácidos voláteis. O baixo valor do parâmetro Demanda Química de Oxigênio da manipueira torna o glicerol um aditivo extremamente importante, pois garante a quantidade necessária de carbono para suprir a deficiência deste componente na manipueira.

Tabela 5. Parâmetros dos resíduos empregados na biodigestão

Parâmetro	Manipueira	Glicerol	Inóculo
pH	5,4	8,1	7,2
DQO (g.L⁻¹)	5,2 ± 0,4	876,0 ± 1,2	0,3 ± 0,1
ST (%)	6,3 ± 0,2	68,3 ± 0,4	2,1 ± 0,2
SV (%)	5,9 ± 0,3	61,7 ± 0,6	0,3 ± 0,1
ART (%)	6,1 ± 0,2	-	-

Os valores são médias seguidas de seus respectivos desvios padrão. pH – Potencial Hidrogeniônico; DQO – Demanda Química de Oxigênio; ST – Sólidos Totais; SV – Sólidos Voláteis; ART – Açúcares Redutores Totais.

5.2. AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO INÓCULO

Com relação a avaliação microbiológica do inóculo, foram isoladas quatro espécies de bactérias distintas. Após extração do DNA, foi possível a amplificação do gene 16S das quatro espécies. Os fragmentos amplificados apresentaram aproximadamente 1500 pb de comprimento, sendo que no sequenciamento foram obtidas sequências que variaram de 878 a 889 pb.

A análise do sequenciamento revelou que das quatro bactérias isoladas, três pertencem ao Gênero *Bacillus* e uma ao Gênero *Brevundimonas*.

Uma das espécies pertence ao sub grupo do *Bacillus subtilis*, com 100% de identidade com *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. velezensis* e *B. siamensis*. Enquanto que a outra pertence ao sub grupo do *Bacillus cereus*, apresentando 100% de identidade com *B. cereus*, *B. thuringiensis* e *B. anthracis*.

Estas espécies de *Bacillus* possuem a capacidade de competir com outros microrganismos para produzir moléculas bioativas, tais como acil-Homosserina lactonases, que em última análise, contribui para sua sobrevivência, quando as culturas mistas são usadas no tratamento de efluentes orgânicos, sendo produzido durante seu metabolismo ácidos orgânicos, com a liberação de hidrogênio (Kumar et al., 2015).

Foi identificada também a espécie *Bacillus licheniformis* (100% de identidade), bactéria que tem sido empregada como inóculo na forma isolada para a produção de hidrogênio por biodigestão anaeróbia, tendo se mostrado um inóculo com potencial para produção de hidrogênio a nível industrial (Srivastava et al., 2017).

Foi identificado ainda, com 100% de identidade, uma espécie do gênero *Brevundimonas*, podendo ser *B. naejangsanensis* ou *B. diminuta*. Foram encontrados relatos da produção de hidrogênio utilizando a espécie *B. diminuta* ao se realizar a fermentação em consórcio com bactérias do gênero *Bacillus* (Bao et al., 2013). Entretanto, não foram encontrados relatos da utilização de *B. naejangsanensis* na produção biológica de hidrogênio.

5.3. MAXIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO

O planejamento fatorial utilizado neste trabalho resultou em 9 tratamentos de diferentes composições, mais a repetição em triplicata do ponto central (tratamento 5). O valor de F_{tabelado} de Snedecor a um nível de 5% de probabilidade para este planejamento é de 4,95. Os resultados obtidos para o volume e concentração de

hidrogênio produzidos, bem como os parâmetros cinéticos obtidos através da equação de Gompertz são apresentados na Tabela 6.

De modo geral, todos os tratamentos com adição glicerol obtiveram incrementos na produção de hidrogênio, o mesmo comportamento foi verificado por Silva et al. (2018) em uma mistura de resíduo alimentar, glicerol e lodo de esgoto como inoculo. Considerando o tratamento com maior produção volumétrica deste gás, o tratamento 5, o volume produzido foi 4,5 vezes o obtido na mesma temperatura mas sem a adição de glicerol. Considerando o volume de resíduos utilizados nos experimentos, a produção de hidrogênio variou entre 168,0 e 864,6 mLH₂·L_{resíduo}⁻¹.

Tabela 6. Produção de H₂ e estudo da cinética pela equação de Gompertz

Tratamento	Condições		Produção hidrogênio		Cinética		
	G (%)	T (°C)	V (mL)	C (%)	A (mL)	μ _{max} (mL.h ⁻¹)	λ (h)
1	1	37	986,4	25,6	988,8	45,1	18,0
2	1	40	1034,6	25,3	1029,6	49,1	18,7
3	1	43	713,8	28,7	715,9	22,9	12,5
4	3	37	1022,0	46,3	1019,1	48,2	18,2
5	3	40	1106,7 ± 13,1*	42,8 ± 1,5*	1106,1 ± 19,6*	51,9 ± 0,8*	18,9 ± 0,4*
6	3	43	882,7	36,8	886,2	41,8	18,3
7	5	37	930,0	45,3	941,8	31,3	15,3
8	5	40	1091,6	44,6	1086,4	37,9	16,5
9	5	43	750,4	31,2	753,2	21,5	10,9
Branco	0	37	215,1 ± 10,5*	25,6 ± 0,7*	228,1 ± 13,4*	16,4 ± 0,4*	9,0 ± 0,2*
Branco	0	40	243,5 ± 11,2*	25,3 ± 0,7*	248,4 ± 9,1*	17,6 ± 0,3*	9,1 ± 0,2*
Branco	0	43	233,0 ± 18,3*	28,7 ± 0,8*	241,8 ± 11,8*	17,1 ± 0,3*	9,0 ± 0,1*

G- glicerol, T- temperatura, C- concentração volumétrica, V- volume de hidrogênio. Os valores com (*) são médias seguidas de seus respectivos desvio padrão.

Não foi verificada a produção de metano em nenhum dos tratamentos.

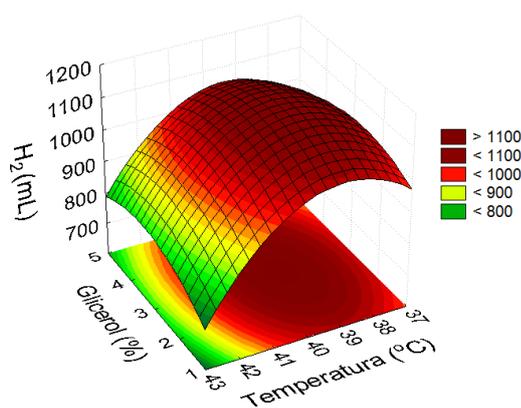
Os maiores volumes de hidrogênio foram obtidos utilizando temperaturas de até 40 °C, contudo os menores tempos de duração da fase lag foram observados nos tratamentos realizados a 43 °C. Já no que se refere a concentração deste componente no biogás, os melhores resultados foram verificados em temperaturas mais baixas,

sendo os experimentos realizados a 37°C os que obtiveram percentuais mais elevados. A Figura 5 apresenta as superfícies de respostas para estes quatro parâmetros.

A concentração máxima obtida de hidrogênio foi de 46,3% no tratamento 4, que continha 3% de glicerol residual, entretanto este aumento na concentração pela adição de glicerol foi inferior ao relatado por Silva et al. (2018), onde foram obtidas concentrações de 56,4 e 54,0 % ao adicionar 1 e 3% de glicerol em uma mistura de resíduo alimentar com lodo de esgoto.

Cremones (2016) ao realizar a produção de biogás utilizando polímero a base de fécula de mandioca, glicerol e inóculo de água residual de suinocultura alcançou as maiores produções ao utilizar 1% de glicerol como aditivo. Em concentrações mais elevadas de glicerol (3 e 5 %) ocorreu um acúmulo de ácidos voláteis no reator com a consequente redução do pH, cessando o processo de biodigestão.

Produção de Hidrogênio



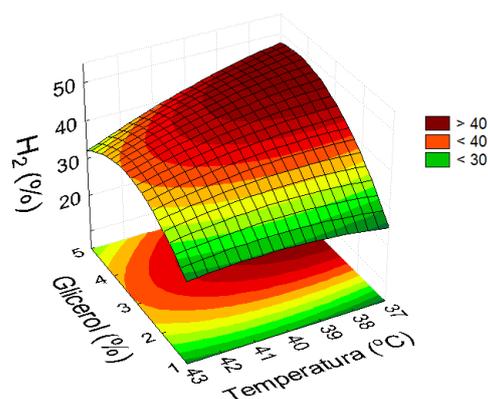
A

$$H_2 = -29610,9G^2 - 45,3G - 17,8G^2 + 1572,1T^2 - 20,2T^2 + 3,8GT$$

$$R^2 = 0,96$$

$$F_{\text{calculado}} = 28,08$$

Concentração de Hidrogênio



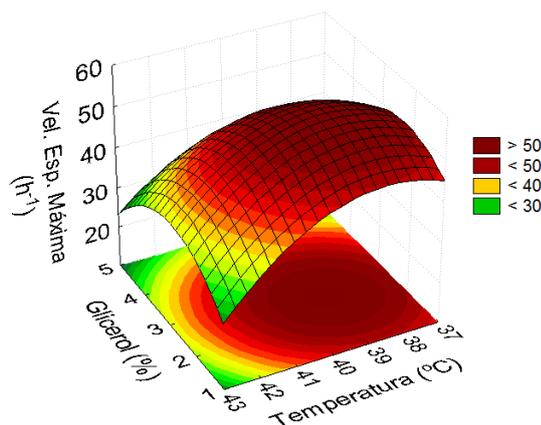
B

$$H_2 = -337,7G^2 + 44,6G - 2,1G^2 + 16,5T - 0,2T^2 - 0,7GT$$

$$R^2 = 0,95$$

$$F_{\text{calculado}} = 7,01$$

Velocidade Específica Máxima

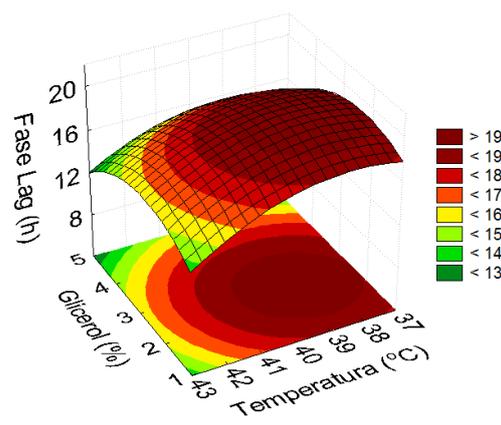


C

$$\mu_{\max} = -1599,79^* - 5,00G - 2,87 G^{2^*} + 85,27 T^* - 1,11T^{2^*} + 0,50GT^* \quad R^2 = 0,95$$

$$F_{\text{calculado}} = 99,60$$

Tempo de Fase Lag



D

$$z = -330,54^* + 0,02G - 0,65G^{2^*} + 18,08T^* - 0,23T^{2^*} + 0,08GT \quad R^2 = 0,83$$

$$F_{\text{calculado}} = 8,16$$

Figura 5. Superfície de resposta para: A- produção de hidrogênio B- Concentração C- Velocidade específica máxima D- tempo de duração da fase lag. Em que: T= temperatura (°C) e G = glicerol (%) Os termos com asterisco sobrescrito referem-se aqueles que foram significativos a um nível de 5%.

Todos os parâmetros apresentaram decréscimo com a elevação da temperatura acima dos 41 °C. Mu et al. (2006), digerindo substratos ricos em glicose observaram que a taxa de crescimento microbiano se elevou quando a temperatura foi modificada de 33 °C para 41 °C, com tendência semelhante na produção específica de hidrogênio, sendo que em temperaturas mais elevadas ocorreu uma redução de forma acentuada. A queda da produtividade pode ser resultado da desnaturação de enzimas microbianas, causando morte dos microrganismos (Arimi et al., 2015).

Corroborando com isso, Roy et al. 2012 afirmam que elevadas temperaturas proporcionam baixo rendimento na produção de hidrogênio se comparado a produção em fases mesofílicas pois poucas espécies de microrganismos têm capacidade de produzir em condições termofílicas.

A Figura 6 contém as cinéticas ajustadas ao modelo estão agrupadas de acordo com a temperatura empregada no processo.

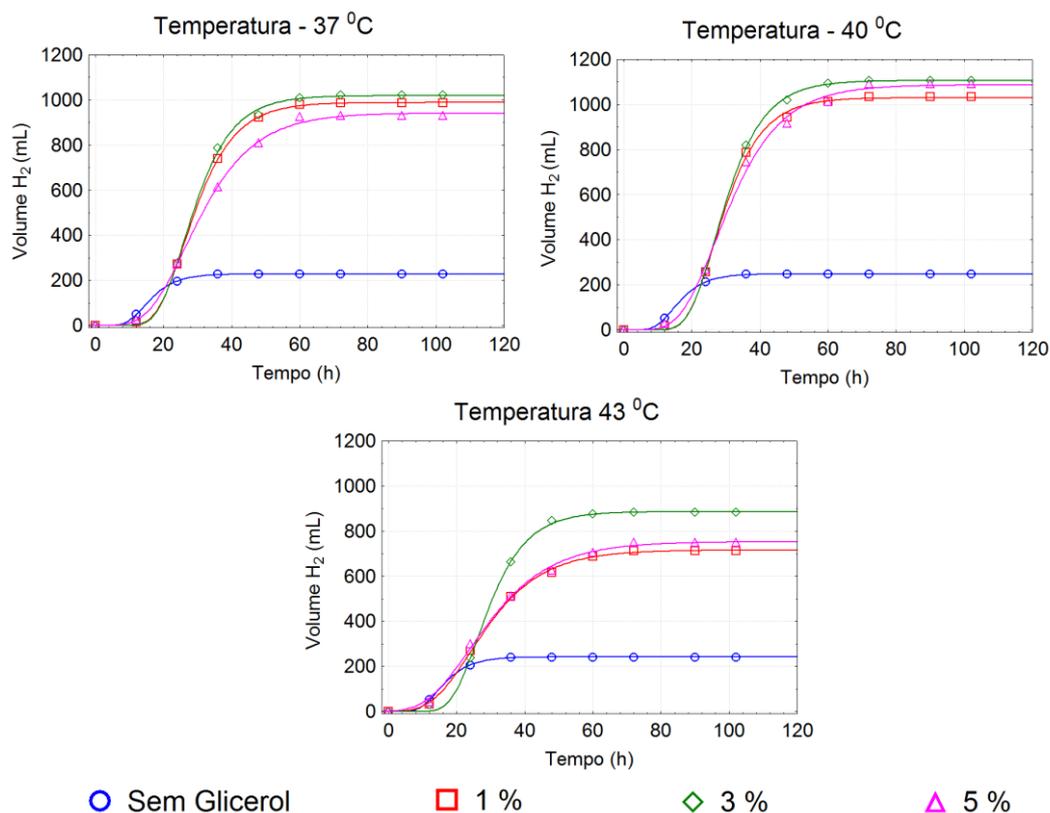


Figura 6. Cinética de Produção de hidrogênio em temperatura constante.

No que diz respeito ao ajuste do modelo de Gompertz aos dados experimentais, todos os tratamentos obtiveram valores de R^2 superiores a 0,99, a Figura 7 contém as cinéticas que apresentaram o melhor e o pior ajuste aos dados experimentais, sendo o tratamento 1 e 8, respectivamente.

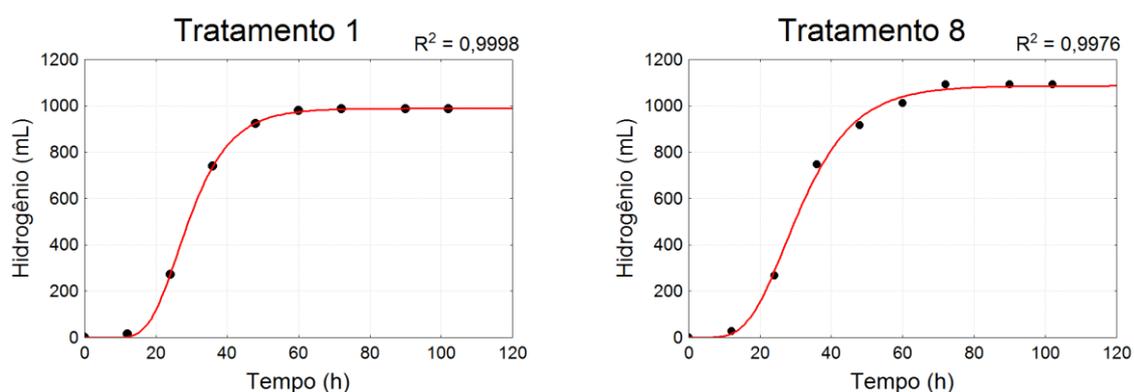


Figura 7. Tratamentos que obtiveram o melhor e o pior ajuste do modelo de Gompertz.

As bactérias acidogênicas apresentam rápida estabilização e adaptação se comparados a microrganismos metanogênicos. Todos os tempos de fase lag foram inferiores a 20 h desde o início do processo, isso garante a elevada atividade dos micro-

organismos, que pode resultar em elevada produção de hidrogênio ainda no primeiro dia de digestão. A estabilização do processo em 50 h também é decorrente da característica do resíduo empregado na atual pesquisa. A manipueira é um resíduo que apresenta composição simples, alto teor de sólidos voláteis e açúcares redutores como o amido, fazendo com que sua assimilação pelas células microbianas e conversão em ácidos voláteis seja facilitada.

Apesar de estabilização do processo em aproximadamente 2 dias de biodigestão, o tempo de estabilização obtido neste trabalho é muito superior a outros estudos encontrados em literatura.

Mu et al. (2006) realizando digestão de glicose em fase mesofílica, atingiu estabilização da produção de hidrogênio antes das 15 h de digestão. Wang et al. (2016), analisando efluentes de amido de milho, utilizando cultura mista e temperatura de operação de 37 °C, obtiveram estabilização na produção em tempo inferior a 30 horas de digestão.

Valores semelhantes foram obtidos em outros trabalhos que empregaram compostos mais complexos como substrato, tais como materiais lignocelulósicos. Trabalho de Akobi et al. (2016), digerindo hidrolisados obtidos de biomassa de madeira em diferentes estágios, obtiveram estabilização na produção de hidrogênio em aproximadamente 50 h de digestão. Kannah et al. (2018), realizando digestão de palha de arroz, obteve tempo de fase de latência de 12 h, além disso, o rendimento da produção de gás aumenta até atingir a estabilização no quinto dia de digestão.

Já trabalho de Faber e Ferreira-Leitão (2016), otimizando a produção de hidrogênio utilizando glicerol residual da produção de biodiesel, obtiveram rendimento máximo após 20 horas de incubação.

Muitos estudos voltados a produção de hidrogênio por digestão anaeróbia são realizados em processos de regime contínuo. Esses regimes apresentam como vantagem a possibilidade do aumento da eficiência das taxas de digestão e produção de biogás, reduzindo os tempos de retenção hidráulica (TRH).

No trabalho de Dinesh et al. 2018, foi realizada uma revisão de literatura sobre os diversos aspectos da produção de hidrogênio citando trabalhos com TRHs que variaram de 1,3 até 9 dias. Já o trabalho de revisão realizado por Arimi et al. (2015) apresenta estudo de casos onde os TRH são inferiores a 1 h.

5.3.1. COMPORTAMENTO DA ÁCIDEZ VOLÁTIL E CARGA ORGÂNICA DO EFLUENTES NOS BIODIGESTORES ACIDOGÊNICOS

A produção de ácidos voláteis é um importante indicador que deve ser acompanhado para compreensão das rotas bioquímicas e eficiência do processo de digestão anaeróbia. A partir da Figura 8, pode-se visualizar o comportamento da geração de ácidos voláteis no biodigestor referente ao ponto central do planejamento experimental obtido a partir da análise das amostras destrutivas em 6, 12, 24 e 48 h de digestão.

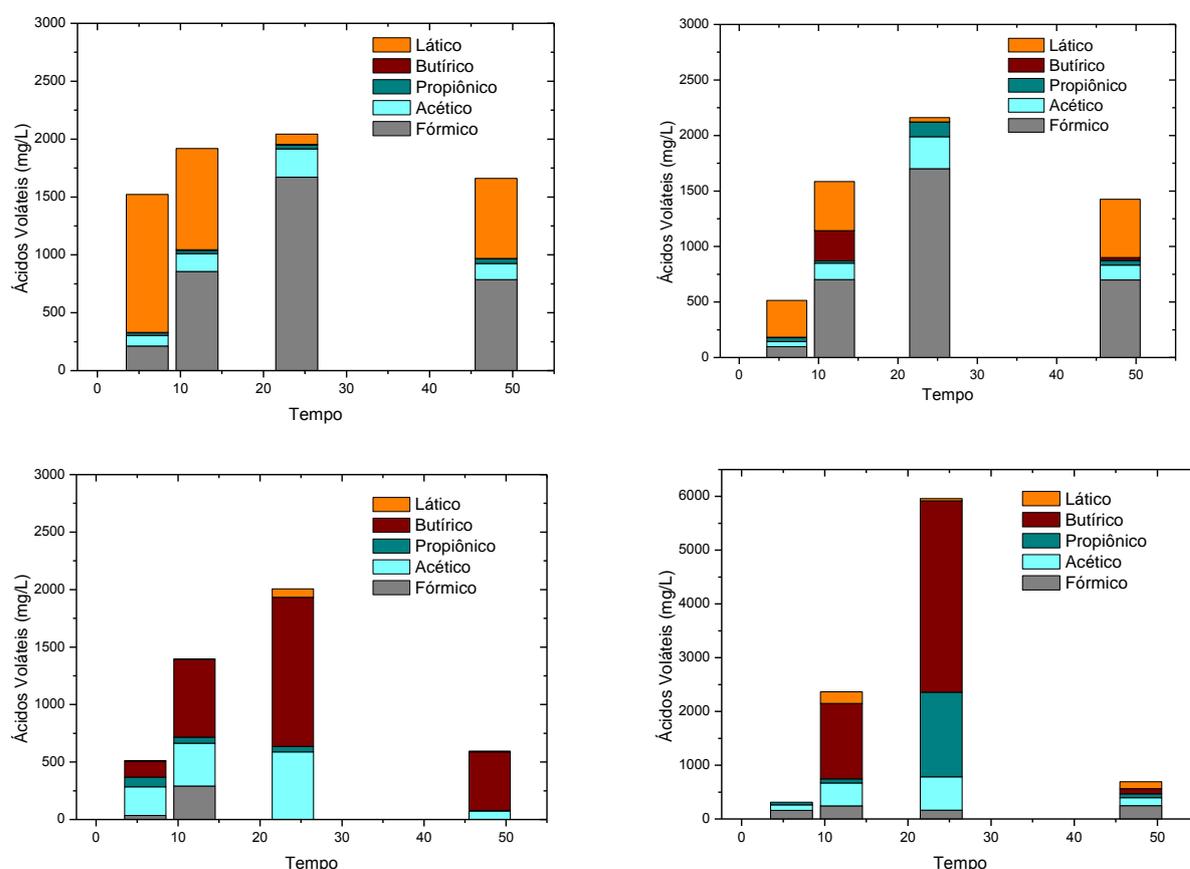


Figura 8. Perfil de produção de ácidos voláteis nos tratamentos realizados a 40 °C: 0% glicerol (superior esquerda); 1% glicerol (superior direita); 3% glicerol (inferior esquerda); 5% glicerol (inferior direita).

Nos reatores sem a adição de glicerol e com adição de 1%, visualiza-se nas primeiras 24 horas o consumo do ácido láctico e produção crescente do ácido fórmico. O ácido láctico é um precursor do ácido propiônico, que indica sobrecarga no sistema apesar de sua reação gerar hidrogênio molecular (Zhang et al., 2003). Isso ocorre porque além da degradação do ácido butírico, é necessária a conversão do ácido

propiónico gerado em ácido acético para se obter o produto final da digestão da fase acidogênica.

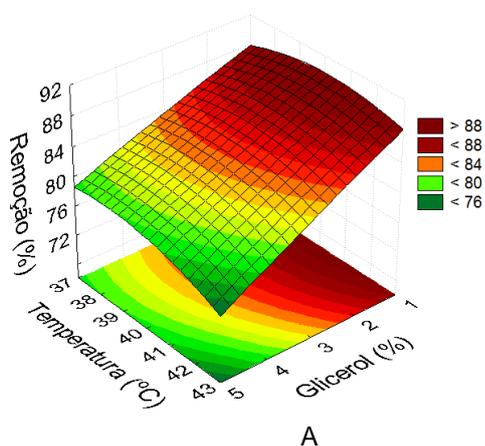
Constata-se a partir dos dados analisados, para os tratamentos de maiores concentrações de glicerol (3% e 5%), elevadas produções de ácido propiónico e butírico, com valores extremamente altos até o fim do primeiro dia de digestão, decaindo consideravelmente a partir de 48 h. Níveis de ácido acético também são visualizados em maiores proporções nesses tratamentos. Alguns trabalhos expressam que teores elevados de ácidos propiónico e butírico se relacionam positivamente com a produção de hidrogênio, além de inibir o desenvolvimento de culturas metanogênicas, que eventualmente consumiriam o hidrogênio molecular para geração de metano (Yokoi et al., 1998; Close et al., 2017; Zhipeng et al., 2018).

Desta forma, as altas concentrações desses ácidos, se relacionam diretamente ao fato de que as maiores produções de hidrogênio molecular foram encontradas nos tratamentos com maiores adições de glicerol. A formação de ácido acético nesses tratamentos também está relacionado com a geração de hidrogênio molecular. Esse ácido é produzido principalmente a partir da reação de consumo do ácido propiónico, constatando-se no perfil dos tratamentos que a concentração de ácido acético se eleva mediante diminuição da concentração de ácido propiónico.

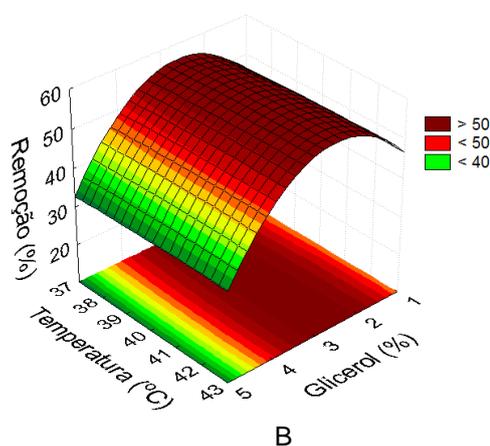
A elevada concentração de ácidos no tratamento de maior adição de glicerol também está correlacionada a sua fácil absorção pelas células bacterianas. O glicerol tem capacidade de entrar nas células através de transporte passivo, sendo que a maioria desses processos ocorre em temperatura ambiente e pressão atmosférica (Manish e Banerjee, 2008; Lo et al., 2013).

A alta concentração de ácidos voláteis e ausência da fase metanogênica no processo, indicam pouca eficiência no tratamento dos efluentes, que foi corroborada pelas baixas remoções de ART, DQO, ST e SV, que estão contidos na Figura 9.

Remoção de Açúcares Redutores Totais



Remoção de DQO

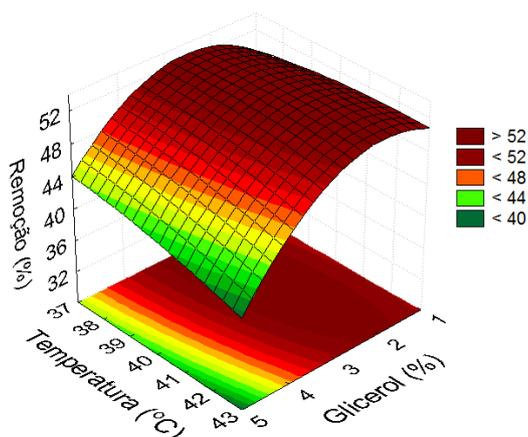


$$\text{RART} = -227,6 + 4,2 T - 0,1 T^2 + 15,7 G - 0,2 G^2 - 0,1 TG$$

$$R^2 = 0,88$$

$$F_{\text{calculado}} = 9,10$$

Remoção de ST



C

$$\text{RST} = -84,2 + 16,3 T - 1,4 T^2 + 6,02 G^* - 0,1 G^{2*} - 0,2 TG$$

$$R^2 = 0,94$$

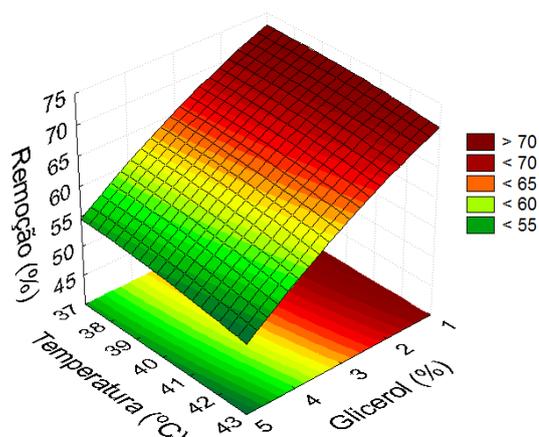
$$F_{\text{calculado}} = 18,29$$

$$\text{RDQO} = -43,9 + 21,3 T - 4,1 T^2 + 3,5 G^* - 0,1 G^{2*}$$

$$R^2 = 0,99$$

$$F_{\text{calculado}} = 119,26$$

Remoção de SV



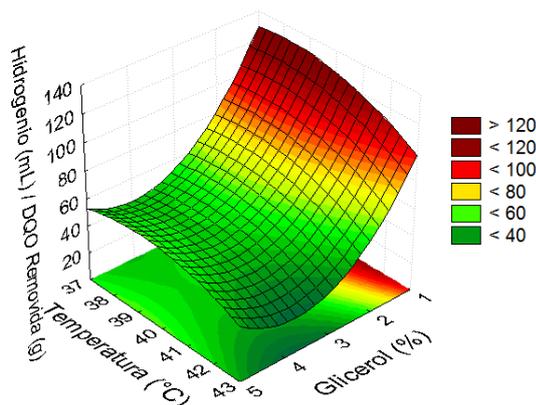
D

$$\text{RSV} = -2,8 - 0,8 G - 0,4 G^2 + 4,2 T - 0,1 T^2 - 0,1 GT$$

$$R^2 = 0,97$$

$$F_{\text{calculado}} = 42,60$$

Conversão de Matéria Orgânica em Hidrogênio



E

$$\text{Conversão} = -1660,5 - 104,51 G^* + 9,64 G^{2*} + 98,46 T - 1,3 T^2 + 0,7 GT$$

$$R^2 = 0,96$$

$$F_{\text{calculado}} = 37,23$$

Figura 9. Superfície de resposta para as Remoções de A- DQO, B- ART, C- ST, D- SV e E- Conversão de carga orgânica em Hidrogênio. Onde T= temperatura (°C) e G = glicerol (%). Os termos com asterisco sobrescrito referem-se aqueles que foram significativos a um nível de 5%.

Com adição de 1% de glicerol na manipeira, as taxas de remoção de açúcares redutores ficaram muito próximas das obtidas por Torres et al. (2017) ao submeter manipeira ao processo de biodigestão, a remoção de carboidratos ficou entre 91 e 94%.

De modo geral, foi constatado que a adição de glicerol proporcionou uma redução das porcentagens de remoção de carga orgânica, enquanto que a temperatura não afetou de forma significativa a um nível de 5% de probabilidade o tratamento dos efluentes.

Este efeito provocado pelo glicerol pode estar relacionado com seu elevado teor de carbono, sendo que uma vez adicionado a manipueira, mesmo que em baixas concentrações, aumenta o teor de sólidos sólidos e DQO da mistura.

Os valores alcançados estão abaixo dos verificados por Larsen et al. (2013), que obteve remoções de 75, 81 e 98% de SV, ST e DQO respectivamente, ao adicionar 2% de glicerol a manipueira utilizando como inoculo lodo de lagoa anaeróbia do sistema de tratamento da indústria de fécula de mandioca. Contudo, os valores obtidos por estes mesmos autores caiu para 68, 72 e 98% ao serem adicionados 3% de glicerol, o que corrobora com a tendência de um decréscimo na remoção de carga orgânica a medida que se aumenta a concentração de glicerol.

Para a obtenção destes valores, Larsen et al. (2013), utilizaram um tempo de retenção hidráulico de 5 dias e obtiveram biogás contendo 48% de metano, o que justifica os valores de remoção de sólidos mais elevados, tendo em vista que na fase metanogênica há o consumo dos ácidos orgânicos produzidos.

Isso justifica também as menores eficiências na conversão de carga orgânica em hidrogênio verificadas neste estudo, uma vez que durante sua produção deve ter ocorrido a conversão dos açúcares presentes na manipueira e do glicerol em ácidos orgânicos.

Desta forma, as remoções de carga orgânica verificadas neste trabalho implicam na necessidade de um tratamento complementar posterior para remoção de carbono. Um reator metanogênico é indicado para consumo da alta carga de ácidos voláteis presentes no efluente.

5.3.2. PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO NAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS

A partir dos resultados da análise estatística e do modelo matemático para a quantidade de hidrogênio produzido (volume), foram obtidas as condições ótimas de temperatura e concentração de glicerol visando alcançar o máximo volume de hidrogênio, sendo a temperatura ideal de 38,5 °C e concentração de glicerol de 4 %. A Figura 10 contém o gráfico de desejabilidade para a otimização da produção de hidrogênio, enquanto que a Figura 11 contém a resposta prevista pelo modelo para os parâmetros cinéticos.

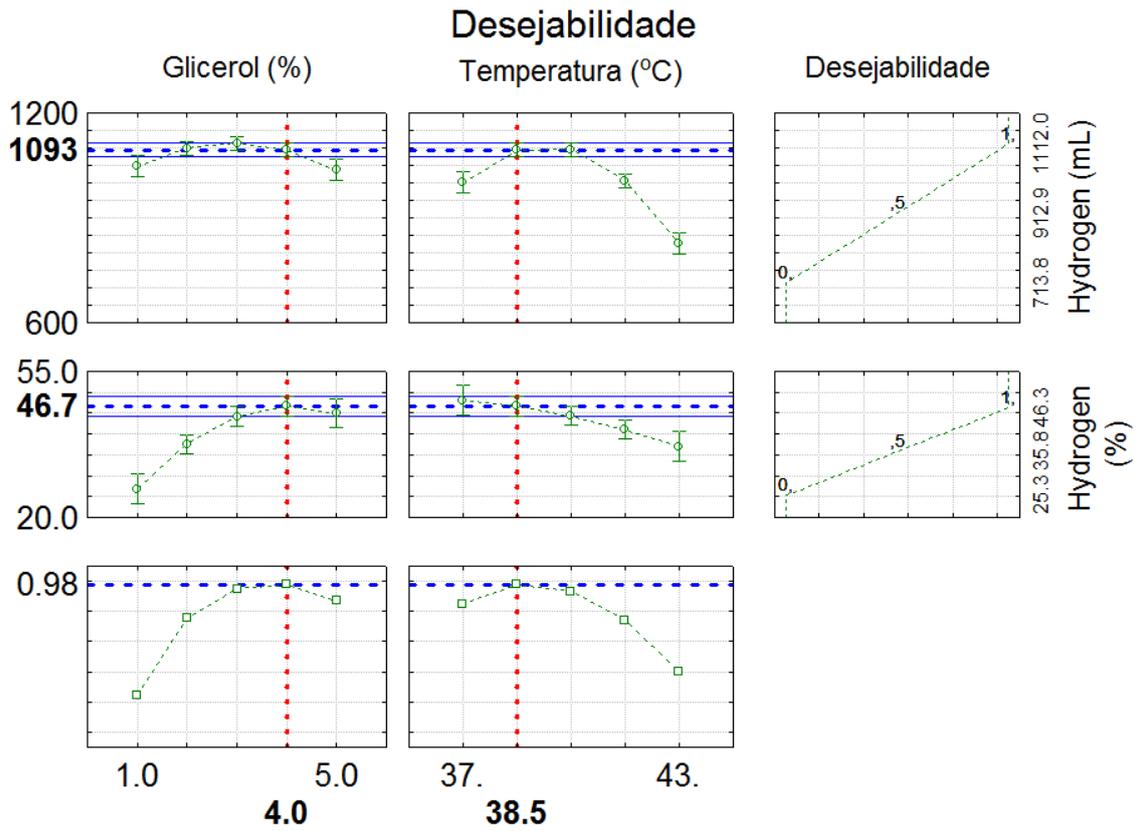


Figura 10. Gráfico de desejabilidade para otimização dos parâmetros.

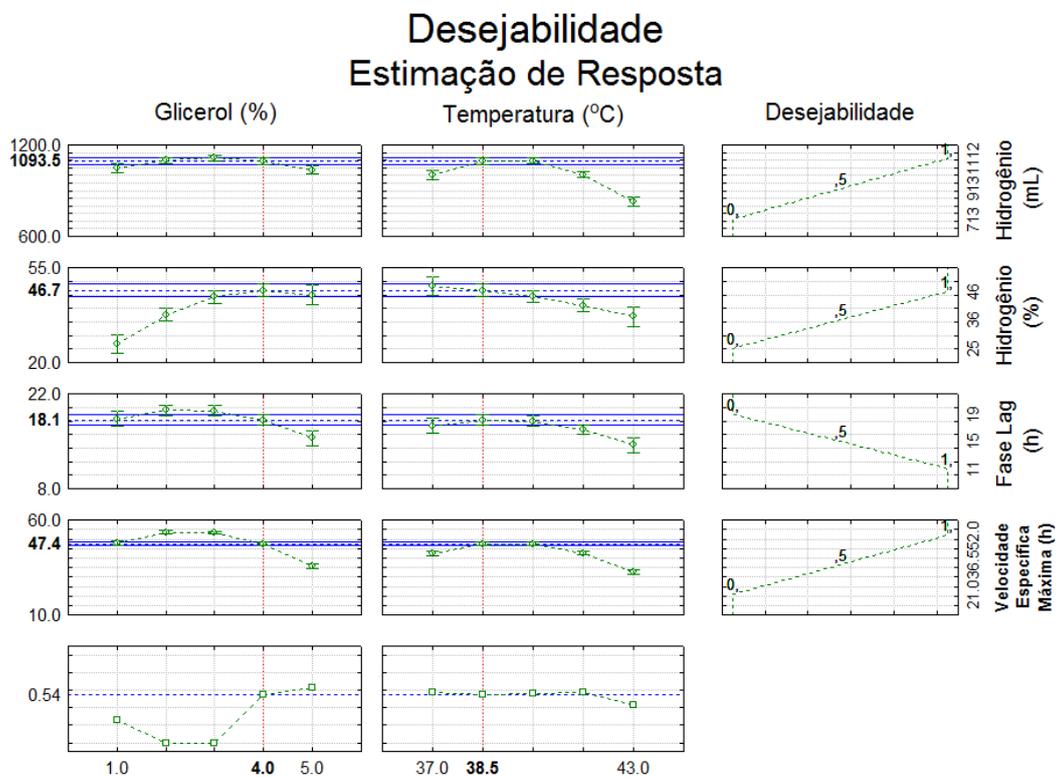


Figura 11. Gráfico de desejabilidade para estimação dos parâmetros cinéticos.

A Tabela 7 contém as respostas previstas pelos modelos quando utilizadas estas condições otimizadas no processo de biodigestão, bem como os resultados obtidos nos ensaios realizados em triplicata nestas condições.

Tabela 7. Comparação entre os resultados experimentais e os previstos pelo modelo para a produção de Hidrogênio

Parâmetro	Previsão do Modelo	Resultado Experimental*
Hidrogênio (mL)	1093,5	1102,6 ± 21,3
Hidrogênio (%)	46,7	46,2 ± 1,2
Tempo de fase lag (h)	18,1	17,9 ± 0,4
Velocidade Específica máxima (mL.h ⁻¹)	47,4	48,1 ± 0,3

*Os valores são as médias seguidas de seus respectivos desvios padrões.

Considerando o desvio padrão dos resultados experimentais, todos foram os valores previstos pelo modelo matemático estão na faixa dos valores experimentais, com exceção da velocidade específica máxima que, embora muito próximo, apresentou na prática um valor superior ao previsto.

Com relação ao valor de 38,5°C para a temperatura ideal, a maioria das bactérias acidogênicas têm ótima produtividade em temperaturas entre 30°C e 40°C. Ainda considera-se que em temperaturas entre 39-41°C ótimas taxas de crescimento de biomassa e produção específica de hidrogênio, decaindo em temperaturas superiores (Mu et al., 2006; Park et al., 2010; Arimi et al., 2015).

No que se refere a concentração de glicerol adicionado (4%), concentrações superiores a 5% afetam diretamente a produção de hidrogênio. Chaurady (2010) afirma em pesquisa utilizando como microrganismo *Escherichia coli* e concentrações de 1,0, 2,5 e 5,0 % de glicerol, que concentrações muito elevadas deste composto afetam o processo e diminuem seu rendimento. O mesmo foi comprovado por Chookaew et al. (2014), testando concentrações de 1-3% de glicerol em reator anaeróbio de fluxo ascendente (UASB).

Já o trabalho de Faber e Ferreira-Leitão (2016) visando a maximização da produção de hidrogênio a partir da utilização do glicerol, chegou aos melhores resultados quando aplicou a menor concentração de glicerol testado em sua pesquisa (0,05 %). Trabalho de Sittijunda e Reungsang (2012), afirmam que para digestão de glicerol e lodo de culturas mistas, a concentração de 2,2 % foi a que proporcionou a produção máxima de hidrogênio.

5.4. MAXIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE METANO NA BIODIGESTÃO DE DOIS ESTÁGIOS

5.4.1. 1º ESTÁGIO - BIODIGESTOR DE ESCALA PILOTO DE ESTÁGIO ACIDOGÊNICO

A produção de hidrogênio é uma rota atrativa do ponto de vista energético por apresentar baixo consumo de energia e poder ser desenvolvido de forma conjunta ou paralela à fase metanogênica (Cremones et al., 2019). Apesar de ocorrer em menores proporções se comparado a digestão metanogênica, a digestão ácida contribui para o tratamento de águas residuárias visando a redução de carga orgânica e teor de sólidos (Arantes et al., 2017).

O modelo de Gompertz foi ajustado aos dados experimentais para a produção de hidrogênio (Figura 12) e apresentou valor de R^2 de 0,998. Os parâmetros cinéticos obtidos pelo modelo foram de 17,9 h para o tempo de duração da fase lag, 2327 $\text{mL}\cdot\text{h}^{-1}$ para a velocidade específica máxima e 21687 mL para o volume máximo de hidrogênio.

Com relação a produção acumulada de hidrogênio, constata-se elevada produção em um curto período de tempo (aproximadamente 10 horas) logo após o tempo de duração da fase lag estimada pelo modelo de Gompertz, cessando a produção após o tempo de 35 horas. Pode-se considerar como tempo da fase de adaptação dos microrganismos o período anterior ao início da produção de gás, período relacionado à aclimatação dos microrganismos no meio para início do processo de digestão.

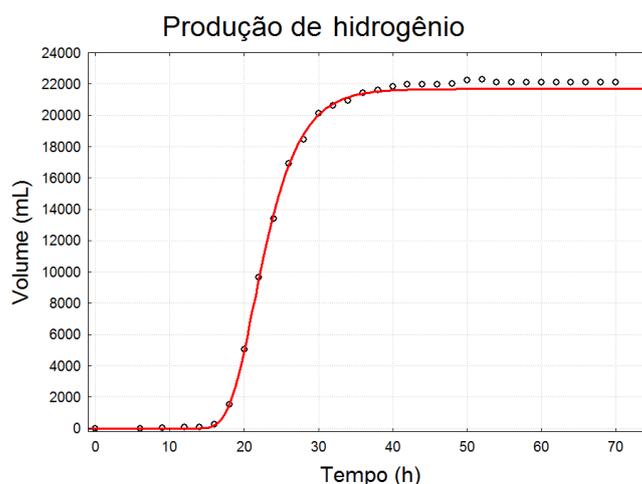


Figura 12. Produção de hidrogênio no reator acidogênico.

5.4.2. CARACTERÍSTICAS DO EFLUENTE DO REATOR DE ESCALA PILOTO

Na Tabela 8, pode-se visualizar o perfil do efluente da saída do reator acidogênico. A partir dos resultados, constata-se remoção de sólidos e DQO superiores aos 40%, sendo condizente com o esperado de um sistema de tratamento em duas fases, onde os ácidos voláteis gerados e remanescentes da digestão ácida serão consumidos na etapa metanogênica do processo. A elevada geração de ácidos é corroborada pelo baixo pH (5,1) observado no efluente.

Tabela 8. Características dos substratos e efluente do reator acidogênico

Parâmetro	Substratos do Biodigestor			Parâmetro	Efluente do Biodigestor
	Manipueira	Glicerol	Inóculo		
pH	5,4	8,1	7,2	pH	5,1 ± 0,1
DQO (g.L⁻¹)	5,2 ± 0,4	876,0 ± 1,2	0,3 ± 0,1	Rem. DQO (%)	43,9 ± 1,4
ST (%)	6,3 ± 0,2	68,3 ± 0,4	2,1 ± 0,2	Rem. ST (%)	47,3 ± 0,4
SV (%)	5,9 ± 0,3	61,7 ± 0,6	0,3 ± 0,1	Rem. SV (%)	48,6 ± 0,3

Os valores correspondem a média seguida de seus respectivos desvios padrão.

Rem. DQO – Remoção da demanda química de oxigênio.

Rem. ST – Remoção de sólidos totais.

Rem. SV – Remoção de sólidos voláteis.

A partir da Figura 13, pode-se visualizar o perfil da produção de ácidos orgânicos para a digestão acidogênica, verificado pela utilização de amostras destrutivas. Com relação a produção de ácidos orgânicos, constata-se a presença de ácidos desde a primeira verificação das amostras destrutivas, após 10 horas do início do processo de digestão. Constata-se presença majoritária do ácido butírico, seguido do ácido acético, durante todo o período de amostragens. O hidrogênio molecular, no processo de digestão ácida, normalmente é advindo das vias de produção desses ácidos pela conversão da glicose (Wei et al., 2018).

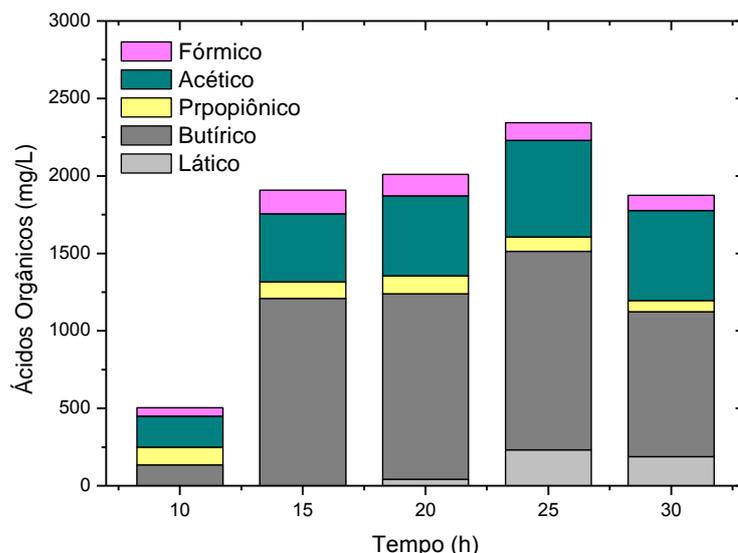


Figura 13. Perfil de ácidos orgânicos para a digestão acidogênica.

O tempo da digestão ácida é bem inferior aos tempos encontrados para reatores operando em fase metanogênica. Isso ocorre pela rápida estabilidade das bactérias acidogênicas e grande atividade das culturas. Desse modo, definem-se tempos de retenção hidráulica relativamente baixos, de modo que se impeça a proliferação de microrganismos metanogênicos (Corneli et al., 2016; Algapanl et al., 2018; Koroglu et al., 2019).

Constata-se ainda que após 30 horas de digestão, a concentração de ácidos orgânicos começa a diminuir indicando o término da conversão dos açúcares e início do consumo dos ácidos produzidos no próprio reator. O consumo dos ácidos voláteis, apesar dos baixos valores de pH, ocorre na fase metanogênica, indesejada nessa etapa do processo, que além de consumir os ácidos produzidos ainda pode indicar consumo do hidrogênio para geração do metano.

5.4.3. 2º ESTÁGIO - BIODIGESTORES DE ESTÁGIO METANOGÊNICO

Após o término da fase acidogênica, o efluente coletado foi submetido a diferentes teores de bicarbonato de sódio para avaliação do desempenho dos reatores metanogênicos. O planejamento utilizado nesta etapa foi um fatorial 3^2 , que resultou em 9 tratamentos de diferentes composições, mais a repetição em triplicata do ponto central (tratamento 5). O valor de F_{tabelado} de Snedecor a um nível de 5% de probabilidade para este planejamento é de 4,95. A Tabela 9 contém as condições a que foram submetidos cada um dos tratamentos, bem como as respostas obtidas.

A partir da Tabela 9, pode-se visualizar os resultados obtidos para produção de metano e volume e teor e os parâmetros cinéticos obtidos para os tratamentos estudados. Os teores de metano variaram de 52-66 % tendo maior teor encontrado no tratamento que combinou 4 g.L⁻¹ de bicarbonato e sódio e temperatura de 37,5 °C. Com relação ao volume de produção, os melhores resultados também foram obtidos nestas condições, que correspondem o ponto central do planejamento fatorial.

Tabela 9. Resultados de produção de gás e parâmetros cinéticos obtidos para os diferentes tratamentos estudados

Trat.	Condições		Produção metano		Parâmetros Cinéticos		
	B (g.L ⁻¹)	T (°C)	V (mL)	C (%)	A (mL)	μ_{max} (mL.dia ⁻¹)	λ (d)
1	2	36,0	1985,6	52	1902,6	346,9	5,4
2	2	37,5	2113,3	54	2046,8	312,4	5,0
3	2	39,0	2118,7	59	2059,3	319,9	5,1
4	4	36,0	2678,1	63	2655,6	512,7	5,4
5	4	37,5	2766,0 ± 17,0*	66 ± 1*	2773,7 ± 19,2*	546,2 ± 4,5*	5,4 ± 0,3*
6	4	39,0	2698,8	64	2682,31	524,1	5,4
7	6	36,0	2587,4	62	2567,2	623,3	5,5
8	6	37,5	2630,5	58	2607,6	423,6	3,8
9	6	39,0	2654,3	61	2640,2	403,4	3,9

B- Bicarbonato de Sódio; T- Temperatura; V- Volume; C- Concentração de Metano; A- Volume máximo de Metano; μ_{max} – Velocidade específica máxima; λ – Tempo de duração da fase lag. Os valores com (*) são médias seguidas de seus respectivos desvio padrão. Não foi verificada a produção de hidrogenio em nenhum dos tratamentos.

Com relação aos parâmetros obtidos a partir do modelo de Gompertz (Tabela 7 e Figura 10), o coeficiente de correlação (R^2) para todos os tratamentos foi superior a 0,99. Visualiza-se tempos de fase lag muito aproximados para maioria dos tratamentos testados, com maior discrepância encontrada nos tratamentos de teor de 6% de bicarbonato de sódio, sendo estes, relativamente menores. Em concordância, o tratamento com adição de 6 g.L⁻¹ de bicarbonato e temperatura de 36 °C foi o que apresentou maior velocidade específica máxima.

Com base na Figura 14, constata-se que para todos os tratamentos, a produção de metano cessa entre o 12º e 18º dia de digestão com base na estabilização dos pontos de produção de acumulada. Tratamentos com menores teores de bicarbonato de sódio apresentaram término da produção de biogás com maiores tempos de digestão. Isso

ocorre porque os carbonatos e bicarbonatos realizam o tamponamento dos ácidos orgânicos produzidos, controlando e evitando flutuações do pH, mantendo assim, a estabilidade do sistema (Akbas et al. 2015).

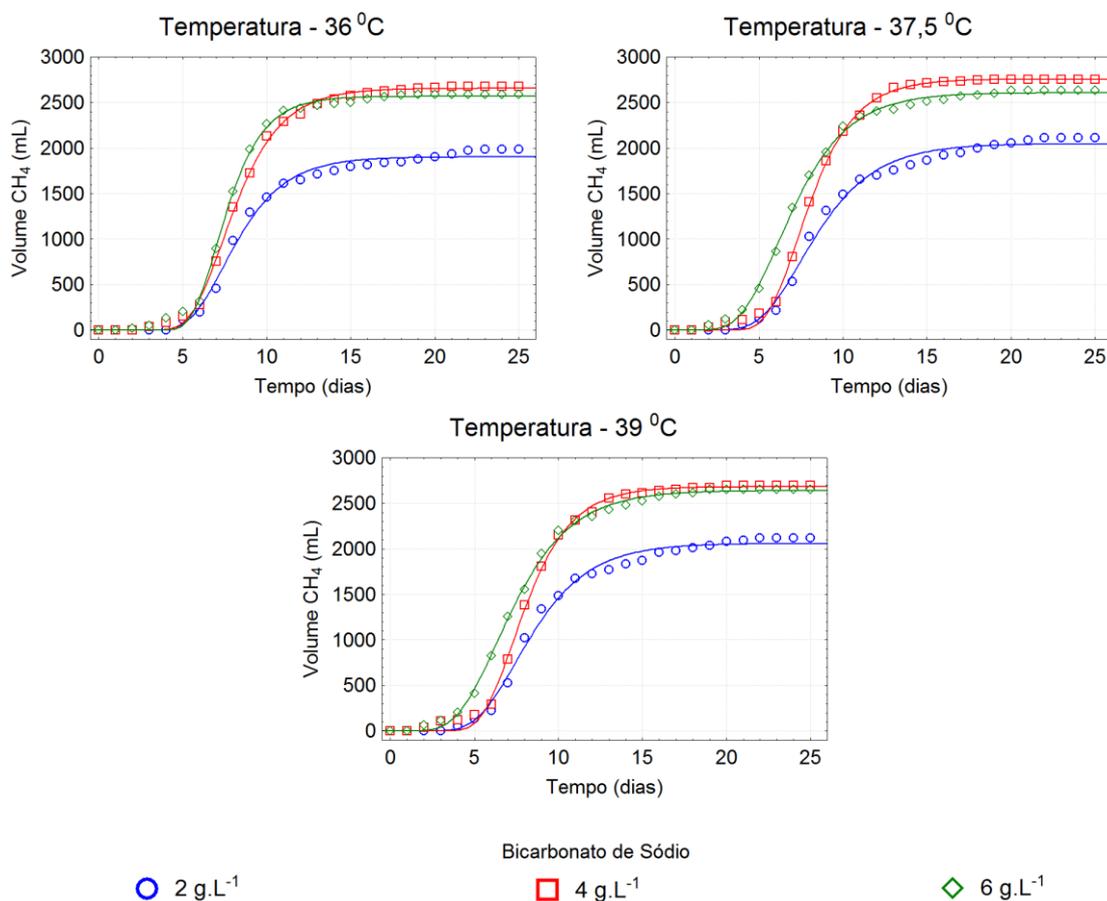


Figura 14. Modelos de Gompertz ajustados aos dados de produção acumulada de metano para os tratamentos estudados.

A partir da Figura 15, pode-se visualizar as respostas obtidas para interação entre as variáveis temperatura e bicarbonato de sódio. Tanto para produção quanto para concentração de metano, constata-se que a variável independente bicarbonato de sódio apresenta grande influência nas respostas, enquanto a variação da temperatura não afeta de forma significativa o teor e produção de metano. Com base nas superfícies de resposta, percentuais de bicarbonato de sódio entre 4-5 g.L⁻¹ foram responsáveis pelos melhores resultados.

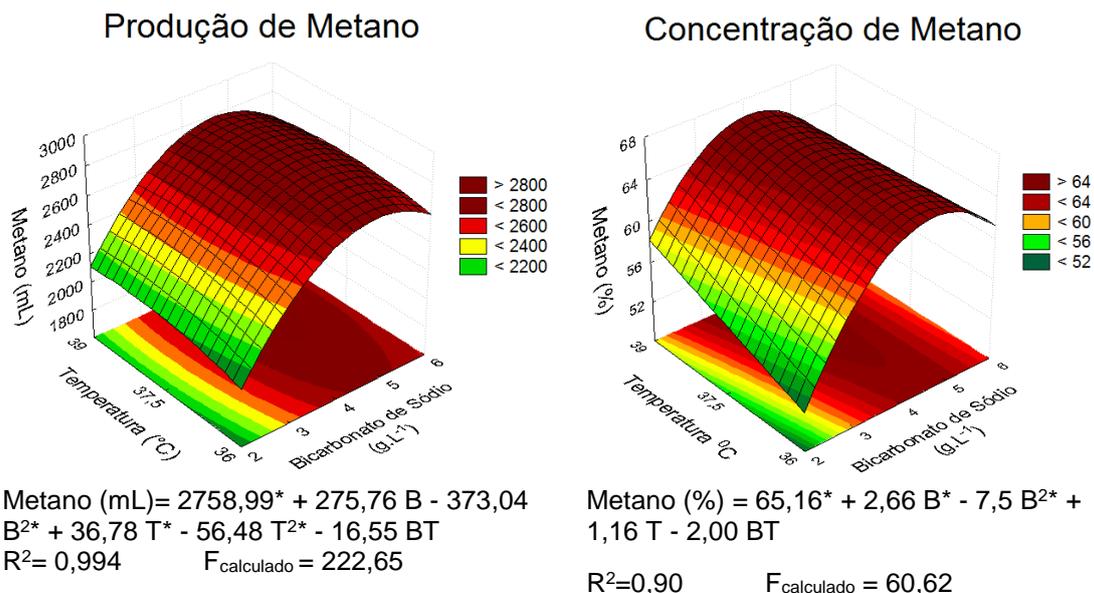


Figura 15. Superfícies de resposta para as variáveis produção de metano e concentração de metano para os tratamentos estudados. Em que T= temperatura (°C) e B = bicarbonato de sódio (g.L⁻¹). Os termos com asterisco sobrescrito referem-se aqueles que foram significativos a um nível de 5%

Todas as temperaturas estudadas se enquadraram em faixa mesofílica. Uma hipótese a se constatar é que para que a temperatura afete os rendimentos de produção de metano, uma faixa mais ampla deve ser estudada, de modo que faixas psicrófilicas e termofílicas também sejam alcançadas e outras culturas de microrganismos possam se desenvolver (Cremonez et al., 2019).

No que se refere aos efluentes dos biodigestores, a partir da Figura 16, pode-se visualizar as superfícies de resposta para as variáveis referentes a remoção de carga orgânica. Todos os resultados obtidos para os tratamentos estudados apontaram remoções de ST, SV e DQO superiores aos 80% para todas as variáveis. De forma semelhante aos resultados obtidos para as variáveis de produção e teor de metano, os melhores resultados para remoção de ST, SV e DQO encontraram-se próximos ao teor de 4 g.L⁻¹ de adição de bicarbonato de sódio. Da mesma forma, a variação da temperatura não apresenta influência significativa para as variáveis testadas.

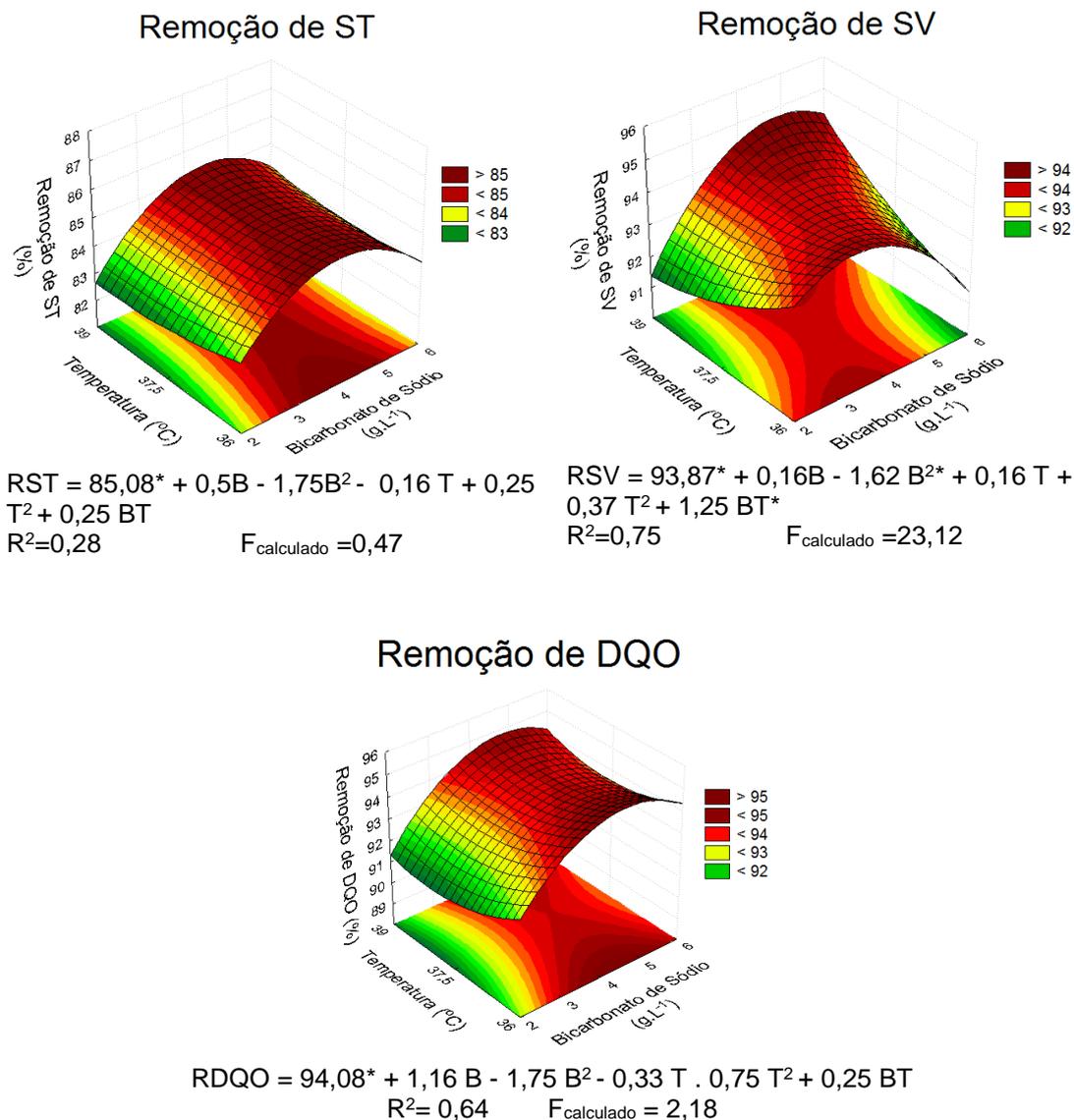


Figura 16. Superfícies de resposta referentes a remoção de carga orgânica nas variáveis dependentes Remoção de ST, SV e DQO. Em que T= temperatura (°C) e B = bicarbonato de sódio (g.L⁻¹). Os termos com asterisco sobrescrito referem-se aqueles que foram significativos a um nível de 5%.

5.4.4. MAXIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE METANO

Desta forma, partindo dos resultados da análise estatística e do modelo matemático para o volume de metano produzido através da função de desejabilidade, foram obtidas as condições ótimas de temperatura e concentração de bicarbonato de sódio visando alcançar o máximo volume de metano, sendo a temperatura ideal de 39,0 °C e concentração de bicarbonato de sódio de 5,0 g/L. Foram desconsideradas as variáveis respostas RST e RDQO, uma vez que o valor de $F_{\text{calculado}}$ foi inferior ao valor de F_{tabelado} .

A Tabela 10 contém as respostas previstas pelo modelo quando utilizadas estas condições otimizadas no processo de biodigestão, bem como os resultados obtidos nos ensaios realizados em triplicata nestas condições.

Tabela 10. Comparação entre os resultados experimentais e previstos pelo modelo para a produção de Metano

Parâmetro	Previsão do Modelo	Resultado Experimental*
Metano (mL)	2775,6	2819,4 ± 46,7
Metano (%)	64,8	64,5 ± 0,4
Tempo de fase lag (d)	4,0	3,8 ± 0,1
Velocidade Específica máxima (mL.dia ⁻¹)	487,7	493 ± 12,1
RST (%)	85,0	87,6 ± 3,8
RSV (%)	94,6	95,3 ± 2,6
RDQO (%)	94,7	93,4 ± 3,7
Produção de CH ₄ .L ⁻¹ _{resíduo}	1732,5	1758,1 ± 29,2

*Os valores são médias seguidas de seus respectivos desvios padrões.

Considerando o desvio padrão dos resultados experimentais, todos foram os valores previstos pelo modelo matemático estão na faixa dos valores experimentais, com exceção do tempo de duração da fase lag, que embora muito próximo, apresentou na prática um valor inferior ao previsto, o que é positivo.

Com relação ao perfil de ácidos orgânicos para a digestão metanogênica nas condições otimizadas, contata-se a presença de ácidos desde a primeira verificação das amostras destrutivas, após 2 dias do início do processo de digestão, como pode ser evidenciado na Figura 17.

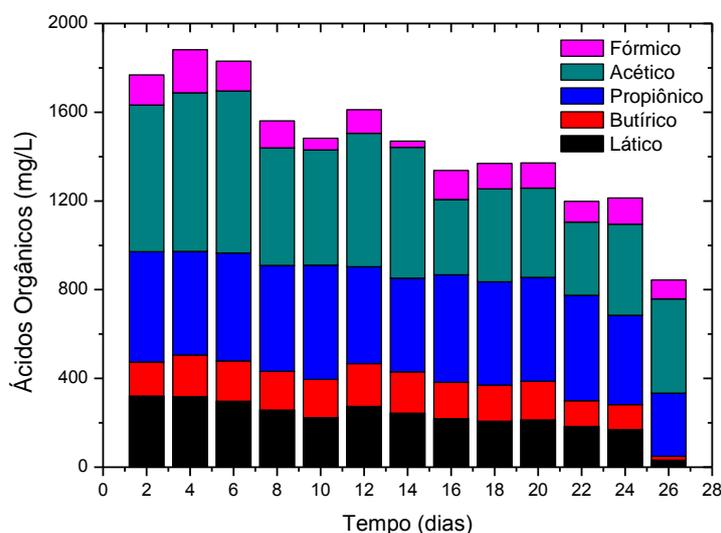


Figura 17. Ácidos orgânicos presentes no efluente nas condições otimizada.

A concentração total de ácidos orgânicos, mesmo nos dias iniciais do processo, onde apresentaram os maiores valores, em torno de 1800 mg.L^{-1} estavam presentes em concentrações favoráveis. Wellinger (1997) e Kryvoruchko et al. (2009), afirmam quando a concentração total de ácidos voláteis excede 3000 mg.L^{-1} pode ocorrer uma inibição do processo de digestão anaeróbia.

A presença majoritária do ácido acético foi verificada durante todo o período de amostragens. Este ácido, quando consumido pode ser convertido diretamente em CH_4 e CO_2 (Ye et al., 2013) conforme Equação 3, contribuindo para a obtenção de elevados valores de velocidade específica máxima.

Evidenciou-se também, que ao longo de todo o processo de biodigestão ocorreu o consumo dos ácidos orgânicos, que resultam na produção de metano, além disso, não houve grandes mudanças na proporção de cada um destes ácidos na fase líquida, o que é indício de estabilidade do processo (Wei et al., 2018).

5.5. ESTUDO DA CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO E METANO OBTIDOS NA BIODIGESTÃO DE DOIS ESTÁGIOS

A Figura 18 contém as cinéticas de produção de hidrogênio no biodigestores acidogênico de escala piloto, produção de metano no biodigestor de fase metanogênica, e produção de biogás na biodigestão em dois estágios, correspondendo a soma do biogás produzido nos dois biodigestores operando nas condições otimizadas neste estudo. O modelo de Gompertz para os três casos apresentou ajuste aos dados experimentais superior a 0,99, e os parâmetros cinéticos obtidos estão contidos na Tabela 11.

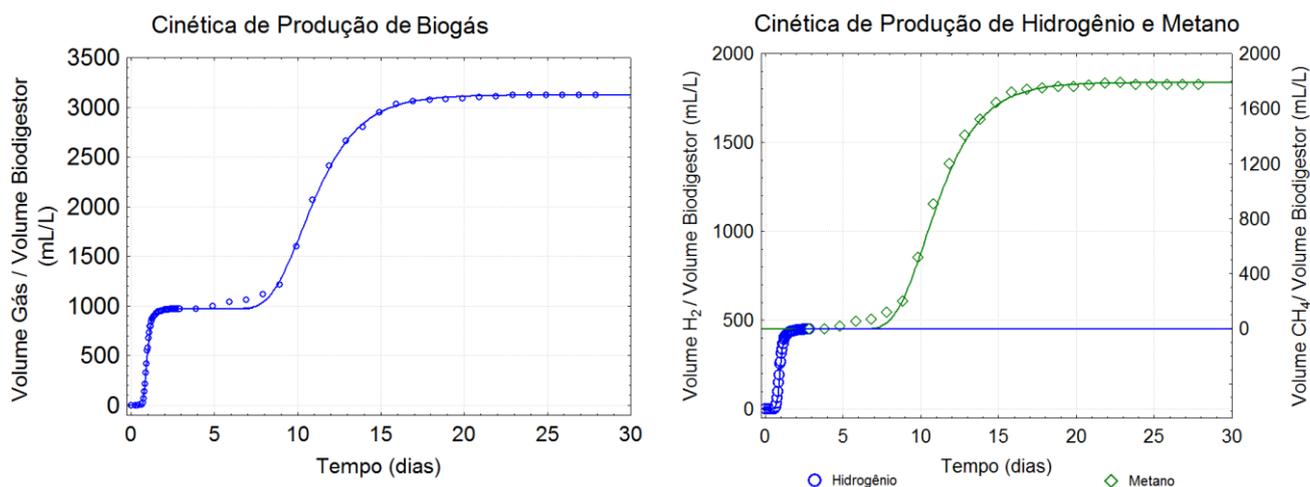


Figura 18. Cinéticas de produção de gás na biodigestão em duas etapas.

Tabela 11. Parâmetros cinéticos da biodigestão em 2 estágios.

Parâmetro	Hidrogênio	Metano	Biogás
A - Volume Máximo de gás	433,8	1409,7	$A_H = 943,8$ $A_M = 2196,3$
μ_{max} - Velocidade Específica Máxima	46,5	246,5	$\mu_{maxH} = 102,2$ $\mu_{maxM} = 393,4$
λ - Tempo de Duração da Fase Lag	0,75	6,8	$\lambda_H = 0,73$ $\lambda_M = 6,8$

A_H - volume máximo de biogás produzido no biodigestor acidogênico (mL);

μ_{maxH} - velocidade específica máxima de biogás no biodigestor acidogênico (mL.dia⁻¹).L⁻¹;

λ_H - tempo de duração da fase lag do biodigestor acidogênico (dia).

A_M - volume máximo de biogás produzido no biodigestor metanogênico (mL.L⁻¹);

μ_{maxM} - velocidade específica máxima de biogás no biodigestor metanogênico (mL.dia⁻¹).L⁻¹;

λ_M - tempo de duração da fase lag do biodigestor metanogênico (dia).

Foi verificado que o tempo de duração da fase Lag para a fase acidogênica foi inferior a fase metanogênica, assim como o tempo de duração do processo de biodigestão, onde no reator acidogênico ocorreu a produção de hidrogênio durante um período de cerca de 35 horas, enquanto que a produção de metano ocorreu por cerca de 12 dias.

Com relação a velocidade específica máxima de produção de biogás tanto no biodigestor acidogênico quanto no metanogênico foi superior aos verificados para a produção de hidrogênio e metano nestes reatores. Este resultado já era esperado, uma vez que esses gases componentes do biogás.

5.6. AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DA BIODIGESTÃO EM DOIS ESTÁGIOS

A partir dos volumes de hidrogênio e metano obtidos no reator acidogênico de escala piloto e do reator metanogênico, ambos operando nas condições otimizadas através das funções de desejabilidade, foram obtidas as produções específicas desses gases, que estão contidas na Tabela 12, que contém ainda uma comparação dos resultados obtidos neste estudo, com o de outros pesquisadores que também utilizaram a biodigestão em dois estágios para o tratamento de efluentes de manipueira.

O rendimento de hidrogênio obtido neste estudo correspondeu ao dobro do verificado por Chavadej et al. (2019), e embora tenha sido abaixo do rendimento obtido por Intanoo et al. (2016), alcançamos a maior concentração de hidrogênio no gás produzido.

Com relação a produção de Metano, o rendimento obtido neste estudo ficou muito próximo ao obtido por Intanoo et al. (2016). Já o rendimento obtido por Chavadej et al. (2019), foi cerca de 2,5 vezes maior.

Tabela 12. Comparação do rendimento da biodigestão em dois estágios tendo manipueira como substrato.

Substrato	Inóculo	H₂/RDQO (mL.g⁻¹)	CH₄/RDQO (mL.g⁻¹)	Conteúdo Energético (Kcal.g_{RDQO}⁻¹)	Referência
Manipueira + Glicerol Residual	Água Residual de Suinocultura	30,8 (46,5 %)*	104,5 (64,5 %)*	1,08	Este Estudo
Manipueira resíduo de mandioca	+ Lodo de Reator de fluxo semi-contínuo para tratamento de manipueira	15,0 (43,0 %)*	259,0 (70,5 %)*	2,49	Chavadej et al. (2019)
Manipueira	Lodo de Lagoa anaeróbica para tratamento de Efluente Amido de Mandioca	39,8 (36,4 %)*	100,0 (63,6 %)*	1,06	Intanoo et al. (2016)

* Os valores correspondem a concentração de H₂ ou CH₄ no gás produzido.

No que se refere ao conteúdo energético produzido por massa de DQO consumida no processo, o resultado encontrado neste estudo ficou muito próximo ao obtido por Intanoo et al. (2016), enquanto que o obtido por Chavadej foi cerca de 2 vezes maior.

Vale ressaltar que os estudos realizados por Intanoo et al. (2016) e Chavadej empregaram biodigestores operados com fluxo contínuo ascendente de substrato, o que pode ter influenciado de forma positiva os valores de produção de gás e o conteúdo energético, uma vez que estes resultados foram obtidos com os biodigestores operando nos regimes de produção máxima.

Desta forma, consideramos que a comparação do rendimento obtido nestes estudos corrobora com a tese de que a adição do glicerol a manipueira e a utilização de água residual de suinocultura como inóculo são alternativas viáveis para o tratamento destes efluentes, apresentando ainda a vantagem da obtenção do gás hidrogênio em maiores concentrações, o que pode tornar possível seu emprego em processos mais eficientes para obtenção de energia quando comparados a sua queima direta em caldeiras.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O trabalho avaliou o uso da biodigestão anaeróbia como método de tratamento da manipueira e glicerol residual. Foi realizada com êxito, a caracterização microbiológica do inóculo de água residual de suinocultura, que é amplamente utilizado em processos biológicos de tratamento de efluentes agroindustriais, onde foram determinados três subgrupos e uma espécie de microrganismo, todos produtores de hidrogênio.

Além disso, otimizou-se a produção de hidrogênio e metano utilizando biodigestão anaeróbia em dois estágios, o que proporcionou um maior rendimento energético ao processo aliado a uma maior remoção de carga orgânica dos resíduos.

A adição do glicerol a manipueira fez com que fossem obtidos incrementos da ordem de 400 % na produção de hidrogênio, e conseqüentemente, uma produção de energia quatro vezes maior. Em adição, a utilização de um reator metanogênico na biodigestão em duas etapas tornou possível a redução da carga orgânica dos substratos, além da obtenção do gás metano.

Assim, o presente estudo pôde contribuir de forma significativa para o aumento do potencial de utilização do biogás como fonte energética, com a perspectiva de redução da dependência dos combustíveis fósseis, reduzindo ainda os impactos ambientais através do tratamento de resíduos orgânicos gerados na agroindústria por biodigestão anaeróbia em dois estágios.

Como sugestão para trabalhos futuros, a utilização das condições experimentais e composição dos substratos deve ser estudada em reatores UASB, que podem proporcionar maior rendimento na produção energética e permitir uma redução no tamanho dos biodigestores quando operados em modo contínuo ou semi-contínuo.

7. REFERÊNCIAS

ADI, L. G., DLUGY, C., SHOTLAND, Y., TAVOR, D. Employing crude glycerol from biodiesel production as an alternative green reaction medium. *Ind. Crops Prod.*, 30, p. 78-81, 2009.

ALVES, G.S.; SAMPAIO, A.P.L.; ZAVOLSKI, C.A.; BRITO, V.H.; CEREDA, M.P.; NEVES, E. Material a base de amido de mandioca para manufatura de embalagem de alimentos. *Revista Citino*, v.2, n.1, p.16-24. 2012.

AKBAS, H.; BILGEN, B.; TURHAN, A.M. An integrated prediction and optimization model of biogas production system at a wastewater treatment facility. *Bioresource Technology*, v.196, p.566–576, 2015.

AKOBI, C., YEO, H., HAFEZ, H., NAKHLA, G. Single-stage and two-stage anaerobic digestion of extruded lignocellulosic biomass. *Applied Energy* 184, 548-559, 2016.

ALGAPANI, D.E.; QIAO, W.; DI PUMPO, F.; BIANCHI, D.; WANDERA, S.M.; ADANI, F.; DONG, R. Long-term bio-H₂ and bio-CH₄ production from food waste in a continuous two-stage system: Energy efficiency and conversion pathways. *Bioresource Technology*, v.248, parte A, p.204-213, 2018

AMIGUN, B.; SIGAMONEY, R.; VON BLOTTNITZ, H. Commercialization of biofuel industry in Africa: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v.12, p.690–711. 2008.

APHA. Standard methods. 19th Edition. American Public Health Association, Washington, DC; 1995.

ARANTES, M.K.; ALVES, H.J.; SEQUINEL, R.; DA SILVA, E.A. Treatment of brewery wastewater and its use for biological production of methane and hydrogen. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.42, n.42, p.26243-26256, 2017.

ARIMI, M.M., KNODEL, J., KIPROP, A., NAMANGO, S.S., ZHANG, Y., GEIBEN, S.U. Strategies for improvement of biohydrogen production from organic-rich wastewater: A review. *Biomass and Bioenergy* 75, 101–118, 2015.

ATHANASOULIA, E.; MELIDIS, P.; AIVASIDIS, A. Co-digestion of sewage sludge and crude glycerol from biodiesel production. *Renewable Energy*, v.62, p.73-78. 2014.

ASTALS, S.; NOLLA-ARDÉVOLB, V.; MATA-ALVAREZA, J. Thermophilic codigestion of pig manure and crude glycerol: Process performance and digestate stability. *Journal of Biotechnology*, v.166, n.3, p.97–104. 2013.

BOND, T.; TEMPLETON, M.R. History and future of domestic biogas plants in the developing world. *Energy for Sustainable Development*, v.15, n.4, p.347-354. 2011.

BP, 2010-2014. BP Statistical Review of World Energy.

BRADSAW, A.; JANNUZZI, G.M. Governing energy transitions and regional economic development: evidence from three Brazilian states. *Energy Policy*, v. 126, p. 1-11, 2019.

CANDEIA, R. A.; DA SILVA, M. C. D.; CARVALHO FILHO, J. R.; BRASILINO, M. G. A.; BICUDO, T. C.; SANTOS, M. G. Influence of soybean biodiesel content on basic properties of biodiesel–diesel blends. *Fuel* 2009; 88:738–43.

CARMO, F.R.; EVANGELISTA, N.S.; SANTIAGO-AGUIAR, R.S.; FERNANDES, F.A.N.; SANT'ANA, H.B. Evaluation of optimal activity coefficient models for modeling and simulation of liquid–liquid equilibrium of biodiesel + glycerol + alcohol systems. *Fuel*, v.125, p.57–65. 2014.

CASSONI, V.; CEREDA, M.P. Avaliação do Processo de Fermentação Acética da Manipueira. *Revista Energia na Agricultura, Botucatu*, v.26, n.4, p.101-113. 2011.

CHANG S, LI JZ, LIU F. Evaluation of different pretreatment methods for preparing hydrogen-producing seed inocula from waste activated sludge. *Renewable Energy* 36, 1517–1522, 2011.

CHAUDARY, N. Anaerobic Fermentation of Glycerol by *Escherichia coli* K12 for the Production of Ethanol. Master Thesis. McGill University, 2010.

CHAVADEJ, S., WANGMOR, T., MAITRIWONG, K., CHAICHIRAWIWAT, P., RANGSUNVIGIT, P., INTANOOD, P. Separate production of hydrogen and methane from cassava wastewater with added cassava residue under a thermophilic temperature in relation to digestibility. *Journal of Biotechnology*, 291 p. 67-71, 2019.

CHAVALPARIT, O., ONGWANDEE, M. Clean technology for the tapioca starch industry in Thailand. *Journal of Cleaner Production* 17, 105–110, 2009.

CHEUNBARN, T.; PAGILLA, K. R. Anaerobic thermophilic/ mesophilic dual-stage sludge treatment. *Environmental Engineering*, v.126, p.796–801. 2000.

CHOOKAEW, T., PRASERTSAN, P., REN, Z.J. Two-stage conversion of crude glycerol to energy using dark fermentation linked with microbial fuel cell or microbial electrolysis cell. *N. Biotechnol.* 31(2), 179-184, 2014.

CHYNOWETH, D.P.; OWENS, J.M.; LEGRAND, R. Renewable methane from anaerobic digestion of biomass. *Renewable Energy*, v.22, p.1–8. 2001.

COIMBRA-ARAÚJO, C.H., MARIANE, L., BLEY JÚNIOR, C., FRIGO, E.P., FRIGO, M.S., ARAÚJO, I.R.C., ALVES, H.J. Brazilian case study for biogas energy: Production of electric power, heat and automotive energy in condominiums of agroenergy. *Renewable & Sustainable Energy Reviews* 40, 826-839, 2014.

COONEY, M., MAYNARD, N., CANNIZZARO, C., BENEMANN J. Two-phase anaerobic digestion for production of hydrogen-methane mixtures. *Bioresour. Technol.* 98, 2641–2651, 2007.

CORNELI, E.; DRAGONI, F.; ADESSI, A.; PHILIPPIS, R.; BONARI, E.; RAGAGLINI, G. Energy conversion of biomass crops and agroindustrial residues by combined biohydrogen/biomethane system and anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, v.211, p.509-518, 2016.

CREMONEZ, P. A. Digestão anaeróbia de polímero orgânico a base de fécula de mandioca. 2015. 93 p. Dissertação de mestrado, Programa de Engenharia de Energia na Agricultura, Unioeste.

CREMONEZ, P.A.; SAMPAIO, S.C.; TELEKEN, J.G.; MEIER, T.W.; DIETER, J.; TELEKEN, J. Influence of inoculum to substrate ratio on the anaerobic digestion of a cassava starch polymer. *Industrial Crops and Products*, v.141, p.1117091, 2019.

CRUZ, F. E. Produção de hidrogênio em refinarias de petróleo: avaliação energética e custo de produção. 184 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica). Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2010.

DAI, X.; LI, X.; ZHANG, D.; CHEN, Y.; DAI, L. Simultaneous enhancement of methane production and methane content in biogas from waste activated sludge and perennial ryegrass anaerobic co-digestion: the effects of pH and C/N ratio. *Bioresource Technology*, New York, v. 216, p. 323-330, 2016.

DEL BIANCHI, V. Balanço de massa e de energia do processamento de farinha de mandioca em uma empresa de médio porte do estado de São Paulo. Botucatu, 1998. 88 118p. Tese (Doutorado em Agronomia/Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

DEMIRER, G.N.; CHEN, S. Two-phase anaerobic digestion of unscreened dairy manure. *Process Biochemistry*, Irlanda, v.40, n.4, p.3.542-3.549. 2005.

DINESH, G.K., CHAUHAN, R., CHAKMA, S. Influence and strategies for enhanced biohydrogen production from food waste. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 92, 807-822, 2018.

FABER, M.O., FERREIRA-LEITÃO, V.S. Optimization of biohydrogen yield produced by bacterial consortia using residual glycerin from biodiesel production. *Bioresource Technology* 219, 365-370, 2016.

FORESTI, E. Notas da aula de Processos e Operações em Tratamento de Resíduos SHS-705. Pós Graduação em Hidráulica e Saneamento na Escola de Engenharia de São Carlos. São Carlos. 1998.

FREDA, R. H., INES, H., GODFREY, K., RICHARD, D., DENNIS, L. H. Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: principles and progress. *International Journal of Hydrogen Energy*, V 32 , p. 174-184, 2007.

FU, S.-F., XU, X.-H., DAI, M., YUAN, X.-Z., GUO, R.-B. Hydrogen and methane production from vinasse using two-stage anaerobic digestion. *Process Saf. Environ. Prot.* 107, 81–86, 2017.

GABIATTI, N. C.; ZACHARIAS, N. D. Comparação entre os Sistemas de Digestão Anaeróbia e Nitrificação/Desnitrificação no Tratamento de Águas Residuárias da Suinocultura. I Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos de Animais, pg. 99-103, Florianópolis – SC. 2009.

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

GODOS, I.D.; VARGAS, V.A.; BLANCO, S.; GONZÁLEZ, M.C.G.; SOTO, R.; GARCÍAENCINA, P.A.; BECARES, E.; MUÑOZ, R. A comparative evaluation of microalgae for the degradation of piggery wastewater under photosynthetic oxygenation. *Bioresource Technology*, New York, v. 101, n. 14, p. 5150-5158, 2010.

GOMES, F.O. de C.; CAPPI, N. Redução de Sólidos de Dejetos de Poedeiras em Biodigestores Operados com Diferentes Tempos de Retenção Hidráulica. Disponível em: <<http://periodicos.uems.br/novo/index.php/enic/article/viewFile/1128/697>> Acessado em: out/2015.

GUPTA, V. K.; SUHAS. Application of low-cost adsorbents for dye removal – A review. *Journal of Environmental Management*, v. 90, p. 2313-2342, 2009.

GUO, X.M., TRABLY, E., LATRILLE, E., CARRÈRE, H., STEYER, J.-P. Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: a review. *Int. J. Hydrogen Energy* 35, 10660-10673, 2010.

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

INTANOO, P., CHAIMONGKOL, P., CHAVADEJ, S. Hydrogen and methane production from cassava wastewater using two-stage upflow anaerobic sludge blanket reactors (UASB) with an emphasis on maximum hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41, p. 6107-6114, 2016.

KANNAH, R.Y., KAVITHA, S., SIVASHANMUGHAM, P., KUMAR, G., NGUYEN, D.D., CHANG, L.W., BANI, J.C. Biohydrogen production from rice straw: Effect of combinative

pretreatment, modelling assessment and energy balance consideration. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2018.

KAPDAN, I. K., KARGI, F. Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme Microb Technol*, 38, pp. 569-582, 2016.

KAUR, K.; PHUTELA, U. G. Sodium carbonate pretreatment: an approach towards desilication of paddy straw and enhancement in biogas production. *Paddy and Water Environment*, v. 14, n. 1, p. 113-121, 2016.

KERSTEN, S.R.A.; WANG, X.; PRINS, W.; SWAAIJ, W.P. Biomass pyrolysis in a fluidized reactor. Part 1. Literature review and model simulations. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, v.44, n.23, p.8773–85. 2005.

KOHN, M. P.; CASTALDI, M. J.; FARRAUTO, R. J. Biogas reforming for syngas production: The effect of methyl chloride. *Applied Catalysis B: Environmental*, v. 144, p. 353-361, 2014.

KOROGLU, E.O.; OZDEMIR, O.K.; OZKAYA, B.; DEMIR, A. An integrated system development including PEM fuel cell/biogas purification during acidogenic biohydrogen production from dairy wastewater. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.44, n.32, p.17297-17303, 2019.

KRYVORUCHKO, V.; MACHMULLER, A.; BODIROZA, V.; AMON, B.; AMON, T. Anaerobic digestion of by-products of sugar beet and starch potato processing. *Biomass & Bioenergy*, v.33, p.620-627. 2009.

KUMAR, P., SHARMA, R., RAY, S., MEHARIYA, S., PATEL, S.K.S., LEE, J., KALIA, V.C. Dark fermentative bioconversion of glycerol to hydrogen by *Bacillus thuringiensis*. *Bioresour Technol*. 88, 182-353, 2015.

LARSEN, A.C.; BENEDITTO, M.G.; GOMES, S.D.; ZENATTI, D.C.; TORRES, D.G.B. Anaerobic co-digestion of crude glycerin and starch industry effluent. *Eng. Agric.*, v.33, n.2, p.341-352. 2013.

LAZARO CZ, VICH DV, HIRASAWA JS, VARESCHE MBA. Hydrogen production and consumption of organic acids by a phototropic microbial consortium. *International Journal of Hydrogen Energy*; 37: 11691-11700, 2012.

LI, C. L., FANG, H. H. P. Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures *Crit Rev Env Sci Technol*, 37, p. 1-39, 2017.

LIU, C.; LI, H.; ZHANG, Y.; SI, D.; CHEN, Q. Evolution of microbial community along with increasing solid concentration during high-solids anaerobic digestion of sewage sludge. *Bioresource Technology*, New York, v. 216, p. 87-94, 2016.

LIU, D., LIU, D., ZENG, R.J., ANGELIDAKI, I. Hydrogen and methane production from household solid waste in the two-stage fermentation process. *Water Res.* 40, 2230–2236, 2006.

LIU, X., LI, R., JI, M., HAN, L. Hydrogen and methane production by co-digestion of waste activated sludge and food waste in the two-stage fermentation process: substrate conversion and energy yield. *Bioresour. Technol.* 146, 317–323, 2013.

LO, Y.C., CHEN, X.J., HUANG, C.Y., YUAN, Y.J., CHANG, J.S. Dark fermentative hydrogen production with crude glycerol from biodiesel industry using indigenous hydrogen-producing bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy* 38(35), 15815-15822, 2013.

MAO C, FENG Y, WANG X, REN G. Review on research achievements of biogas from anaerobic digestion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v.45, p.540–555, 2015.

MANISH, S., BANERJEE, R. Comparison of biohydrogen production processes. *International Journal of Hydrogen Energy* 33(1), 279-286, 2008.

MARTÍN, M.A.; FERNÁNDEZ, R.; SERRANO, A.; SILES, J.A. Semi-continuous anaerobic co-digestion of orange peel waste and residual glycerol derived from biodiesel manufacturing. *Waste Management*, v.33, n.7, p.1633-1639. 2013.

MEKUTO, J., NTWAMPE, S. K. O., AKCIL, A. An integrated biological approach for treatment of cyanidation wastewater. *Science of the Total Environment*, v. 571, 711-720, 2016.

MORATO, M.M.; MENDES, P.R. da C.; CANI, A.A.; NORMEY-RICO, J.E.; CORDONS, C. Future hybrid local energy generation paradigm for the Brazilian sugarcane industry scenario. *International Journal of Electrical Power & Energy Systems*, v. 101, p. 139-150, 2018.

MOURA, R. B.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z, FORESTI, E. Nitrogen and carbon removal from synthetic wastewater in a vertical structured-bed reactor under intermittent aeration. *Journal of Environmental Management*, n. 98, p.163-167. 2012.

MU, Y., ZHENG, X.-J., YU, H.-Q., ZHU, R.-F. Biological hydrogen production by anaerobic sludge at various temperatures. *International Journal of Hydrogen Energy* 31(6), 780-785, 2006.

NARTKER, S.; AMMERMAN, M.; AURANDT, J.; STOGSDIL, M.; HAYDEN, O.; ANTLE, C. Increasing biogas production from sewage sludge anaerobic co-digestion process by adding crude glycerol from biodiesel industry. *Waste Management*, v. 34, p. 2567- 2571, 2014.

NASU, E. G. C.; FORMENTINI, H. M.; FURLANETTO, C. Effect of manipueira on tomato plants infected by the nematode *Meloidogyne incognita*. *Crop Protection*, v. 78, p. 193-197, 2015.

NTAIKOU, I., ANTONOPOULOU, G., LYBERATOS, G.. Biohydrogen production from biomass and wastes via dark fermentation: a review. *Waste Biomass Valorization* 1, 21–39, 2010.

NURUL, N. F., MIRUS, M. F., MANAL, I. Purification of crude glycerol from transesterification reaction of palm oil using direct method and multistep method. *Mater. Sci. Eng.*, p. 243, 2017.

OECD FAO Agricultural Outlook. OECD Publishing, Paris; 2013. http://dx.doi.org/10.1787/agr_outlook-2013-en

OKUDOH, V. TROIS, C. WORKNEH, T. SCHIDT, S. The potential of cassava biomass and applicable technologies for sustainable biogas production in South Africa: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 39, 1035-1052, 2014.

OLIVER, A. P. M., NETO, A. A. S., QUADROS, D. G., VALLADARES, R. E. Manual de treinamento em biodigestão, Energia Produtiva, IRES e Energia renovável & desenvolvimento, 2008.

OSAKI, M.; BATALHA, M.O. Produção de Biodiesel e Óleo Vegetal no Brasil: Realidade e Desafios. *Organizações Rurais & Agroindustriais*, v.13, n.2, p.227-242. 2011.

PARK, M.J., JO, J.H., PARQUE, D., LEE, D.S., MOON, P.J. Comprehensive study on a two-stage anaerobic digestion process for the sequential production of hydrogen and methane from cost-effective molasses. *International Journal of Hydrogen Energy* 35(12), 6194-6202, 2010.

PATCHAREE, I., PRAMOCH, R., POMTHONG, M., SUMAETH, C. Optimization of separate hydrogen and methane production from cassava wastewater using two-stage upflow anaerobic sludge blanket reactor (UASB) system under thermophilic operation *Bioresource Technology.*, 173, pp. 256-265, 2014.

PATEL, S. K. S.; MADINA, P.; KIM, D.; KIM, S.-Y.; KALIA, V. C.; KIM, I.-W.; LEE, J.-K. Improvement in methanol production by regulating the composition of synthetic gas mixture and raw biogas. *Bioresource Technology*, New York, v. 218, p. 202-208, 2016.

PDEE – Plano Decenal de Expansão de Energia. Ministério de Minas e Energia, Secretaria de Planejamento e Desenvolvimento Energético, 2018.

PEDROZA, M.M.; VIEIRA, G.E.G.; SOUSA, J.F.; PICKLER, A.C.; LEAL, E.R.M.; 39 MILHOMEN, C.C. Produção e tratamento de lodo de esgoto – uma revisão. *Revista Liberato*, v. 11, p. 150-160, 2010.

PENDYALA B, CHAGANTI SR, LALMAN JÁ, SHANMUGAM SR, HEATH DD, LAU PCK. Pretreating mixed anaerobic communities from different sources: Correlating the hydrogen yield with hydrogenase activity and microbial diversity. *International Journal of Hydrogen Energy* 37(17), 12175-12186, 2012.

PENTEADO ED, LAZARO CZ, SAKAMOTO IK, ZAIAT M. Influence of seed sludge and pretreatment method on hydrogen Production in packed-bed anaerobic reactors. *International Journal of Hydrogen Energy*; 38(14): 6137-6145, 2013.

PIMENTA, C. D., SILVA, M. B., SALOMON, V. A. P., PENTEADO, R. B., GOMES, F. M. Aplicação das metodologias Desirability e Simplex para otimização das propriedades mecânicas em arames de aço temperado. *Production*, 2014.

PIT, F. D., DOMINGOS, A. M., BARROS, A. A. C. Purification of residual glycerol recovered from biodiesel production. *South African Journal of Chemical Engineering*, 29, p. 42-51, 2019.

REN21 – Renewable Energy Policy Network for the 21st Century. *Renewables 2017 global status report*, 2017. http://www.ren21.net/wpcontent/uploads/2017/06/178399_GSR_2017_Full_Report_06_21_Opt.pdf

RIVERO, M.; SOLERA, R.; PEREZ, M. Anaerobic mesophilic co-digestion of sewage sludge with glycerol: Enhanced biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.39, p.2481-2488. 2014.

SALOMON, K. R.; LORA, E. E. S. Estimate of the electric energy generating potential for different sources of biogas in Brazil. *Biomass and Bioenergy*, v. 33, p. 1101-1107, 2009.

SCHIEVANO, A., TENCA, A., SCAGLIA, B., MERLINO, G., RIZZI, A., DAFFONCHIO, D., OBERTI, R., ADANI, F. Two-stage vs single-stage thermophilic anaerobic digestion: comparison of energy production and biodegradation efficiencies. *Environ. Sci. Technol.* 46, 8502–8510, 2012.

SEAB – Secretaria do Estado da Agricultura e do Abastecimento. *Mandiocultura – Análise da Conjuntura Agropecuária – 2012*.

SEMAN, S. Z. A.; IDRIS, I.; ABDULLAH, A.; SHAMSUDIN, I. K.; OTHMAN, M. R. Optimizing purity and recovery of biogas methane enrichment process in a closed landfill. *Renewable Energy*, v. 131, p. 1117-1127, 2019.

SERRANO, A.; SILES, J.A.; CHICA, A.F.; MARTIN, M.A. Improvement of mesophilic anaerobic co-digestion of agri-food waste by addition of glycerol. *Journal of Environmental Management*, v.140, p.76-82. 2014.

SHAN, X.; QIAN, Y.; ZHU, L.; LU, X. Effects of EGR rate and hydrogen / carbon monoxide ratio on combustion and emission characteristics of biogas / diesel dual fuel combustion engine. *Fuel*, v. 181, p. 1050-1057, 2016.

SILVA, G.P.D., MACK, M., CONTIERO, J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology *Biotechnol. Adv.*, 27, p. 30-39, 2009.

SILVA, F.M.S.; MAHLER, C.F.; OLIVEIRA, L.B.; BASSIN, J. P. Hydrogen and methane production in a two-stage anaerobic digestion system by co-digestion of food waste sewage sludge and glycerol. *Waste Management*, 76:339-349. 2018.

SITTIJUNDA, S., REUNGSANG, A., Biohydrogen production from waste glycerol and sludge by anaerobic mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy* 37(18), 13789-13796, 2012.

SRIVASTAVA, S., KUMAR, A., PANDEY, A., PANDEY, A. Intensification of hydrogen production by *B. licheniformis* using kitchen waste as substrate. *International Journal of Hydrogen Energy* 42, 21659-21666, 2017.

TALEGHANI, G.; KIA, A.S. Technical–economical analysis of the Saveh biogas power plant. *Renewable Energy*, v.30, p.441–6. 2005.

TORRES, D.G.B., LUCAS, DAL'MASO, S., ANDREANI, C.L., CARVALHO, K.Q. C., GOMES, S.D. Hydrogen production and performance of anaerobic fixed-bed reactors using three support arrangements from cassava starch wastewater. *Engenharia agricola* 37, 160-172, 2017.

WANG, J., & WAN, W. Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34 (2), p. 799-811, 2009^a.

WANG, J., & WAN, W. Application of desirability function based on neural network for optimizing biohydrogen production process. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(3), p. 1253-1259, 2009^b.

WANG, S., MA, Z., ZHANG, T., BAO, M., SU, H. Optimization and modeling of biohydrogen production by mixed bacterial cultures from raw cassava starch. *Frontiers of Chemical Science and Engineering* 11, 100-106, 2017.

WEI, P.; XIA, A.; LIAO, Q.; SUN, C.; HUANG, Y.; FU, Q.; ZHU, X.; LIN, R. Enhancing fermentative hydrogen production with the removal of volatile fatty acids by electro dialysis. *Bioresource Technology*, v.263, p.437-443, 2018.

WEISBURG, W.G., BARNS, S.M., PELLETIER, D.A., LANE, D.J. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *Journal of Bacteriology* 173(2), 697-703, 1991.

WELLINGER, A. Biogasprozess: Mögliche Probleme von A bis Z. In: 6. Jahrestagung Biogas e.V. Kirchberg, Germany; 1997. p. 1–8.

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

YE J, LI D, SUN Y, WANG G, YUAN Z, ZHEN F, WANG Y. Improved biogas production from rice straw by co-digestion with kitchen waste and pig manure. *Waste Management* 2013, 33(12): 2653-2658.

YOKOI, H., TOKUSHIGE, T., HIROSE, J., HAYASHI, S., TAKASAKI, Y. H₂ production from starch by a mixed culture of *Clostridium butyricum* and *Enterobacter aerogenes*. *Biotechnol. Lett.* 20(2), 143-147, 1998.

ZHANG T, LIU H, FANG HHP. Biohydrogen production from starch in wastewater under thermophilic condition. *Journal of Environmental Management*; 69(2): 149-156, 2003.

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

ZHIPENG, L., ZHEN, C., HONG, Y., YUANPENG, W., WEIANG, L., JO-SHU, C., QINGBIAO, L., NING, H. Anaerobic co-digestion of sewage sludge and food waste for hydrogen and VFA production with microbial community analysis. *Waste Management* 78, 789-799, 2018.

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