

Valorização energética do glicerol através da digestão anaeróbia

Larissa Oliveira Paulista

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança
para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia Ambiental*

Orientado por

**Professor Doutor Ramiro José Espinheira Martins
Professor Doutor Alexei Lorenzetti Novaes Pinheiro**

**Bragança
2017**

Valorização energética do glicerol através da digestão anaeróbia

Larissa Oliveira Paulista

Aos: meus pais,
Dulcinéia e Marcos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por me proporcionar a oportunidade de pesquisar o tema de digestão anaeróbia que gosto muito e por toda sabedoria adquirida.

Ao Professor, Doutor Ramiro José Espinheira Martins, do Departamento de Tecnologia Química e Biológica da ESTiG-IPB, orientador deste trabalho, por todos os ensinamentos transmitidos.

Ao Professor, Doutor Alexei Lorenzetti Novaes Pinheiro, do Departamento de Engenharia Ambiental, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), também orientador deste trabalho por todo conhecimento, auxílio e disponibilidade.

Às técnicas de laboratório Eng^a Maria João Afonso (Laboratório de Processos Químicos) e Dra. Paula Marina de Sousa Plasencia Matos (Laboratório de Química Analítica), pelo carinho, paciência e auxílio em todos os momentos.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Londrina, por todo apoio, conhecimento e credibilidade. Em especial, a Professora Sueli Tavares de Melo Souza que me acompanhou em todo o processo da Dupla Diplomação e o apoio acadêmico da Professora Tatiane Cristina Dal Bosco.

Aos professores do Instituto Politécnico de Bragança (IPB), que foram extremamente cuidadosos e que contribuíram para esse projeto. Agradeço aos Professores António Manuel Coelho Lino Peres, Altino Branco Choupina, Maria da Conceição Constantino Fernandes, Manuel Joaquim Sabença Feliciano e Jorge Paulo.

A parceria realizada com a Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, com o Laboratory of Separation and Reaction Engineering LSRE-LCM. Aos Profesores Rui Alfredo da Rocha Boaventura e Vítor Jorge Pais Vilar e também ao doutorando Jonathan Cawettiere Almeida Espíndola.

A disponibilidade e auxílio da empresa Águas do Norte, em especial a Eng^a Ana Sousa.

A vida nos surpreende com muitos desafios e a minha família sempre esteve presente, por isso, agradeço de coração por todo apoio nos momentos difíceis, por compartilharmos todas as alegrias e conquistas. Em especial aos meus pais, Marcos e Dulcineia, por todo carinho, amor e pelos sacrifícios superados. Por serem meu alicerce e minha inspiração para eu seguir. Também aos meus irmãos, Izabela e Gustavo, que sempre me proporcionaram amizade e companheirismo. E aos meus avós, Gilberto, Geralda e Victalina, que sempre estiveram torcendo pela minha felicidade.

Ao meu noivo, Pedro Henrique Presumido, que me acompanhou durante toda a minha jornada acadêmica, depositando em mim apoio, carinho, amor e confiança.

A todos os demais familiares e amigos, que sempre me incentivaram a seguir em frente e alcançar os objetivos que almejo. Em especial, os amigos de intercâmbio, Catarina e Obete.

Este trabalho foi em parte financiado pelo Projeto POCI-01-0145-FEDER-006984 - Laboratório Associado LSRE-LCM - financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER), através do COMPETE2020 – Programa Operacional Competitividade e Internacionalização (POCI) e por fundos nacionais através da Fundação para a Ciência e a Tecnologia.



RESUMO

A fim de diminuir a dependência dos combustíveis fósseis e cumprir a legislação Europeia, o consumo de biodiesel tendo vindo a aumentar significativamente. A produção desse combustível gera como subproduto o glicerol, que em excesso no mercado pode ter impacto até no valor comercial do biodiesel. Apesar do glicerol ser utilizado para outros fins industriais, o seu teor de impurezas limita o seu processamento. A digestão anaeróbia do glicerol é uma alternativa que vem sendo estudada para sua valorização através da geração de metano. A carga do glicerol ($1800 \text{ g CQO.L}^{-1}$) pode provocar um stress cinético que acarreta a inibição dos microrganismos metanogénicos. Dessa forma, esse trabalho teve como objetivo principal testar alternativas de pré-tratamentos com ultrassons e exposição a microrganismos, utilizando o *Aspergillus niger* e *Escherichia coli* e posterior digestão anaeróbia do glicerol. Inicialmente num digestor batch de mistura completa (500 mL), foram utilizadas na alimentação concentrações de glicerol de 0,2, 1,7 e 3,2%, testados diferentes tempos de exposição do glicerol a ultrassons (3 a 15 h) e degradação prévia do glicerol por microrganismos *Aspergillus niger* e *Escherichia coli*. Os melhores resultados foram replicados em um reator *Upflow Anaerobic Sludge Blanket* (UASB) de 16,5 L de volume útil. O reator UASB apresentou um Tempo de Retenção Hidráulico (TRH) de 11,5 d. Com alimentação em contínuo com carga orgânica de: (A) $0,34 \text{ kg CQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ (semana 1-3); (B) $0,34 \text{ kg CQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1} + 15 \text{ h}$ de ultrassons (semana 4-5); (C) $1,56 \text{ kg CQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ (semana 6-8); (D) $1,56 \text{ kg CQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1} + A. niger$ (semana 9-10). Os melhores resultados no reator batch foram obtidos para a concentração de 0,2% de glicerol e 15 h de ultrassons, obtendo-se 77% de metano e uma produção de $1153 \text{ L CH}_4.\text{kg}^{-1}$ de glicerol; para concentração de 1,7% de glicerol com *A. niger*, o volume gerado foi de $117 \text{ L CH}_4.\text{kg}^{-1}$, a que correspondeu uma qualidade do gás de 65% de metano. Para a concentração de 3,2% verificou-se uma inibição em todos os ensaios experimentais. No reator UASB, o pré-tratamento com ultrassons (B) permitiu obter $4000 \text{ L CH}_4.\text{kg}^{-1}$ glicerol e o *A. niger* (D) proporcionou uma produção de $1000 \text{ L CH}_4.\text{kg}^{-1}$. O valor energético do biogás gerado, no pré-tratamento com ultrassons evidenciou um aumento de 43% no valor agregado ($5,8 \text{ €}.\text{kg}^{-1}$ glicerol) e 87% ($306 \text{ €}.\text{kg}^{-1}$ SV) face ao ensaio sem pré-tratamento, enquanto que o pré-tratamento com o *A. niger* proporcionou um aumento de 4 vezes na produção de metano ($101 \text{ €}.\text{kg}^{-1}$ SV). Os valores mais elevados da remoção de CQO (60 - 69%) e ST (74%), bem como a menor concentração de ácidos carboxílicos no material digerido (88 g.L^{-1}), correspondem igualmente ao ensaio experimental mais favorável (B). No processo de digestão anaeróbia em ambos os ensaios, batch e em contínuo, foi registada a formação de ácidos carboxílicos (oxálico, propiónico e glutárico). A utilização do *A. niger* no pré-tratamento favoreceu a formação de lípase, o que resultou na produção máxima de ácido glutárico, 325 mg.L^{-1} na semana 10. A produção de ácido oxálico ocorreu durante todo o período experimental, com maiores concentrações para alimentação de $1,56 \text{ kg CQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, variando entre 11 e 13 mg.L^{-1} , a que correspondem as menores produções de metano.

Palavras-chave: Biogás, Glicerol, Metano, Microrganismo, Pré-Tratamento, Ultrassons, *Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor*, Valorização Energética.

ABSTRACT

In order to reduce the dependence on fossil fuels and comply with European legislation the consumption of biodiesel is increasing significantly. The production of this fuel generates glycerol as by-product, whose excess in the market can influence the commercial value of biodiesel. Although glycerol is used for several industrial purposes, the impurity content of the residual glycerol limits its processing. The anaerobic digestion of glycerol to produce energy through the generation of methane is an alternative for its valorization. The high organic load of crude glycerol ($1800 \text{ g}^{-1} \text{ COD.L}^{-1}$) can cause kinetic stress that leads to the inhibition of methanogenic microorganisms. Thus, this work had as main objective to test alternative pre-treatments of the reactor feed with ultrasound and microorganisms, namely, *Aspergillus niger* and *Escherichia coli* prior to the anaerobic digestion of glycerol. Initially it was performed tests using a continuous stirred-tank reactor in batch operation (500 ml), with glycerol concentrations of 0.2, 1.7 and 3.2%, pre-treated by sonication for different times (3 to 15 h) and by previous degradation with either *A. niger* or *E. coli* microorganisms. The best performance in the batch reactor was observed for glycerol concentration of 0.2% sonicated for 15 h, which yielded 77% of methane with a production of $1153 \text{ L CH}_4.\text{kg}^{-1}$. A good performance was also obtained with glycerol concentration of 1.7% pretreated with *A. niger* with 65% yield of methane and production of $117 \text{ L CH}_4.\text{kg}^{-1}$. The glycerol concentration of 3.2% resulted in inhibition in all experimental trials. The best conditions were replicated in an Upflow Anaerobic Sludge Blanket Digestion (UASB) reactor, with volume of 16.5 L. The UASB reactor had a Hydraulic Retention Time (HRT) of 11.5 d. The feeding was carried out with an organic load of: (A) $0.34 \text{ kg COD.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ (week 1-3); (B) $0.34 \text{ kg COD.m}^{-3}.\text{d}^{-1} + 15 \text{ h ultrasound}$ (week 4-5); (C) $1.56 \text{ kg COD.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ (week 6-8); (D) $1.56 \text{ kg COD.m}^{-3}.\text{d}^{-1} + A. niger$ (week 9-10). The experiments were also done without the pre-treatments for comparison. In the UASB reactor, the feed pre-treated with ultrasound resulted in a methane yield of $4000 \text{ L CH}_4.\text{kg}^{-1}$ glycerol and the feed pre-treated with *A. niger*, a methane yield $1000 \text{ L CH}_4.\text{kg}^{-1}$ glycerol. Calculation of the energetic value of the biogas generated showed that the ultrasound pre-treatment provided a 43% increase in the value added of the residual glycerol ($5.8 \text{ €}.\text{kg}^{-1}$ glycerol) and 87% ($306 \text{ €}.\text{kg}^{-1}$ VS). Whereas the pre-treatment with *A. niger* provided 4 times the production of methane ($1.6 \text{ €}.\text{kg}^{-1}$ glycerol and $101 \text{ €}.\text{kg}^{-1}$ VS). The highest methane yields occurred with $1.56 \text{ kg COD.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ and pre-treatment with ultrasound for 15 h (B). This result was confirmed by the higher removals of COD (60-69%) and ST (74%), also by to the lower concentration of carboxylic acids in the digested material, which amounted to 88 g.L^{-1} . The formation of the oxalic, propionic and glutaric acids was observed in both UASB and batch reactors. The use of *A. niger* in pre-treatment favored lipase formation, which resulted in the maximum amount of glutaric acid observed of 325 mg.L^{-1} at week 10. The production of oxalic acid was observed during the whole sampled period for the higher feed concentration of $1.56 \text{ kg COD.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, with variable amounts in the range between 11 and 13 mg.L^{-1} , when lower methane yields were recorded. The highest propionic acid production was observed for the higher feed load of $0.34 \text{ kg COD.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, in which the phosphorus consumption was higher compared to the same load treated with ultrasound.

Keywords: Biogas, Glycerol, Methane, Microorganism, Pretreatment, Ultrasound, Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor, Energy Recovery.

Índice

1	Introdução	1
1.1	Organização e estrutura do trabalho	2
2	Biocombustíveis	3
2.1	Biodiesel	3
2.1.1	Produção mundial.....	4
2.1.2	União Europeia.....	5
2.1.3	Portugal	6
2.2	Projeção da evolução de produção de biodiesel	6
2.3	Matérias-primas	8
2.4	Os processos de produção de biodiesel.....	9
3	Glicerol	11
3.1	Problema do glicerol na atualidade.....	11
3.2	Características físico-químicas	11
3.3	Estudos para a valorização do glicerol.....	13
3.4	Digestão anaeróbia.....	13
3.4.1	Tipo e configuração do digestor.....	16
3.4.2	Tipo de digestor anaeróbio	17
3.4.3	Parâmetros operacionais em sistema contínuo.....	17
3.5	Digestão anaeróbia do glicerol	19
3.5.1	Efeito inibitório	19
3.5.2	Carga aplicada na digestão anaeróbia do glicerol	20
3.5.3	Vias metabólicas do glicerol	23
4	Mecanismos para melhorar a digestão anaeróbia	25
4.1	Físicos	25
4.2	Biológicos	26
4.2.1	Aspergillus niger	27
4.2.2	Yarrowia lipolytica.....	27
4.2.3	Escherichia coli	27
5	Objetivos	29
5.1.1	Geral.....	29
5.1.2	Específico	29
6	Materiais e Métodos	31
6.1	Parâmetros analisados.....	31
6.1.1	Parâmetros físico-químicos	31

6.1.2	HPLC.....	32
6.2	Caracterização do glicerol e do inóculo.....	33
6.3	Reator batch de mistura completa.....	34
6.3.1	Inóculo (avaliação da qualidade da lama).....	35
6.3.2	Pré-tratamento do glicerol bruto	36
6.4	Ensaio em contínuo usando um reator UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket Digestion)	39
6.4.1	Reator UASB.....	39
6.4.2	Ensaio experimental em reator UASB	40
7	Resultados e Discussão	43
7.1	Caracterização.....	43
7.1.1	Caracterização do substrato (glicerol).....	43
7.1.2	Caracterização do inóculo (lama do reator anaeróbio).....	44
7.2	Via metabólica e degradação do glicerol	44
7.3	Reator de mistura completa em batch.....	46
7.3.1	Efeito da lama no processo de digestão anaeróbia.....	46
7.3.2	Efeito do pré-tratamento do glicerol por ultrassons no desempenho do processo de digestão anaeróbia.....	51
7.3.3	Efeito do pré-tratamento do glicerol por microrganismos no desempenho do processo de digestão anaeróbia.....	57
7.3.4	Comparação da eficiência do processo de digestão anaeróbia em função do pré-tratamento aplicado ao glicerol	63
7.4	Reator UASB	71
7.4.1	Temperatura interna no reator UASB	71
7.4.2	Variação do pH ao longo do tempo no reator UASB.....	72
7.4.3	Carência Química de Oxigênio (CQO) no reator UASB	74
7.4.4	Concentração de fósforo total no reator UASB	75
7.4.5	Avaliação da concentração de sólidos no reator UASB.....	76
7.4.6	Ácidos carboxílicos formados no processo de digestão anaeróbia no UASB	77
7.4.7	Produção de biogás e metano em reator UASB	78
8	Conclusões.....	83
9	Referências bibliográficas.....	85

Índice de Figuras

Figura 1: Produção de biodiesel na EU (EBB, 2015).....	5
Figura 2: Projeção da distribuição de produção e uso mundiais do biodiesel em 2024 (Relatório da FAO/ONU, 2015).	7
Figura 3: Projeção da produção e comércio mundial de biodiesel até 2024 (Relatório da FAO/ONU, 2015).	8
Figura 4. Reação de Transesterificação (retirado de Zhang, <i>et al.</i> , 2003).....	9
Figura 5: Etapas do processo de digestão anaeróbia (Probiogás, 2010).....	15
Figura 6: Vias metabólicas do glicerol (Viana, 2011 retirado de Silva <i>et al</i> , 2009 e Biebl <i>et al.</i> , 1999).....	24
Figura 7: Reator batch com sensor de metano, fluxímetros e unidade de aquisição de dados.....	34
Figura 8: Avaliação de microrganismos para auxiliar a digestão anaeróbia.	37
Figura 9: Equipamento de ultrassons.....	38
Figura 10: Ilustração experimental do reator UASB.	40
Figura 11: Reator aeróbio utilizado para alimentação do reator UASB com glicerol pré-tratado com <i>Aspergillus niger</i>	42
Figura 12: Concentração de sólidos (totais, voláteis e fixos) nas lamas dos reatores anaeróbios da ETAR de Vila Real (DA-VR) e Vila do Conde (DA-VC).....	44
Figura 13: Formação de ácido propiónico a partir de glicerol (modificado Biebl <i>et al.</i> , 1999 e Silva <i>et al.</i> , 2009).....	45
Figura 14: Formação do ácido oxálico a partir de glicerol (modificado Kwon e Koper, 2010).....	45
Figura 15: Efeito da concentração de glicerol e do tipo de lama na produção de biogás, metano e na remoção de CQO para o reator batch.	47
Figura 16: Gráfico de Pareto de efeitos padronizados (CQO e SV) sobre a qualidade do biogás formado.	48
Figura 17: Volume de biogás e metano, no reator em batch, para as lamas DA-VR e DA-VC.	49
Figura 18: CQO para os ensaios experimentais em batch, usando dois tipos de lama... 49	
Figura 19: Concentração de ácidos carboxílicos no final do ensaio experimental para as duas lamas testadas.....	51

Figura 20: Relação da E_{esp} e da concentração de substrato com os parâmetros analisados.	53
Figura 21: Volume acumulado de biogás e de metano: pré-tratamento do glicerol por ultrassons.	54
Figura 22: Remoção da CQO: pré-tratamento do glicerol, por ultrassons.	55
Figura 23: Concentração de ácidos carboxílicos no subproduto da digestão, com pré-tratamento por ultrassons.	57
Figura 24: Interação dos parâmetros concentração de glicerol e pré-tratamento por microrganismos na produção de metano, na % CH_4 no biogás e na remoção da CQO para o reator batch.	58
Figura 25: Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados (% glicerol e microrganismo) para a resposta à produção de metano por massa de CQO.	59
Figura 26: Volume acumulado de biogás e de metano: pré-tratamento do glicerol por <i>Aspergillus niger</i> e <i>Escherichia coli</i>	61
Figura 27: Remoção de CQO: pré-tratamento do glicerol por <i>Aspergillus niger</i> e <i>Escherichia coli</i>	61
Figura 28: Produção de ácidos carboxílicos no material digerido da digestão anaeróbia do glicerol com pré-tratamento com microrganismos <i>A. niger</i> e <i>E. coli</i>	62
Figura 29: Produção de metano para três concentrações de glicerol utilizadas no reator em batch sem e com pré-tratamento (físico e biológico).	64
Figura 30: Volume de metano produzido nos ensaios: 0,2% de glicerol e 15 h de ultrassons e 1,7% de glicerol com pré-tratamento por <i>A. niger</i>	65
Figura 31: Carência Química de Oxigênio nos instantes inicial, 15 e 30 dias, para os ensaios experimentais realizados.	68
Figura 32: Concentração de sólidos nos instantes inicial, 15 e 30 dias para os ensaios experimentais realizados.	68
Figura 33: Concentração de ácidos carboxílicos ao fim de 30 dias para os ensaios experimentais realizados.	69
Figura 34: Valor económico do metano produzido por digestão anaeróbia do glicerol.	71
Figura 35: Evolução da temperatura interna do reator UASB durante os 75 dias do estudo.	72
Figura 36: Variação do pH no interior do reator UASB durante o estudo experimental.	73

Figura 37: Valores do pH na entrada e na saída do reator durante as semanas do estudo.	73
Figura 38: Valores de CQO na entrada e na saída do reator durante as semanas do estudo.....	74
Figura 39: Evolução da concentração de fósforo total na entrada e na saída do reator durante as semanas do estudo.....	75
Figura 40: Razão SV/ST nos pontos de amostragem 1 e 2 no reator UASB.	76
Figura 41: Concentração de sólidos totais na entrada e saída no reator UASB.	77
Figura 42: Concentração de ácidos carboxílicos na corrente de saída do reator UASB para o período de estudo.....	78
Figura 43: Produção de biogás e metano no reator UASB em contínuo.	80
Figura 44: Variação da percentagem de metano no reator UASB.	81
Figura 45: Valor económico do biogás gerado no reator UASB.....	82

Índice de Tabelas

Tabela 1: Características físico-químicas do glicerol.....	12
Tabela 2: Cargas de glicerol adicionadas e os resultados obtidos de acordo com as referências bibliográficas.....	22
Tabela 3: Métodos analíticos para determinação dos parâmetros físico-químicos.	31
Tabela 4: Ácidos carboxílicos avaliados por HPLC.....	33
Tabela 5: Componentes do sistema de digestão em batch.....	35
Tabela 6: Planejamento experimental para avaliação da qualidade da lama através do <i>design fatorial 2²</i>	36
Tabela 7: Meio de cultivo líquido para atividade lipásica.....	37
Tabela 8: Planejamento fatorial utilizando microrganismos <i>A. niger</i> e <i>E. coli</i> através do <i>design fatorial 2²</i>	38
Tabela 9: Planejamento fatorial utilizando ultrassons através do <i>design fatorial 2²</i>	39
Tabela 10: Parâmetros monitorizados do reator UASB e frequência de amostragem. ..	41
Tabela 11: Caracterização do glicerol residual.....	43
Tabela 12: Aplicação dos ácidos carboxílicos derivados do glicerol.....	46
Tabela 13: Produção de biogás e metano para alimentação com diferentes % de glicerol e lama do DA-VR e do DA-VC.....	50
Tabela 14: Produção de biogás e metano nos ensaios experimentais com pré-tratamento do glicerol por ultrassons.....	56
Tabela 15: Produção de biogás e metano utilizando uma etapa prévia de tratamento do glicerol por microrganismo.	60
Tabela 16: Produção de metano a partir da digestão anaeróbia do glicerol.	65
Tabela 17: Resumo dos ensaios experimentais realizados para digestão anaeróbia do glicerol.....	66
Tabela 18: Produção de ácidos carboxílicos no presente estudo e na literatura.....	70

Lista de siglas e abreviações

ACH₄	Rendimento de Metano
AGV	Ácidos Gordos Voláteis
AN	<i>Aspergillus niger</i>
N_{total}	Azoto Total
C	Concentração de Matéria Orgânica Seca
CH₄ (%)	Percentagem de metano
CIT	Carbono Inorgânico Total
COT	Carbono Orgânico Total
COV	Carga Orgânica Volumétrica
CQO	Carência Química de Oxigênio
CSTR	<i>Continuous Stirred-Tank Reactor</i>
CT	Carbono Total
DA-VC	Digestor Anaeróbio de Vila do Conde
DA-VR	Digestor Anaeróbio de Vila Real
EC	<i>Escherichia coli</i>
Espec	Energia específica de entrada
ETAR	Estação de Tratamento de Águas Residuais
G	Concentração de glicerol
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
m	Caudal mássico
M	Microrganismo
m_{in}	Massa da matéria fresca introduzida
m_{in}	Massa dos biofertilizantes
m_{MOS}	Matéria Orgânica Seca Introduzida
MOS	Teor de matéria orgânica seca
MOS_{sa}	Teor de matéria orgânica seca da saída do biodigestor
MOS_{sub}	Teor de matéria orgânica seca da matéria fresca introduzida
η_{MOS}	Taxa de degradação
P	Fósforo
P_{CH₄}	Produção de metano
P_{ot}	Potência dos ultrassons
P_{total}	Fósforo total
Q	Caudal diário
S_{0,2%}	Substrato com 0,2% de glicerol
S_{1,7%}	Substrato com 1,7% de glicerol
S_{3,2%}	Substrato com 3,2% de glicerol
SDT	Sólidos Dissolvidos Totais
SF	Sólidos Fixos Totais
SSF	Sólidos Suspensos Fixos
SST	Sólidos Suspensos Totais

SSV	Sólidos Suspensos Voláteis
ST	Sólidos Totais
SV	Sólidos Voláteis
T	Tempo de duração dos ultrassons
TRH	Tempo de Retenção Hidráulico
UASB	<i>Upflow Anaerobic Sludge Blanket</i>
V₁	Volume de lama sonificado
V_{CH4}	Produção de Metano
V_r	Volume do Reator

1 Introdução

Devido ao crescimento do consumo e da população, a procura por combustíveis vem aumentando significativamente (Habibullah *et al.*, 2014). Dessa forma, torna-se imperioso investir na produção de combustíveis a partir de fontes renováveis, a fim de diminuir a dependência dos combustíveis fósseis e impactos no ambiente (Sundus *et al.*, 2017).

O biodiesel é uma alternativa para diminuir alguns poluentes como material particulado, monóxido de carbono, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e óxidos de enxofre em relação ao diesel de petróleo (Ghobadian *et al.*, 2009; Balat e Balat, 2010; Hassan e Kalam, 2013). Além disso, sua produção pode ser oriunda de óleo de origem vegetal ou animal (fonte renovável), dessa forma, atinge diversas fontes de matérias-primas que podem atender regiões com diferentes climas (REN21, 2015).

A produção de biodiesel gera como subproduto o glicerol bruto, que pode ser utilizado noutros processos industriais. Este possui pureza que varia de 23% a 87% (Hu *et al.*, 2012; Dobrowolski *et al.*, 2016), por isso, dependendo da sua utilização, é necessário retirar as impurezas aderidas ao glicerol, que encarece o preço de venda, podendo tornar-se inviável economicamente (Pagliaro *et al.*, 2007; Leoneti *et al.*, 2012). Além disso, com o aumento da produção de biodiesel há uma geração excedentária de glicerol, o que ocasiona uma desvalorização comercial e ainda impacto no preço do biodiesel. Dessa forma, torna-se interessante pesquisar outras formas de valorizar o glicerol (Leoneti *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2012).

Um meio de valorização do glicerol é a sua biotransformação, recorrendo a microrganismos, em compostos com maior valor económico agregado. Dessa forma, sistemas de digestão anaeróbia vêm sendo estudados, em que se utiliza o glicerol bruto como substrato para a produção de metano e hidrogénio (Fountoulakis e Manios, 2009; Viana, 2011; Razaviarani e Buchanan, 2015; Pachapur *et al.*, 2016).

Além disso, a utilização de microrganismos específicos como *Aspergillus niger*, *Escherichia coli* e *Yarrowia lipolytica* (Abdella *et al.*, 2016; Dobrowolski *et al.*, 2016; Valle *et al.*, 2017) podem utilizar o glicerol e seguir suas vias metabólicas até a produção de hidrogénio, etanol, ácido cítrico, 1,3-propanodiol, entre outros (Rivaldi *et al.*, 2007; Moon *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2009; Mazumdar *et al.*, 2010; Viana, 2011; Chatzifragkou e Papanikolaou, 2012; Przystałowska *et al.*, 2015).

O objetivo deste trabalho foi estudar a valorização energética do glicerol recorrendo ao processo de digestão anaeróbia e melhorar a eficiência com o uso de pré-tratamentos com ultrassons e microrganismos (*Escherichia coli* e *Aspergillus niger*).

1.1 Organização e estrutura do trabalho

A estrutura da dissertação está organizada por capítulos. O primeiro capítulo busca realizar uma breve introdução com uma visão geral do estudo e seus objetivos.

O segundo capítulo apresenta os conceitos sobre o biodiesel e os principais produtores mundiais e na União Europeia, como também a produção e consumo em Portugal. Além disso, neste capítulo é mostrado uma projeção da produção e do consumo de biodiesel baseada nos acordos políticos atuais. Foi abordada a utilização de diferentes matérias-primas de acordo com cada região, o processo de produção de biodiesel e a formação do subproduto glicerol.

O terceiro capítulo contém a problemática atual do glicerol e como este subproduto é utilizado. Também aborda sua caracterização físico-química e os estudos atuais para sua valorização energética. Entre os estudos que foram realizados focou-se na digestão anaeróbia com base no seu sistema de funcionamento, nos tipos de digestores e também nos parâmetros operacionais. Foi realizada também uma abordagem dos principais efeitos inibitórios da digestão anaeróbia, assim como a carga aplicada em estudos recentes sobre o tema e as vias metabólicas microbiológicas do glicerol.

O quarto capítulo apresenta alguns mecanismos biológicos e físicos para melhorar a digestão anaeróbia. Nos mecanismos biológicos são apresentados alguns microrganismos específicos para a degradação de lipídeos e no mecanismo físico apresenta-se o ultrassom como auxiliar para a degradação de compostos.

No quinto capítulo apresenta os objetivos gerais e específicos do trabalho.

No sexto capítulo, foi exposta a metodologia utilizada no estudo em relação aos parâmetros a serem analisados, assim como o tipo de digestor e as proporções que foram trabalhadas.

E no sétimo capítulo foi realizado uma abordagem dos resultados atingidos pelas pesquisas e metodologias utilizadas.

Por fim, no sétimo capítulo, apresentou-se as principais conclusões obtidas com o trabalho.

2 Biocombustíveis

A produção de biodiesel utiliza fontes de energia renováveis, que podem ser óleos vegetais, óleos animais ou óleos reaproveitados. Como as fontes de matéria-prima são diversas, a escolha depende do tipo de clima da região de produção, sendo óleos vegetais os comumente utilizados. Esses óleos passam pelo processo de transesterificação, ou seja, é adicionado álcool ao óleo formando ésteres dos ácidos gordos e glicerol (Sundus *et al.*, 2017). Os ésteres são purificados até se obter o biodiesel e o glicerol residual passa a ser um subproduto do processo. Como subproduto possui certo valor agregado, o glicerol tem aplicações em diversos tipos de indústria, alimentar, farmacêutica e cosmética.

Com a crescente procura por combustíveis de fontes renováveis, a produção do biodiesel passa a crescer a cada ano. Entretanto o mercado que recebe o glicerol é insuficiente para atender esse crescimento. Isso resulta em um excedente no mercado e certamente na perda do valor agregado, que gera impactos significativos até mesmo no valor do biodiesel. Dessa forma vêm sendo estudadas formas alternativas de se valorizar o glicerol excedentário.

Uma das possibilidades equacionadas é por processos de digestão anaeróbia, em que se gera biogás, que pode ser convertido em energia (térmica ou elétrica). Além disso, no material biodigerido podem existir diferentes compostos a serem comercializados: 1,3-propanodiol, ácido cítrico, acetilcoenzima-A, entre outros.

2.1 Biodiesel

Segundo a Diretiva 2009/28/CE do Parlamento Europeu e do Conselho relativa à promoção da utilização de energia proveniente de fontes renováveis, define biodiesel como: “Biodiesel: éster metílico produzido a partir de óleos vegetais ou animais, com qualidade de combustível para motores diesel, para utilização como biocombustível”.

O biodiesel é denominado biocombustível por derivar de biomassa, uma fonte renovável de energia. Apresenta origem renovável e não fóssil, sendo constituído por carbono neutro, isso significa que sua obtenção e queima não contribuem para o aumento do gás carbônico na atmosfera (Ghobadian *et al.*, 2009; Hassan e Kalan, 2013). Dessa forma, reduz significativamente a geração de gases do efeito estufa comparado com combustíveis fósseis (Dhamodaran *et al.*, 2017). Apesar do aumento da emissão

dos compostos nitrogenados, o biodiesel tem potencial de reduzir alguns poluentes como os materiais particulados, monóxido de carbono, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (compostos cancerígenos) e óxidos de enxofre em relação ao diesel do petróleo (Balat e Balat, 2010).

A utilização do biodiesel tem forte impacto socioeconômicos, proporciona independência em relação ao petróleo e promove o desenvolvimento rural (EBB, 2015). Além disso, os gastos de exploração da matéria-prima são menores comparados com a exploração petrolífera em poços profundos (Ghobadian *et al.*, 2009) e, não são necessárias alterações nos motores de ciclo diesel podendo ser aplicado nos automóveis atuais (Barbosa *et al.*, 2006). O biodiesel é completamente miscível com o diesel convencional e várias misturas de biodiesel podem ser utilizados nos atuais motores de ignição por compressão sem qualquer modificação (Sundus *et al.*, 2017).

O biodiesel apresenta um teor energético em massa de 37 MJ.kg^{-1} , inferior ao do gásóleo que é de 43 MJ.kg^{-1} (União Europeia, 2009), mas em compensação, o consumo energético do motor é menor quando se utiliza biodiesel como combustível (Barbosa *et al.*, 2006).

2.1.1 Produção mundial

A decisão em produzir mais biocombustíveis e a procura pelos consumidores vem sendo determinada por um conjunto de políticas de energia, bioenergia, agricultura e incentivos (HLPE, 2013). Como o biodiesel provém de fontes renováveis, cada vez mais a tendência é aumentar sua utilização no mercado e diminuir a dependência por combustíveis fósseis. Um crescimento exponencial na produção de biodiesel foi observado entre os anos de 2000 e 2010, com a produção a variar de 1 Mt para 16 Mt concentrados na Europa (Alemanha, França e Itália) (EBB, 2015), Estados Unidos, Brasil, Argentina e outros (UFOP-Schriften, 2011). No ano de 2004 a produção de biodiesel foi de 2,4 bilhão de litros, sendo que dez anos depois a produção aumentou 12 vezes, atingindo os 29,7 bilhão de litros (REN21, 2015). Os maiores produtores em 2013 foram: Estados Unidos (20,8%), Alemanha (11,2%), Brasil (9,9%), Indonésia (8,4%), França (8,4%) e Argentina (8,3 %) (NEEE, 2015).

2.1.2 União Europeia

Em 2014 a produção de biodiesel na União Europeia (UE) foi de 23,1 milhões de toneladas (Figura 1); sendo os maiores produtores (em milhão de toneladas) a Alemanha com 4,6, Espanha 4,2, Holanda com 2,5, França 2,4 Itália 1,8, Polônia 1,3 e outros países com 6,2 (EBB, 2016).

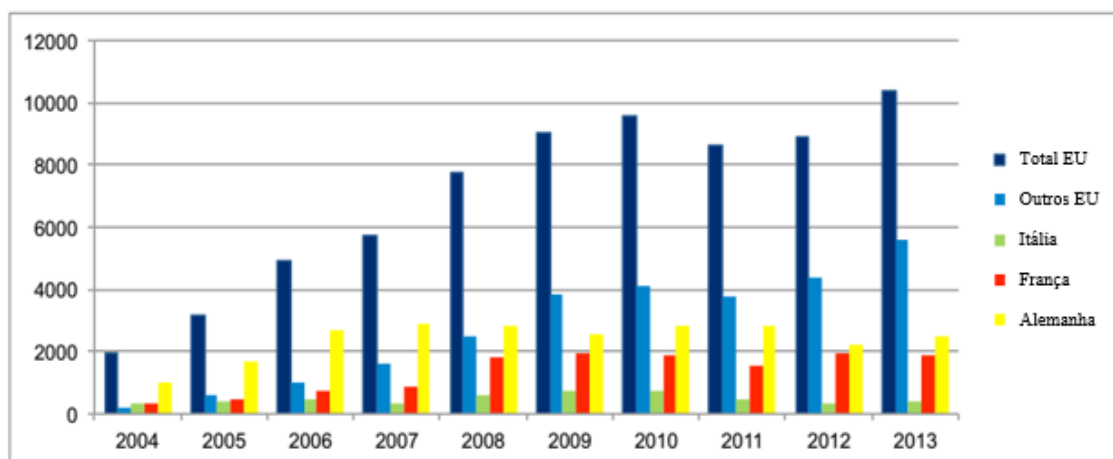


Figura 1: Produção de biodiesel na EU (EBB, 2015).

Através do 7º Programa Geral da Ação da UE para 2020 (Comissão Europeia, 2013) a UE está destinada a: (i) assegurar investimentos para a política do ambiente e do clima e considerar os custos ambientais de quaisquer atividades da sociedade; (ii) tornar as cidades da União mais sustentáveis; (iii) ajudar a União a abordar o ambiente internacional e as alterações climáticas de forma mais eficiente.

Essas medidas implicam na utilização de meios de transporte que diminuam as emissões ao longo do ciclo de vida dos combustíveis (desde a extração até à distribuição) e que sejam provenientes de fontes de energia renovável. A cota de energias renováveis nos transportes deverá atingir 10% a cada país da UE até 2020 (Diretiva nº 28, 2009), em relação ao setor dos transportes, o biodiesel é o primeiro contribuinte para a meta seguido pelo bioetanol.

A UE é a segunda maior economia mundial e consome um quinto da energia produzida a nível mundial, entretanto possui poucas reservas energéticas. Por isso, necessita comprar petróleo da Organização dos Países Exportadores de Petróleo e à Rússia, isso implica um gasto de € 350.000,00 (trezentos e cinquenta mil euros) por ano e aumento do custo de energia. O setor de energia depende 80% dos combustíveis

fósseis, cuja combustão emite dióxido de carbono (CO₂) (EBB, 2015; EBB, 2016). A UE busca diminuir o consumo de combustíveis fósseis e passa a investir em energias de fontes renováveis (Comissão Europeia, 2013).

Os automóveis de passageiros e os veículos comerciais ligeiros são responsáveis por cerca de 15% das emissões de CO₂ da UE. Em 2007 os automóveis emitiam 159 g de CO₂ /km, em 2015 o limite foi de 130 g/km e em 2020 o limite será de 95 g/km (redução de 40%). Além disso, a qualidade do combustível é um importante elemento e por isso há um investimento em produção de biocombustíveis as quais visam limitar o uso da superfície total de terras agrícolas e florestais que poderão ser utilizadas para esse fim (Comissão Europeia, 2013).

2.1.3 Portugal

O mercado português é caracterizado por um elevado número de veículos a gasóleo, registando-se um consumo de 62% de gasóleo e 29% de gasolina. Dessa forma, há uma grande procura por biodiesel para atender o Decreto-Lei nº 66 de 2006, que, exige uma incorporação de biodiesel superior a 5% no gasóleo. Em Portugal a produção de biodiesel é principalmente obtida a partir de culturas de colza e girassol (Portal Energia, 2008).

2.2 Projeção da evolução de produção de biodiesel

Espera-se uma produção global de biodiesel de 39 bilhão de litros em 2024, sendo a principal matéria-prima os óleos vegetais. Além disso, a União Europeia será o maior produtor mundial; os Estados Unidos irão perder sua posição de segundo maior produtor nos próximos dez anos; e, o Brasil estará na terceira posição. Em relação aos usos, estima-se que a União Europeia será o maior consumidor, seguido pelos Estados Unidos, Indonésia e Brasil (Figura 2) (Relatório da FAO/ONU, 2015).

O desenvolvimento macroeconómico dos países relativo aos preços de matérias-primas e combustíveis fósseis; as opiniões sobre os benefícios ambientais dos biocombustíveis; e a situação de segurança são cruciais para determinar a evolução da política em apoiar a mistura dos biocombustíveis nos combustíveis (Relatório da FAO/ONU, 2015).

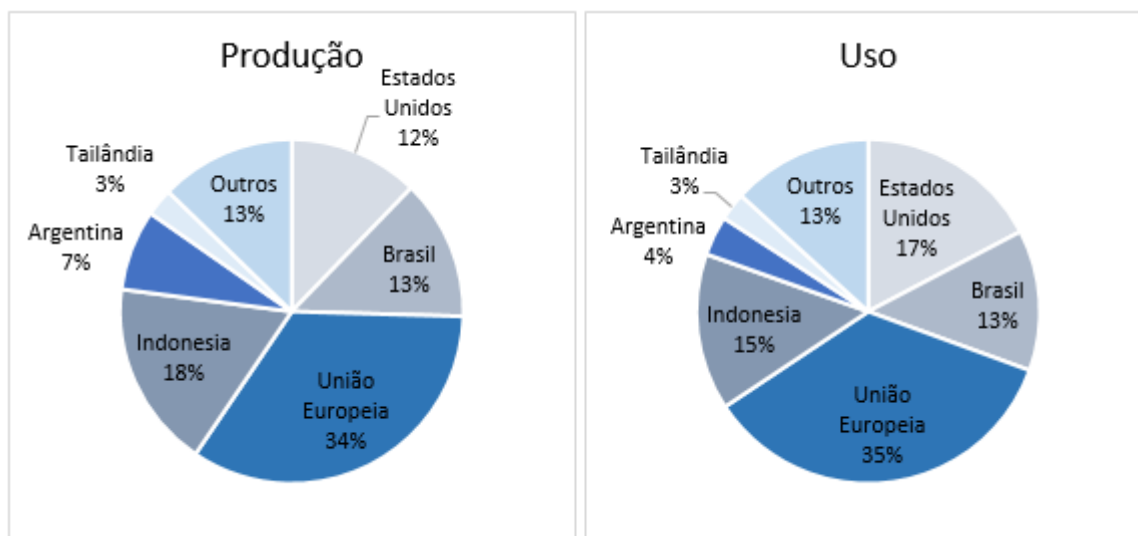


Figura 2: Projeção da distribuição de produção e uso mundiais do biodiesel em 2024 (Relatório da FAO/ONU, 2015).

Na União Europeia a Diretiva 28 (2009) de Energias Renováveis pretende chegar em 7% de biocombustíveis até 2019, havendo uma crescente produção de biodiesel nesse período. O programa Padrão de Combustível Renovável, definido pelos Estados Unidos na Lei de Independência e Segurança Energética (EISA) de 2007, estabeleceu metas anuais até 2022. Essas metas exigem que os combustíveis obtenham pelo menos 20% de biodiesel (Relatório da FAO/ONU, 2015).

A evolução projetada para os preços do óleo vegetal deverá diminuir o preço mundial do biodiesel em até 20%. A produção de biodiesel está intimamente ligada a política ambiental verde a tentar combater o ceticismo do mercado de energia atual. Dessa forma, o comércio de biodiesel não deverá crescer (Figura 3) (Relatório da FAO/ONU, 2015).

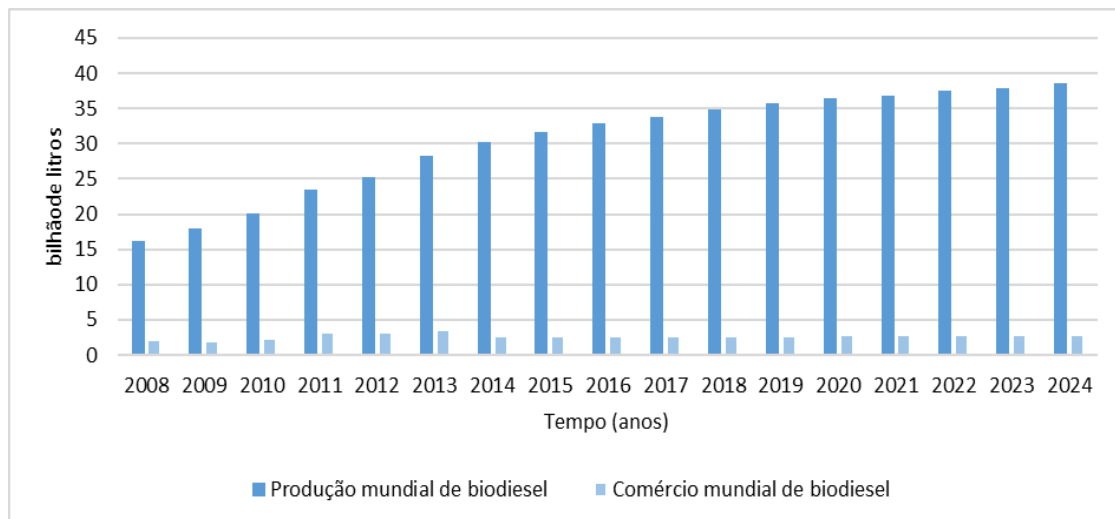


Figura 3: Projeção da produção e comércio mundial de biodiesel até 2024 (Relatório da FAO/ONU, 2015).

2.3 Matérias-primas

A produção mundial de biodiesel é baseada em óleos vegetais: colza na Europa; soja nos Estados Unidos, Brasil e Argentina; palma na Indonésia; ainda subprodutos industriais tais como o óleo de cozinha, a principal matéria-prima na China e com aumento da sua utilização na Europa; e gordura animal (REN21, 2015).

Em 2008 cerca de 15% da produção global de milho (principalmente nos EUA) e cerca de 5,7% da produção global de grão foi utilizada para produzir etanol. Além disso, 10% da produção mundial de óleo vegetal, sobretudo na União Europeia, foi utilizada na produção de biodiesel. Já em relação a produção mundial de cana-de-açúcar 18% (especialmente no Brasil) foi para etanol (HLPE, 2013). Projeta-se que em 2021, 16% do total de óleos vegetais produzidos seria utilizado na produção de biodiesel e essa procura pode ter impactos em vários mercados de matérias prima (FAO, 2011).

De acordo com a Diretiva 2009/28/CE (2009) do Parlamento Europeu e com o Decreto-Lei nº 117/2010 (2010), diferentes matérias-primas podem determinar reduções das emissões de gases com efeito de estufa, resultante de todas ou algumas das fases na produção de biodiesel: a utilização de colza produz 29 g CO₂eq.MJ⁻¹ e reduz 45% das emissões; já o girassol reduz em 58% as emissões (18 g CO₂eq.MJ⁻¹); a soja 40%; (19 g CO₂eq.MJ⁻¹); a palma reduz 36% (14 g CO₂eq.MJ⁻¹); e com óleo vegetal ou animal residual essa redução chega aos 88% (0 g CO₂eq.MJ⁻¹).

2.4 Os processos de produção de biodiesel

A matéria-prima de base vegetal ou animal passa por uma preparação que depende do seu tipo. Geralmente processos de neutralização da matéria-prima através da lavagem com solução alcalina e em seguida, uma operação de secagem ou desumidificação. Na sequência, há o processo de conversão da fonte principal de óleo vegetal denominada triacilgliceróis (triglicerídeos) em ésteres alquílicos de ácidos gordos (biodiesel), chamada de transesterificação. Nesse processo, é adicionado um álcool (metanol) ao óleo vegetal, que através de um catalisador (hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio) forma ésteres (éster metílico) e glicerol (Figura 4) (Ma e Hanna, 1999; Zhang, *et al.* 2003).

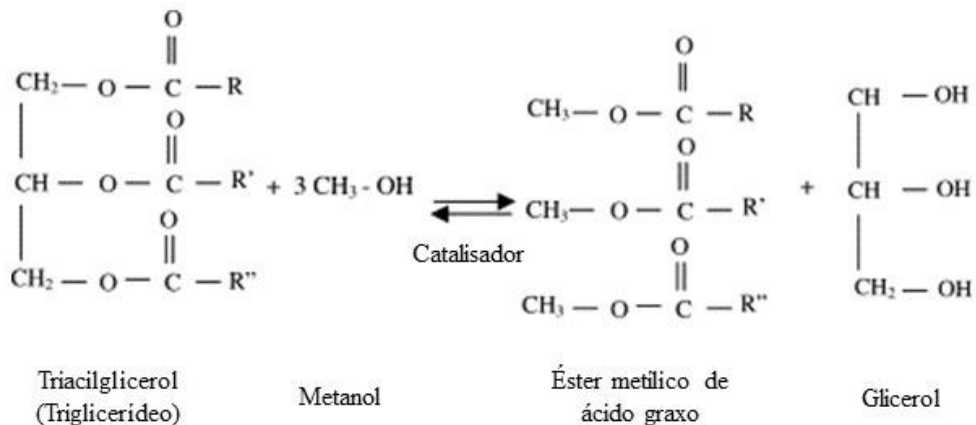


Figura 4. Reação de Transesterificação (retirado de Zhang, *et al.*, 2003).

Posteriormente, inicia-se a separação de fases, que pode ser realizada por decantação ou por centrifugação. A fase mais densa é constituída por glicerol e impurezas, já a fase menos densa por ésteres e impurezas. No processo de separação ainda restam na glicerina vestígios de ésteres metílicos, dessa forma é realizado a sua recuperação através dum processo de evaporação e condensação. Além disso, também é removido o álcool residual libertando o éster metílico para outra fase. Esse álcool removido das fases pesada e leve passa por um processo de desidratação e retorna para a reação de transesterificação (Ma e Hanna, 1999; Zhang *et al.*, 2003).

Finalmente, o éster metílico passa por centrifugação e desumidificação até ficar purificado e resultar no biodiesel. O biodiesel comercial é classificado de acordo com as proporções de biodiesel no diesel; o biodiesel B20 (20% de biodiesel) em julho de 2016 fechou com \$2,54/galão, o B99 e B100 com \$3,03/galão (U.S. department of Energy,

2016). O glicerol, como subproduto desse processo, passa por uma destilação (purificação) e tem como destino diversas aplicações. Por tonelada de biodiesel produzido, resultam como subproduto 200 kg de glicerol (Anónimo, 1998).

3 Glicerol

3.1 Problema do glicerol na atualidade

O glicerol, subproduto da produção de biodiesel, é utilizado como matéria-prima para outras atividades industriais, tais como, produção de químicos de valor acrescentado ou alimentos para animais. Para a sua utilização na indústria alimentar, farmacêutica, cosmética e de tabaco é necessário submetê-lo a processos como: purificação por filtração, adição de químicos, destilação fracionada a vácuo, branqueamento, desodorização e troca iônica (Pagliaro *et al.*, 2007). Isso aumenta o custo do produto final obtido a partir do glicerol, conseqüentemente, com o aumento da produção de biodiesel tornou-se necessário pesquisar outras formas de utilização e valorização do resíduo (Leoneti *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2012; Habibullah *et al.*, 2014).

Além disso, o excesso de glicerol pode tornar-se um problema ambiental visto que não pode ser eliminado no meio ambiente. Os produtos mais promissores obtidos a partir do glicerol são os polióis (1,3-propanodiol) e os poliuretanos (poliésteres insaturados e resinas epóxi). Os polióis podem ser produzidos a partir de microrganismos, que utilizam glicerol como fonte de carbono e energia (Mazumdar *et al.*, 2010; Przyszałowska *et al.*, 2015).

3.2 Características físico-químicas

O glicerol bruto, sendo um subproduto da fabricação de biodiesel, apresenta impurezas como álcool residual, catalisador (hidróxido de sódio), água, sais e ácidos gordos livres (Hu *et al.*, 2012; Dobrowolski *et al.*, 2016). O teor de glicerol no subproduto está entre 22,9% e 87,0% em relação aos sólidos totais. Essa variação ocorre de acordo com a fonte de triglicérido utilizada e também com os processos realizados para a indústria de biodiesel (Hu *et al.*, 2012; Dobrowolski *et al.*, 2016). Isso também é observado nas características físico-químicas do subproduto conforme a Tabela 1.

Tabela 1: Características físico-químicas do glicerol.

Parâmetros	Unidade	Valor	Referência
pH	-	3,3 - 12,6	Viana (2011); Nuchdang e Phalakornkule (2012); Hutnan <i>et al.</i> (2013); Martín <i>et al.</i> (2013); Nartker <i>et al.</i> (2014); Panpong <i>et al.</i> (2014); Razaviarani e Buchanan (2015); Serrano <i>et al.</i> (2014); Silvestre <i>et al.</i> (2015).
Carência Química de Oxigênio (CQO)	g.L ⁻¹	1010 - 5820	Nuchdang e Phalakornkule (2012); Martín <i>et al.</i> (2013); Panpong <i>et al.</i> (2014); Serrano <i>et al.</i> (2014); Razaviarani e Buchanan (2015); Silvestre <i>et al.</i> (2015).
	g.kg ⁻¹	1217 - 1600	López <i>et al.</i> (2009); Hutnan <i>et al.</i> (2013).
Azoto total (NT)	mg.L ⁻¹	1,67 - 3,40	Nuchdang e Phalakornkule (2012); Hutnan <i>et al.</i> (2013); Panpong <i>et al.</i> (2014).
Sólidos Totais (ST)	g.L ⁻¹	277 - 969	Nuchdang e Phalakornkule (2012); Panpong <i>et al.</i> (2014); Serrano <i>et al.</i> (2014); Razaviarani e Buchanan (2015); Silvestre <i>et al.</i> (2015).
Sólidos Fixos (SF)	g.L ⁻¹	2 - 11	Serrano <i>et al.</i> (2014); Silvestre <i>et al.</i> (2015).
Sólidos Voláteis (SV)	g.L ⁻¹	240 - 924	Panpong <i>et al.</i> (2014); Serrano <i>et al.</i> (2014); Razaviarani e Buchanan (2015); Silvestre <i>et al.</i> (2015).
Sólidos Dissolvidos (SDT)	g.L ⁻¹	302 - 590	Nuchdang e Phalakornkule (2012).
Sólidos Suspensos (SST)	g.L ⁻¹	33,5 - 192	Nuchdang e Phalakornkule (2012); Razaviarani e Buchanan (2015).
Sólidos Suspensos Voláteis (SSV)	g.L ⁻¹	8,3 - 28,3	Nuchdang e Phalakornkule (2012).
Fósforo Total	mg.L ⁻¹	0,10 - 72,9	Nuchdang e Phalakornkule (2012); Panpong <i>et al.</i> (2014); Serrano <i>et al.</i> (2014).
Ácidos gordos voláteis (AGV)	mg.L ⁻¹	6650	Panpong <i>et al.</i> (2014).
Alcalinidade	mg.L ⁻¹	35050	Panpong <i>et al.</i> (2014).
Densidade	kg.m ⁻³	1000 - 1261	López <i>et al.</i> (2009); Viana (2011); Hutnan <i>et al.</i> (2013); Martín <i>et al.</i> (2013); Razaviarani e Buchanan (2015).

3.3 Estudos para a valorização do glicerol

Vários estudos vêm sendo realizados para valorização do glicerol, como por exemplo, no uso em ração animal (Nitayavardhana e Khanal, 2011); nos processos físico-químicos como a reforma catalítica (Tippawan *et al.*, 2016) ou na eletroquímica (Marshall e Haverkamp, 2008) para produção de hidrogênio e gás de síntese.

A biotransformação do glicerol em subprodutos de valor agregado representa uma alternativa atual para sua valorização e tem sido explorada de forma intensa recentemente. A utilização da levedura *Yarrowia lipolytica* para produção de ácido cítrico (62,5 g.L⁻¹ com o consumo de glicerol 0,56 g.g⁻¹) e de eritritol (0,84 g.L⁻¹.h⁻¹ e consumo de glicerol 0,55 g.g⁻¹) foi investigada por Papanikolaou *et al.* (2008) e Mironczuk *et al.* (2015). A biotransformação do glicerol por bactérias polihidroxicanoatos, as quais preferem os ácidos carboxílicos a os álcoois, permite manter o 1,3-propanodiol como produto de valor agregado, que pode ser utilizado como fonte de matéria-prima para outros processos (produção de cosméticos, fluido para transferência de calor, produção de polímero, entre outros). A contribuição de carbono orgânico total a partir de 1,3-propanodiol subiu de 55,8% para 84,0% (Pan *et al.*, 2016; Vivek *et al.*, 2016).

A utilização do glicerol para a produção de metano através da digestão anaeróbia vem sendo uma alternativa bastante pesquisada e com resultados satisfatórios. Como mostram alguns trabalhos recentes, sobre a co-digestão do glicerol com subprodutos agroindustriais, resíduos sólidos urbanos e com lamas secundárias da estação de tratamento de água para a produção de metano e hidrogênio (Hutnan *et al.*, 2009; Fountoulakis *et al.*, 2010; Razaviarani e Buchanan, 2015; Pachapur *et al.*, 2016).

3.4 Digestão anaeróbia

O processo de digestão anaeróbia apresenta vários estágios sequenciais, os quais acontecem dentro de um biodigestor de forma simultânea em diferentes proporções (Figura 5). Na hidrólise, as bactérias fermentativas hidrolíticas através de exoenzimas excretadas realizam a quebra de materiais complexos em compostos mais simples (moléculas menores). Esses compostos mais simples podem penetrar na membrana celular das bactérias fermentativas (Mes *et al.*, 2003; Chernicharo, 2007; Probiogás, 2010).

Na sequência, esses compostos mais simples (solúveis) são assimilados e metabolizados dentro da célula das bactérias fermentativas acidogênicas formando ácidos gordos voláteis, álcoois, ácido lático, dióxido de carbono, hidrogênio, amônia, sulfeto de hidrogênio e novas células bacterianas (Mes *et al.*, 2003; Chernicharo, 2007; Probiogás, 2010).

Em seguida, os compostos da fase anterior sofrem oxidação pelas bactérias acetogênicas, produzindo ácido acético, hidrogênio e dióxido de carbono. Quando há formação de ácido acético e propiônico há grande liberação de hidrogênio no sistema, o qual pode ser consumido de duas formas: (i) consumo de hidrogênio e dióxido de carbono para formação de metano pelos microrganismos metanogênicos, através da reação do hidrogênio com dióxido de carbono e (ii) ácido acético formando ácidos orgânicos (ácido propiônico e butírico), o qual corresponde a pelo menos 50% da CQO biodegradável (Mes *et al.*, 2003; Chernicharo, 2007; Probiogás, 2010).

Por fim, o acetato e hidrogênio gerado na acetogênese são utilizados respectivamente pelas arqueas metanogênicas acetoclásticas (responsáveis por 60 a 70% da produção de metano) e pelas arqueas metanogênicas hidrogenotróficas produzindo assim, o biogás. A constituição do biogás corresponde a: (i) metano (50-80%); (ii) dióxido de carbono (20-60%); (iii) água (saturada); (iv) hidrogênio (0-5%); (v) sulfeto de hidrogênio (0-8%); (vi) amoníaco (0,1-1%); (vii) monóxido de carbono (0-1%); (viii) azoto (0-5%); oxigênio (0-1%); e, (ix) compostos orgânicos (0,01-0,6%) (Tchobanoglous *et al.*, 1993; Mes *et al.*, 2003; Chernicharo, 2007; Probiogás, 2010).

Na digestão anaeróbia alguns ácidos orgânicos são formados pelas bactérias acidogênicas na proporção de rendimento celular ($Y_{x/s}$) de 0,15-0,17 g SV.g⁻¹ CQO, como: (i) acético, (ii) propiônico, (iii) butílico, (iv) valérico e outros. Entretanto, na fase acetogênica e metanogênica o rendimento é 0,025-0,051 g SV.g⁻¹ CQO e 0,020-0,054 g SV.g⁻¹ CQO, respectivamente. Dessa forma, a sequência de consumo e produção é muito inferior na fase acetogênica e metanogênica ocasionando a acumulação de ácidos orgânicos no meio e conseqüentemente a inibição da digestão anaeróbia (Pavlostathis e Gomes, 1991; Fonseca e Teixeira, 2007).

Os fatores que podem interferir nesses processos são: (i) temperatura; (ii) tempo de retenção do substrato; (iii) composição do substrato; (iv) tamanho das partículas; (v) pH; (vi) concentração de amônia; (vii) concentração de produtos pela hidrólise (Chernicharo, 2007).

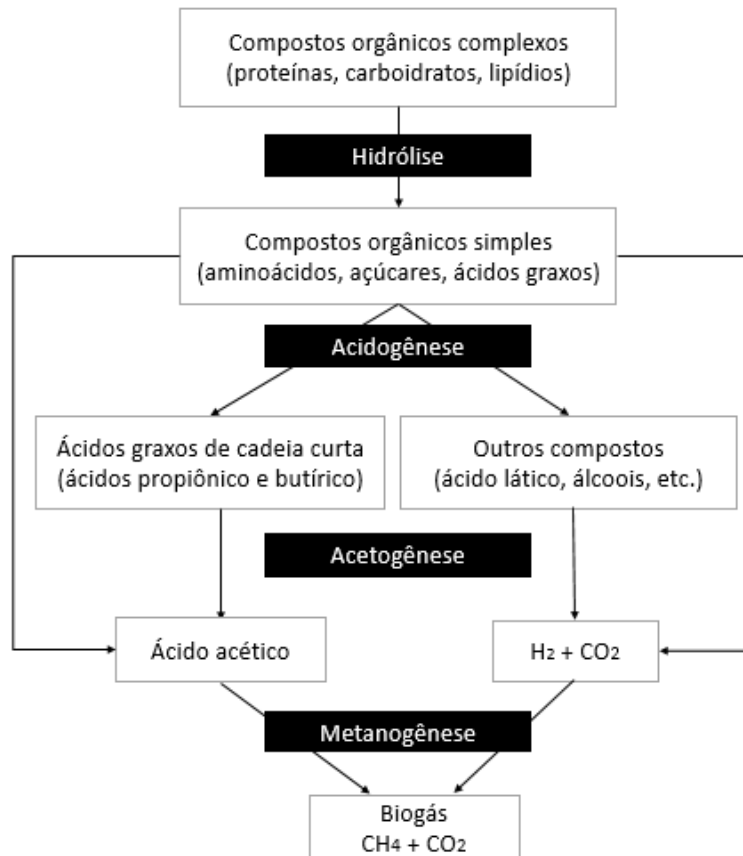


Figura 5: Etapas do processo de digestão anaeróbia (Probiogás, 2010).

Os biodigestores costumam trabalhar em condições ótimas para os microrganismos metanogénicos que são em sua maioria mesófilos, ou seja, com uma temperatura entre 20 e 40°C e pH 6,5 - 8 (Chernicharo, 2007). Para haver estabilidade do processo anaeróbio é mais importante manter constante a temperatura do que seu valor absoluto, pois as bactérias metanogénicas tem capacidade para se adaptar em diferentes níveis de temperatura, mais quando sua variação é lenta (Probiogás, 2010).

Alguns compostos em certas concentrações podem causar inibição do processo como: (i) oxigénio ($> 0,1 \text{ mg.L}^{-1}$), que provoca inibição principalmente nos microrganismos metanogénicos; (ii) sulfeto de hidrogénio ($> 0,5 \text{ mg.L}^{-1} \text{ H}_2\text{S}$), pode aumentar o seu efeito para pH mais ácido; (iii) ácidos orgânicos voláteis ($> 2000 \text{ mg.L}^{-1} \text{ HAc}$, a pH 7) que aumentam o efeito com a diminuição do pH; (iv) azoto amoniacal ($> 3500 \text{ mg.L}^{-1}$, em pH 7), que em pH básico e temperatura mais elevada causa maior inibição; (v) metais pesados como $\text{Cu} > 50 \text{ mg.L}^{-1}$, $\text{Zn} > 150 \text{ mg.L}^{-1}$ e $\text{Cr} > 100 \text{ mg.L}^{-1}$; e (vi) desinfetantes e antibióticos (Probiogás, 2010).

3.4.1 Tipo e configuração do digestor

São nos biorreatores que ocorrem as reações de transformação dos substratos em produtos, por meio de reações mediadas pelos microrganismos. O substrato é consumido pelos microrganismos, com formação de nova biomassa e de produtos. Os biorreatores podem funcionar de três formas: batch (fechado), contínuo e semicontínuo. O estado de equilíbrio ocorre quando uma cultura de microrganismos mantém suas propriedades celulares constantes, o qual pode ser na fase exponencial em cultura descontínua ou em estado estacionário em cultura contínua (Schmidell e Facciotti, 2001; Paul *et al.*, 2003; Fonseca e Teixeira, 2007).

Nos digestores batch, substrato e inóculo são inseridos no sistema e até o final do processo não há mais entradas ou saídas. Nesse caso, os microrganismos vão passar pelas várias fases da curva de crescimento. Na fase *lag* ou de adaptação, os microrganismos não possuem crescimento aparente e vão se adaptar ao meio no qual foram inoculados. Em seguida, os microrganismos já adaptados passam pela fase de duplicação da biomassa, o qual pode ser expressa exponencialmente e também se aplica a cinética de Monod (nessa fase há formação de produtos primários). Posteriormente quando há o consumo de total substrato, a formação de biomassa e do produto, corresponde então a fase estacionária onde a taxa específica de crescimento é igual a zero (ocorre formação de produtos secundários). Por último, tem-se a fase de declínio ou morte dos microrganismos (Schmidell e Facciotti, 2001; Paul *et al.*, 2003; Fonseca e Teixeira, 2007).

O sistema de fluxo contínuo, opera inicialmente em regime de batch até a formação da biomassa na fase exponencial e então passa a operar em regime contínuo com a entrada de substrato no digestor e a saída de substrato digerido, até estar em estado de equilíbrio. Situação na qual é aplicado o balanço de massa nos diferentes tipos de digestores contínuos, os quais podem ser: (i) apenas um digestor; (ii) vários digestores em série e em paralelo; (iii) mais de um digestor com mais de uma alimentação e, (iv) com recirculação, entre outros (Schmidell e Facciotti, 2001; Paul *et al.*, 2003; Fonseca e Teixeira, 2007).

O digestor semicontínuo também se inicia com o processo em batch até à fase exponencial, porém há adição de substrato e não há saídas, ou seja, o volume dentro do digestor passa a ser variável ao longo do tempo assim como a produção de biomassa e o

consumo do substrato. O balanço de massa é feito considerando as entradas, formação e acumulação (Schmidell e Facciotti, 2001; Paul *et al.*, 2003; Fonseca e Teixeira, 2007).

3.4.2 Tipo de digestor anaeróbio

Os digestores mais comumente utilizados são: (i) o reator de mistura completa (*Continuous Stirred-Tank Reactor* - CSTR), no qual há um sistema de agitação mecânica, que promove uma concentração uniforme no interior do digestor; (ii) fluxo pistão, onde a digestão ocorre ao percorrer o digestor com o impulso da entrada, nesse caso a concentração é maior na entrada e diminui gradativamente até a saída; (iii) o digestor anaeróbio de fluxo ascendente (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket* - UASB), em que o sentido do fluxo é de baixo para cima através de um leito de lama densa com atividade microbológica, a concentração diminui e material mais estabilizado sai do biodigestor; a mistura ocorre pela formação de bolhas e seu fluxo ascendente (Mes *et al.*, 2003; Chernicharo, 2007; Probiogás, 2010).

3.4.3 Parâmetros operacionais em sistema contínuo

Num reator contínuo, os principais parâmetros a se determinar são a carga orgânica volumétrica (COV) e o tempo de retenção hidráulica (TRH), os quais estão diretamente ligados aos parâmetros operacionais do reator. Um dos fatores importantes para obter uma decomposição, com capacidade e custos aceitáveis, é a COV, que expressa a quantidade de matéria orgânica seca (MOS) que se alimenta o biorreator por unidade de volume e de tempo ($\text{kg MOS}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$) (Equação 1) (Kaltschmitt e Hartmann, 2001 citado por Probiogás, 2010).

$$\text{COV} = \frac{m \times C}{V_r \times 100} \quad \text{Equação 1}$$

onde:

COV, Carga Orgânica Volumétrica ($\text{kg MOS}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$);

m, Caudal Mássico ($\text{kg}\cdot\text{d}^{-1}$);

C, Concentração da Matéria Orgânica Seca (% MOS);

V_r , Volume do Reator (m^3).

Outro facto importante é o tempo de retenção hidráulica (TRH), o qual indica o tempo que o substrato vai permanecer no reator (Equação 2). Pode haver caminhos preferenciais, nos quais o substrato leva menor tempo para atravessar o reator ou aglomerados, os quais diminuem o volume útil e aumentam o tempo do substrato no reator (Braun, 1982 citado por Probiogás, 2010).

$$TRH = \frac{V_r}{Q} \quad \text{Equação 2}$$

onde:

TRH, Tempo de Retenção Hidráulica (d);

V_r , Volume do Reator (m^3);

Q , Caudal diário ($m^3.d^{-1}$).

Para analisar a eficiência em reatores contínuos e em batch é necessário determinar a produtividade, o rendimento e a taxa de degradação. A produtividade de metano é o volume de metano gerado em relação ao volume do reator (Equação 3) (Fachagentur, 2009 citado por Probiogás, 2010).

$$P_{CH_4} = \frac{V_{CH_4}}{V_r} \quad \text{Equação 3}$$

onde,

P_{CH_4} , Produtividade de Metano ($Nm^3.m^{-3}.d^{-1}$);

V_{CH_4} , Produção de Metano ($Nm^3.d^{-1}$);

V_r , Volume do Reator (m^3).

O rendimento pode ser calculado pela relação da produção de metano com a quantidade de substrato introduzido (Equação 4) (Lebuhn, Gronauer e Lebuhn, 2008 citado por Probiogás, 2010).

$$A_{CH_4} = \frac{V_{CH_4}}{m_{MOS}} \quad \text{Equação 4}$$

onde:

A_{CH_4} , Rendimento de Metano ($Nm^3.t^{-1} MOS$)

V_{CH_4} , Produção de Metano ($Nm^3.d^{-1}$);

m_{MOS} , Matéria Orgânica Seca Introduzida ($t.d^{-1}$).

A eficiência de aproveitamento do substrato ou taxa de degradação pode ser determinada com base na matéria orgânica seca (MOS) (Equação 5) ou na carência química de oxigênio (CQO) (Fachagentur, 2009 citado por Probiogás, 2010).

$$\eta_{MOS} = \frac{MOS_{Sub} \times m_{in} - (MOS_{Sa} \cdot m_{Sa})}{MOS_{Sub} \times m_{in}} \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

onde:

η_{MOS} , Taxa de degradação (%)

MOS_{Sub} , Teor de matéria orgânica seca da matéria fresca introduzida ($kg.t^{-1}$ MF)

m_{in} , Massa da matéria orgânica alimentada (t);

MOS_{Sa} , Teor de matéria orgânica seca da saída do biorreator ($kg.t^{-1}$ MF);

3.5 Digestão anaeróbia do glicerol

3.5.1 Efeito inibitório

Pesquisas realizadas mostraram que existem alguns efeitos inibitórios na biodigestão do glicerol devido à carga excessiva de CQO que possui, o que gera acumulação de intermediários, além do facto do glicerol residual não ser puro e apresentar outros elementos inibidores (substâncias tóxicas). Refira-se ainda que, a digestão anaeróbia do glicerol pode ser inibida se algum fator operacional como o pH (entre 6-8), temperatura (mesofílica) e alcalinidade (capacidade tampão) registrar valores fora dos intervalos considerados ótimos, entre 2000 e 5000 $mg.L^{-1}$ (Ma *et al.*, 2008; Hutnan *et al.*, 2013; Razaviarani e Buchanan, 2015).

Na biodigestão anaeróbia do glicerol, a presença de sobrecarga orgânica pode gerar o problema de estresse cinético (Fountoulakis *et al.*, 2010), que ocorre quando a taxa de produção de ácidos na fase acidogénese é tão grande que inibe as outras fases acidogénica e metanogénica (Lawrence, 1971). Como a formação de ácidos é maior (acidogénese) do que seu consumo (fase acidogénica e metanogénica), é necessário haver alcalinidade no sistema para que esses ácidos sejam contrabalançados (Gavala *et*

al., 2003). Dessa forma, se faz necessário um teste de atividade metanogénica específica de acordo com o tipo de lama utilizado (Jawed e Tare, 1999).

Para diminuir esse impacto de sobrecarga, utiliza-se o glicerol diluído na alimentação (Viana, 2011; López *et al.*, 2009; Siles *et al.*, 2010). Outra alternativa é o uso de dois bioreatores, um deles operando com alta carga orgânica (até 97 kg da CQO.m⁻³.d⁻¹) e com baixo tempo de retenção hidráulica (1 dia), para a fase acidogénese e o outro reator metanogénico com baixa carga orgânica (até 7 kg.CQO.m⁻³.d⁻¹) e alto tempo de retenção hidráulica (14 dias). Isso pode aumentar a eficiência em 11% na geração de metano e hidrogénio em relação a um sistema único (Luo *et al.*, 2011).

Outro problema são os resquícios de ácidos gordos de cadeia longa no glicerol, oriundos da reação de transesterificação (Ma *et al.*, 2008). Esses são biodegradáveis, mas podem ser prejudiciais a digestão anaeróbia, pois se aderem a parede celular dos microrganismos e, além de impedir a passagem de nutrientes, tornam a biomassa menos densa e com maior tendência de sair do reator (Rinzema, 1994; Hwu *et al.*, 1998; Lalman e Bagly, 2000). As bactérias acidogénicas não são afetadas pelos ácidos gordos de cadeia longa, mas são afetadas as bactérias acetogénicas, as arqueas metanogénicas acetoclásticas e as arqueas metanogénicas hidrogenotróficas (Koster e Cramer, 1987; Hanaki *et al.*, 1981; Lalman e Bagly, 2000; Yong *et al.*, 2001; Hazimah *et al.*, 2003; Thompson e He, 2006). Dessa forma, o modelo de dois reatores com condições distintas poderia evitar esse tipo de problema (Luo *et al.*, 2011).

3.5.2 Carga aplicada na digestão anaeróbia do glicerol

A matéria orgânica que pode ser convertida em biogás é denominada biodegradabilidade anaeróbia. Testes realizados com glicerol em reatores descontínuos de 1 L em condições mesofílicas indicam que a biodegradabilidade chega a 100% com uma carga de 0,21 e 0,38 kg CQO.kg⁻¹ SV.d⁻¹. Entretanto, esse resultado só é obtido com um pré-tratamento para remover as impurezas orgânicas e inorgânicas, que causam inibição microbiana (López *et al.*, 2009; Siles *et al.*, 2010).

Alguns pré-tratamentos são realizados no glicerol residual para melhorar a sua eficiência de transformação em metano. O pré-tratamento que gera o glicerol acidificado se baseia na acidificação do glicerol residual com ácido fosfórico, seguido por centrifugação e destilação a vácuo. Já o glicerol destilado passa pelo processo de

acidificação, em seguida por destilação e retificação. Antes de ser utilizado, esse glicerol ainda passa por diluição, neutralização (com hidróxido de sódio), e adição de alcalinidade e nutrientes (López *et al.*, 2009; Siles *et al.*, 2010).

Num estudo utilizando glicerol acidificado e glicerol destilado mostra elevada biodegradabilidade anaeróbia do glicerol (em torno de 100%) e produção de metano. Para o glicerol acidificado, a produção de metano foi de 306 L CH₄.kg⁻¹, registrando-se para o glicerol destilado valor superior, mas houve grande inibição com o aumento da carga (López *et al.*, 2009).

Glicerol acidificado diluído em água residual resultante da fabricação de biodiesel demonstrou nível de biodegradabilidade anaeróbia em torno de 100%, com produção de metano de 310 L CH₄.kg⁻¹ CQO removido, a 1 atm e 25°C. A cinética de produção de metano permaneceu constante em 630 L CH₄.kg⁻¹ VSS.kg⁻¹ CQO.h⁻¹ para a carga orgânica estudada (Siles *et al.*, 2010).

A maioria das pesquisas mostra o glicerol sendo utilizado para complementar e agregar em relação a geração de metano em uma co-digestão anaeróbia (digestão anaeróbia combinada de dois elementos) (Nartker *et al.*, 2014; Razaviarani e Buchanan, 2015; Panponga *et al.*, 2015).

Na co-digestão de uma lama de água residual e glicerol, em condições mesofílicas, foi observado um decréscimo rápido de SV e CQO, acompanhado de elevada produção de metano. As condições mais favoráveis foram obtidas para 50% da CQO de alimentação correspondendo ao glicerol ou 1,35% de carga por volume. Os microrganismos metanogênicos acetoclásticas foram dominantes para cargas da CQO de 30% na alimentação, ao passo que os microrganismos hidrogenotróficos prevaleceram para valores de carga superiores, no intervalo 50 - 100%. As reduções de alcalinidade, pH, produção de biogás, rendimento de metano e o aumento de ácidos gordos voláteis foram obtidos com 100% da CQO na alimentação correspondente a glicerol (Razaviarani e Buchanan, 2015).

Em um sistema de co-digestão utilizando efluente da indústria de frutos do mar (94%), glicerol residual (1%) e, alga verde (5%) foi registada uma produção de 291 L CH₄.kg⁻¹ SV (Panponga *et al.*, 2015).

A utilização do glicerol como co-digerido em reatores de resíduos urbanos mostrou aumentos significativos na produção de biogás. A adição de 25% da carga orgânica de glicerol promoveu um acréscimo na produção de biogás em 82%. No entanto, para manter a estabilidade do processo a concentração de glicerol foi limitada a

um determinado nível de concentração, entre 0,05% e 1% em peso, para evitar uma sobrecarga orgânica (Nartker *et al.*, 2014).

Num processo usando como alimentação a lama da indústria de cerveja e glicerol, aplicando uma alimentação com carga total e outra com carga graduada, evidenciou que dependendo do tipo de abordagem na alimentação são diferentes os consórcios bacterianos presentes (Vásquez e Nakasaki, 2016).

A Tabela 2 apresenta um resumo das cargas aplicadas e dos resultados obtidos por referências bibliográficas.

Tabela 2: Cargas de glicerol adicionadas e os resultados obtidos de acordo com as referências bibliográficas.

Tipo de reator	Carga orgânica	Resultado	Referência
Glicerol acidificado e glicerol destilado	0,21 e 0,38 kg CQO.kg ⁻¹ SV.d ⁻¹	Biodegradabilidade 100%	López <i>et al.</i> , (2009); Siles <i>et al.</i> , (2010)
Lama de água residual e glicerol	1,35% de glicerol de carga por volume	100% da CQO sendo do glicerol	Razaviarani e Buchanan, 2015
Efluente da indústria de frutos do mar (94%) e alga verde (5%)	Glicerol residual (1%)	291 L CH ₄ .kg ⁻¹ SV	Panponga <i>et al.</i> , 2015
Resíduos urbanos	25% da carga orgânica de glicerol	Qualidade do gás com 82% de metano	Nartker <i>et al.</i> , 2014

3.5.3 Vias metabólicas do glicerol

A quebra do glicerol apresenta vias metabólicas que levam a formação de produtos distintos dependendo das condições e dos microrganismos presentes no meio. Essas vias ocorrem em sistemas aeróbios e anaeróbios por microrganismos procariotas e eucariotas. O glicerol apresenta-se como uma fonte de carbono reduzida para os microrganismos, os quais utilizam como fonte de substrato e energia. Dessa forma é possível sintetizá-lo em produtos metabólicos como: ácidos orgânicos, dióis, óleos de cadeia mais simples, solventes, etanol, pigmentos, biosurfactantes, hidroxialcanoatos, metano, n-butanol, ácido cítrico e ácido acético (Rivaldi *et al.*, 2007; Moo *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2009; Mazumdar *et al.*, 2010; Viana, 2011; Chatzifragkou e Papanikolaou, 2012; Przystałowska *et al.*, 2015).

O glicerol pode sofrer a via oxidativa ou redutora. Na via redutora a coenzima *glicerol desidratase* atua no glicerol gerando 3-hidroxi-propanalaldeído, o qual sofre oxirredução em 1,3 propanodiol através da enzima *1,3-propanediol desidrogenase* (Rivaldi *et al.*, 2007; Mazumdar *et al.*, 2010; Viana, 2011; Chatzifragkou e Papanikolaou, 2012; Przystałowska *et al.*, 2015). Essa via redutora pode ser realizada pelos microrganismos: *Escherichia coli*, *Clostridium buturicum*, *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium butyricum*, *Yarrowia Lipolítica*, entre outros (Amaral *et al.*, 2009; Chatzifragkou *et al.*, 2010; Moon *et al.*, 2010; Venkataramanan *et al.*, 2012; Przystałowska *et al.*, 2015).

A principal via é a de oxidação, a qual é mais provável em bactérias e leveduras. Essa via consiste fosforilação do glicerol pela enzima *quinase* para produzir o dihidroxiacetona-P, o qual sofre uma desidrogenção e então é convertido em fosfoenolpiruvato pela enzima mitocondrial *fosfo-ubiquinona oxidorreductase* (FAD-dependente); em seguida ocorre a glicólise que o transforma em piruvato. O piruvato possui várias vias metabólicas, as quais variam de acordo com o microrganismo e as condições do meio, podendo formar: (i) dióxido de carbono; (ii) hidrogênio; (iii) n-butanol; (iv) butirato; (v) acetato; (vi) etanol; (vii) 2,3-butanediol; e, (viii) propionato. Para a fermentação anaeróbia é importante a formação de acetato, hidrogênio e dióxido de carbono (na forma de íon bicarbonato) para haver a formação de metano e assim gerar energia (Rivaldi *et al.*, 2007; Moon *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2009; Mazumdar *et*

al., 2010; Viana, 2011; Chatzifragkou e Papanikolaou, 2012; Przystałowska *et al.*, 2015) (Figura 6).

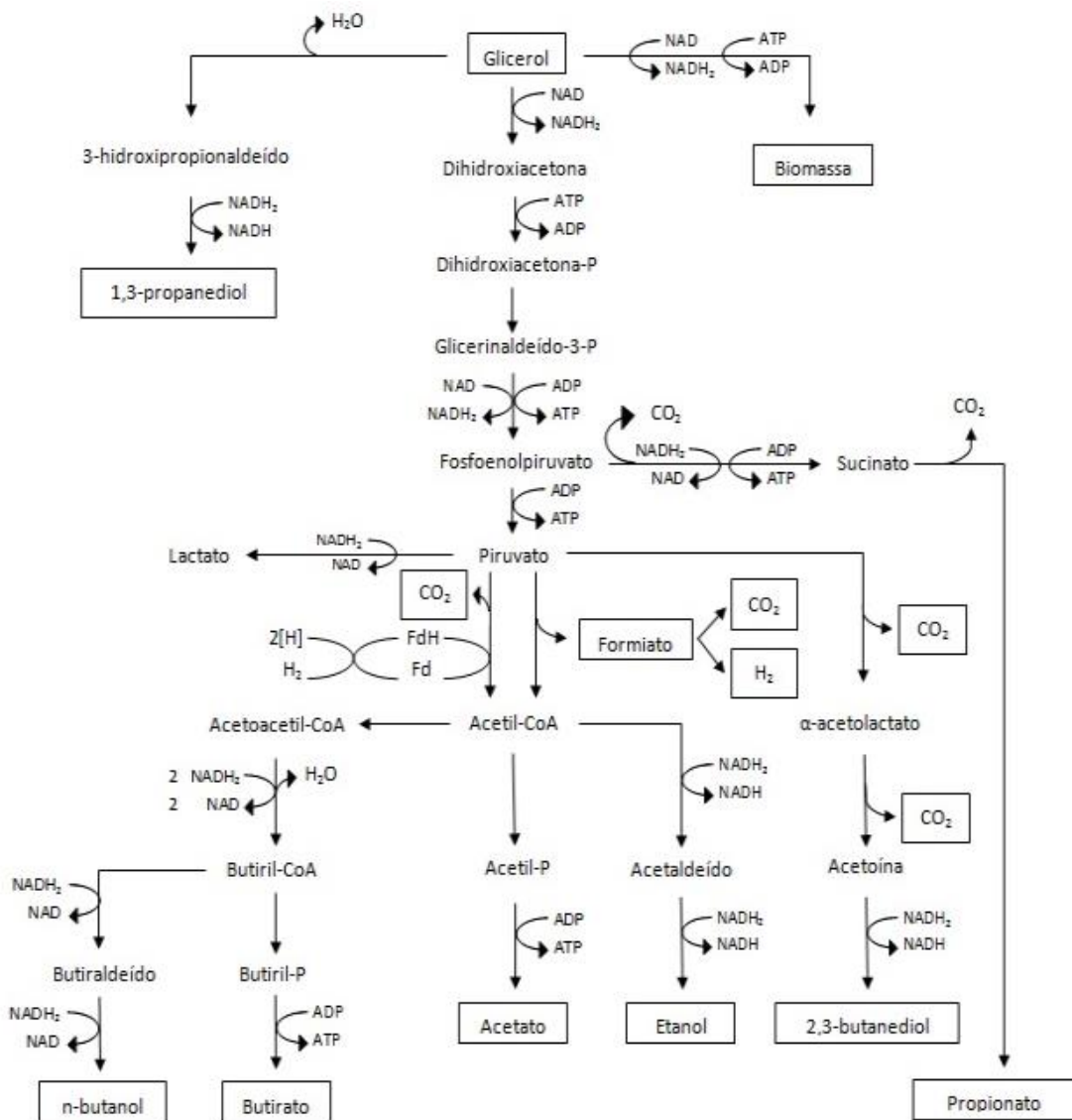


Figura 6: Vias metabólicas do glicerol (Viana, 2011 retirado de Silva *et al.*, 2009 e Biebl *et al.*, 1999).

4 Mecanismos para melhorar a digestão anaeróbia

4.1 Físicos

Os resíduos com elevados teores de sólidos totais apresentam dificuldades de degradação na hidrólise. Dessa forma, para que ocorra a biodegradação são necessários longos tempos de retenção. Os ultrassons vêm sendo utilizados como pré-tratamento físico para melhorar a eficiência do processo de digestão. A exposição de células microbianas a energia ultrassônica rompe a parede celular e a membrana liberta material intracelular, o que favorece a biodigestão. Além disso, o ultrassom também ajuda a desaglomerar os flocos biológicos e transforma partículas orgânicas de grandes dimensões em partículas de menor tamanho (Pavlostathis e Gossett, 1986; Weemaes e Verstraete, 1998).

Os fatores que interferem na desintegração ultrassônica são, por ordem de relevância: (i) pH da lama; (ii) concentração da lama; (iii) intensidade do ultrassom; (iv) densidade ultrassônica. Alguns estudos mostram que a integração de sistemas ultrassônicos melhorou significativamente o processo de digestão anaeróbia (Khanal *et al.*, 2007).

A quebra oxidativa de compostos recalcitrantes ocorre com o pré-tratamento via ultrassons, ocorrendo a libertação de radicais: (i) hidroxilo (OH•); (ii) hidrogênio (H•); (iii) hidroperóxido (HO₂•) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Adewuyi, 2001).

A entrada de energia por unidade de lama, como os sólidos totais, gera um grau de desintegração denominado entrada de energia específica (Equação 6). Para diferentes entradas de energia específica (kJ.kg⁻¹ ST) utilizando uma frequência de 20 kHz e uma potência de 225 W foi possível observar que o d₅₀ (50% das partículas com diâmetro igual ou inferior ao original) apresentou uma tendência decrescente com o aumento da entrada de energia específica (Bougrier *et al.*, 2005).

$$\text{Espec} = \frac{P \times t}{V \times ST} \quad \text{Equação 6}$$

onde:

Espec, Energia específica de entrada (kJ.kg⁻¹ ST);

P_{ot}, Potência do ultrassom (kW);

t, Tempo de duração do ultrassom (s);

V_1 , Volume da lama sonificado (L);
ST, Concentração de sólidos totais (kg.L^{-1}).

Estudos comprovam que a densidade ultrassônica é mais importante do que o tempo de sonicação para a desintegração eficaz das lamas, ou seja, o aumento de tempo de exposição não gera mudanças tão significativas quanto a mudança da densidade ultrassônica (Tiehm *et al.*, 2001; Chu *et al.*, 2001).

Num processo de digestão anaeróbia acoplada a um pré-tratamento por ultrassons, potência de 200 W e frequência de 9 kHz, por períodos de 10, 20, 30 e 40 min ocorreu melhorias na produção de metano em 15, 38, 68 e 75%, respectivamente (Wang *et al.*, 1999). No tratamento de resíduos alimentares em regime contínuo, a utilização de reator biológico sonicado (para produção de hidrogénio) seguido por um reator anaeróbio (para produção de metano), foram obtidas produções de $4,8 \text{ L H}_2\text{.L}^{-1}\text{.d}^{-1}$ e $3,4 \text{ L CH}_4\text{.L}^{-1} \text{ reator.d}^{-1}$ e um aumento da remoção de SST em 67% (Elbeshbishy e Nakhla, 2011). Num sistema de biodegradação anaeróbia de lamas de esgoto, a digestão foi significativamente melhorada por pré-tratamento com ultrassons, em torno de 14% para sistema batch. Além disso, a produção específica de metano aumentou, correlacionada com o facto dos ultrassons provocarem a desaglomeração de flocos e o aumento da área específica (Martínez *et al.*, 2015).

4.2 Biológicos

Existem diferentes microrganismos que produzem lípases, que hidrolisam ésteres de glicerol e principalmente ácidos gordos de cadeia longa. Esses microrganismos atuam sobre o substrato hidrofílico lipídico em meio aquoso. Vários métodos permitem determinar a atividade lipásica: (i) ensaios em placa, no qual os desdobramentos dos ácidos gordos do substrato conduzem ao aparecimento de um halo transparente que pode ser realçado com corantes fluorescentes; (ii) o uso de substratos coloridos ou fluorescentes que permitem a deteção por espectrofotómetro; (iii) a titulação de ácidos gordos libertados a partir de substrato; (iv) através da tensão superficial do líquido que se altera com o desdobramento do óleo (medido por um tensímetro) (Converse *et al.*, 1981; Kouker e Jaeger, 1987; Rawlyer e Siegenthaler, 1989; Samad *et al.*, 1989; Jaeger *et al.*, 1994).

4.2.1 *Aspergillus niger*

Segundo Witteveen e Visser (1995) o glicerol é o principal poliálcool para o micélio jovem do *Aspergillus niger*. Além disso, o fungo produz lipase capaz de realizar a quebra de lipídeos em ácidos gordos e glicerol. Essa lipase pode catalisar a síntese de ésteres de vários ácidos dicarboxílicos e dióis (Okumura *et al.* 1984). Existem estudos com *A. niger* utilizando o glicerol como substrato. Num deles foi estudada a síntese do glicerol por *Aspergillus niger*, em que se gera a acumulação de ácido cítrico (Legisa e Mettey, 1986). Também há estudos com a lipase desse fungo, que pode otimizar reações de síntese biocatalítica de carbonato de glicerol em 12% (Ilham e Saka, 2016). Além disso, esse biocatalizador pode ser utilizado em vários ciclos (pelo menos 4) e possui elevada estabilidade (Tudorache *et al.*, 2012). Outra pesquisa refere a formação de β -glucosidase com culturas do fungo cultivadas em farelo de trigo e glicerol, como co-substrato (Abdella *et al.*, 2016).

4.2.2 *Yarrowia lipolytica*

Culturas de *Y. lipolytica* foram utilizadas para a produção de ácido cítrico a partir de glicerol bruto na indústria de biodiesel (Ferreira *et al.*, 2016). Estes autores observaram a produção de ácido cítrico pôde ser melhorada com o aumento do caudal de oxigênio. O aumento do coeficiente de transferência de massa volumétrica de oxigênio de 7 h^{-1} a 55 h^{-1} permitiu aumentar 7,8 vezes a concentração final de ácido cítrico. A biossíntese de eritritol a partir de glicerol também é uma possibilidade; Mironczuk *et al.* (2015) avaliou a utilização de mutações dessa levedura para produção de eritritol a partir de glicerol com inibição da formação de subprodutos. Além disso, de acordo com Dobrowolski *et al.* (2016) utilizando a *Yarrowia lipolytica* foi possível transformar o glicerol da produção de sabão em óleo de célula única sem purificação.

4.2.3 *Escherichia coli*

A utilização de *Escherichia coli* para a fermentação do glicerol pode gerar produtos de valor acrescentado, hidrogénio e etanol. O aumento da concentração de glicerol acelera a fermentação e a produção de hidrogénio que afeta o crescimento celular. Num estudo realizado por Chaudhary *et al.* (2011) o rendimento máximo em etanol foi obtido com uma concentração de glicerol de 10 g.L⁻¹, tendo a produção de hidrogénio obtido a máxima para concentração de 20 g.L⁻¹. Ao estimular o crescimento de *E. coli* em glicerol (10 g.L⁻¹) a pH 6,5, foi possível a produção de hidrogénio com um rendimento de 0,75 mmol.L⁻¹ de glicerol (Trchounian *et al.*, 2016). Existem mutações de *E. coli* capazes de melhorar o rendimento de produção de hidrogénio e de etanol utilizando glicerol residual do biodiesel como substrato (Valle *et al.*, 2017).

5 Objetivos

5.1.1 *Geral*

Valorarizar o glicerol através da produção e da qualidade do biogás pelo processo de digestão anaeróbia.

5.1.2 *Específico*

- Caracterizar o glicerol bruto oriundo da produção de biodiesel;
- Caracterizar a lama anaeróbia utilizada;
- Determinar lama a ser utilizada através de testes com glicerol bruto em digestor batch anaeróbio de mistura completa;
- Avaliar a degradação do glicerol através de pré-tratamento com microrganismos e ultrassom em digestor batch anaeróbio de mistura completa;
- Caracterizar e quantificar os ácidos carboxílicos resultantes da metabolização do glicerol via HPLC;
- Testar os processos em uma mesoescala com reator tipo UASB.
- Calcular o ganho energético e económico da produção de biogás.

6 Materiais e Métodos

Foram feitos testes de condições de digestão em um reator de mistura completa em batch utilizando distintas concentrações de glicerol (0,2% a 3,2% v/v) pré-tratados com diferentes tempos de ultrassons (3 h a 15 h) e por degradação prévia do glicerol com os microrganismos *A. niger* e *E. coli*. e os melhores resultados foram replicados em um reator *Upflow Anaerobic Sludge Blanket Digestion* (UASB).

Diversas características do substrato de alimentação bem como parâmetros de operação dos reatores foram medidos, monitorados e relacionados à composição de saída dos reatores e a produção de biogás. As técnicas utilizadas são descritas pormenorizadamente nos tópicos seguintes.

6.1 Parâmetros analisados

6.1.1 Parâmetros físico-químicos

Os parâmetros físico-químicos monitorados foram: (i) pH; (ii) alcalinidade; (iii) Sólidos Totais (ST); (iv) Sólidos Fixos Totais (SF); (v) Sólidos Voláteis Totais (SV); (vi) Sólidos Suspensos Totais (SST); (vii) Sólidos Dissolvidos Totais (SDT); (viii) Sólidos Suspensos Fixos (SSF); (ix) Sólidos Suspensos Voláteis (SSV); (x) Carência Química de Oxigênio (CQO); (xi) Azoto Total (NT); (xii) Ácidos Gordos Voláteis (AGV); (xiii) Carbono Total (CT); (xiv) Carbono Orgânico Total (COT); (xv) Carbono Inorgânico Total (CIT); (xvi) Fósforo total (Ptotal). Os métodos analíticos usados são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Métodos analíticos para determinação dos parâmetros físico-químicos.

Parâmetro	Método analítico de referência
pH (escala de sorensen)	Medidor digital com elétrodo de pH, Hanna modelo EDGE de acordo com o método 4500 H ⁺ B do Standard Methods (APHA, 1998).
Alcalinidade (g CaCO ₃ .L ⁻¹)	Método 2320 B do Standard Methods (APHA, 1998).
ST (g.L ⁻¹)	Método 2540 B do Standard Methods (APHA, 1998).
SF (g.L ⁻¹)	Método 2540 E do Standard Methods (APHA, 1998).
SV (g.L ⁻¹)	Método 2540 E do Standard Methods (APHA, 1998).

Tabela 3: Métodos analíticos para determinação dos parâmetros físico-químicos (continuação).

Parâmetro	Método analítico de referência
SDT (g.L ⁻¹)	Método 2540 C do Standard Methods (APHA, 1998).
SST (g.L ⁻¹)	Método 2540 D do Standard Methods (APHA, 1998).
SSF (g.L ⁻¹)	Método 2540 G do Standard Methods (APHA, 1998).
SSV (g.L ⁻¹)	
CQO (g O ₂ .L ⁻¹)	Método colorimétrico 5220 D do Standard Methods (APHA, 1998).
NT (g.L ⁻¹)	Método 4500-N _{org} Macro-Kjeldahl do Standard Methods (APHA, 1998).
AGV (g.L ⁻¹)	Metodologia descrita em Buchauer (1998)
CT (g.L ⁻¹)	
COT (g.L ⁻¹)	Analizador TOC de Carbono Orgânico
CIT (g.L ⁻¹)	
Ptotal (mg.L ⁻¹)	Método Ácido Ascórbico 4500-P.E do Standard Methods (APHA, 1998).

6.1.2 HPLC

Os ácidos carboxílicos produzidos na digestão anaeróbia do glicerol foram determinados através de análise cromatográfica em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O cromatógrafo utilizado foi o HPLC - VWR Hitachi ELITE Lachrom com DAD L-2455 d, com uma coluna RezexTM ROA-Organic Acid H⁺ (8%), LC Column 300×, detector ultravioleta visível (UV) a 210 nm, loop 10 µL e um fluxo de 0,5 mL.min⁻¹. A fase móvel isocrática utilizou como eluente uma solução de 0,005N de ácido sulfúrico. Foram requeridos 27 min em cada amostra analisada, os tempos de retenção e os ácidos carboxílicos e a área dos padrões para a quantificação dos ácidos nas amostras estão representados na Tabela 4.

Tabela 4: Ácidos carboxílicos avaliados por HPLC.

Ácido carboxílico	Tempo Retenção (min)	Área dos padrões para a quantificação dos ácidos nas amostras
Ácido oxálico	8,5	$239132 \leq \text{Área } (\mu\text{V}\cdot\text{min}) \leq 2685393$
Ácido tartrónico	10,1-10,2	$9400 \leq \text{Área } (\mu\text{V}\cdot\text{min}) \leq 462001$
Ácido maleico	10,2-10,3	$298168 \leq \text{Área } (\mu\text{V}\cdot\text{min}) \leq 20778209$
Ácido cítrico	11,0-11,1	$30077 \leq \text{Área } (\mu\text{V}\cdot\text{min}) \leq 225458$
Ácido oxímico	11,5-11,6	$117817 \leq \text{Área } (\mu\text{V}\cdot\text{min}) \leq 5786090$
Ácido tartárico	11,7	$4802 \leq \text{Área } (\mu\text{V}\cdot\text{min}) \leq 278541$
Ácido malico	13,2	$2788 \leq \text{Área } (\mu\text{V}\cdot\text{min}) \leq 140742$
Ácido malónico	13,2	$3889 \leq \text{Área } (\mu\text{V}\cdot\text{min}) \leq 160087$
Ácido glicólico	16,2-16,3	$1945 \leq \text{Área } (\mu\text{V}\cdot\text{min}) < 88096$
Ácido succínico	16,6-16,8	$22034 \leq \text{Área } (\mu\text{V}\cdot\text{min}) \leq 117624$
Ácido chiquímico	16,8-16,9	$204538 \leq \text{Área } (\mu\text{V}\cdot\text{min}) \leq 160087$
Ácido fórmico	18,1-18,2	$7701 \leq \text{Área } (\mu\text{V}\cdot\text{min}) \leq 164942$
Ácido acético	19,8-19,9	$4401 \leq \text{Área } (\mu\text{V}\cdot\text{min}) \leq 106155$
Ácido glutárico	20,0-20,1	$3602 \leq \text{Área } (\mu\text{V}\cdot\text{min}) \leq 137143$
Ácido fumárico	20,8-21,0	$510246 \leq \text{Área } (\mu\text{V}\cdot\text{min}) \leq 22564671$
Ácido propiónico	23,4	$5140 \leq \text{Área } (\mu\text{V}\cdot\text{min}) \leq 78437$
Ácido acrílico	24,5-24,6	$115715 \leq \text{Área } (\mu\text{V}\cdot\text{min}) \leq 9562083$
Ácido adípico	25,2	$7704 \leq \text{Área } (\mu\text{V}\cdot\text{min}) \leq 106622$

6.2 Caracterização do glicerol e do inóculo

O glicerol utilizado na pesquisa provém de uma usina experimental de biodiesel, que utiliza como matéria prima óleo de cozinha vegetal, localizada na Escola Superior de Tecnologia e Gestão (ESTiG) no Instituto Politécnico de Bragança (IPB), Portugal.

Na caracterização físico-química do glicerol bruto foi avaliado o: (i) pH; (ii) CQO; (iii) CT; (iv) COT; (v) CIT; (vi) NT; (vii) ST; (viii) SF; (ix) SV; (x) SDT; (xi) SST; (xii) SSV; (xiii) Ptotal; (xiv) AGV; (xv) densidade (descrito no item 6.1.1). A caracterização da lama (inóculo) do reator anaeróbio utilizada contempla os parâmetros: (i) ST; (ii) SF; (iii) SV e (iv) CQO.

6.3 Reator batch de mistura completa

Referente a Figura 7, o reator batch utilizado tem um volume total de 500 mL (1) com um detetor de metano (2) e a um medidor de volume de biogás (5) acoplados. O controle de temperatura é feito através de uma fita de aquecimento (3) e agitado através de um agitador magnético (4). A aquisição de dados referente à percentagem de metano no gás é obtida em contínuo, por intermédio de um processador de dados (6), mediante o software da *BlueSens* visualizados no ecrã (7).

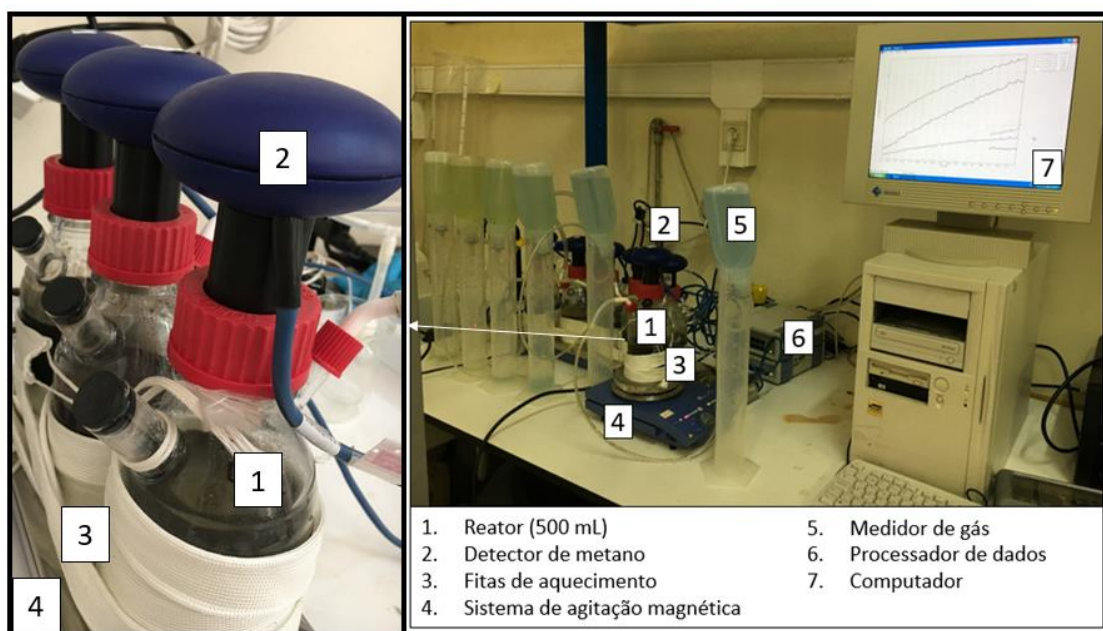


Figura 7: Reator batch com sensor de metano, fluxímetros e unidade de aquisição de dados.

A componente do sistema batch e sua função encontra-se representada na Tabela 5.

Tabela 5: Componentes do sistema de digestão em batch.

Material Utilizado	Nome e Função
	Sensor de metano: medição em contínuo da percentagem de metano no gás (%).
	Reator batch de mistura completa com agitador magnético.
	Fita de aquecimento e unidade de controlo: mantém o sistema a temperatura de 37°C
	Medição de volume de gás gerado por deslocamento de líquido (mL).
	Unidade de aquisição e comunicação de dados: os sinais correspondentes as percentagens de metano são processadas e tratadas pelo software da <i>BlueSens</i> .

A experiência foi realizada com controle de temperatura na fase mesófila entre 35°C e 40°C. De acordo com as características do glicerol são adicionados: nitrato de potássio (C:N de 25:1), fosfato dissódico (C:P de 120:1) e bicarbonato de sódio (2 g.L⁻¹).

6.3.1 Inóculo (avaliação da qualidade da lama)

Numa fase preliminar foi avaliada a qualidade da lama de duas proveniências diferentes, do digestor anaeróbio da Estação de Tratamento de Águas Residuais (ETAR) de Vila Real (DA-VR) e do digestor anaeróbio da ETAR de Vila do Conde (DA-VC), com uma variação de concentração de glicerol entre 0,2% e 3,2%. No ensaio experimental foi utilizado um volume total (lama + substrato) de 300 mL, com um controle de temperatura entre 35°C-40°C. O tipo de lama utilizado e as variações das concentrações de glicerol foram avaliados através do *design fatorial 2²* (Tabela 6). A resposta do planeamento experimental foi avaliada pela produção de metano (%), o volume de biogás gerado, a remoção da CQO (15 dias e 30 dias) e a série de ST (15 dias e 30 dias). Assim como avaliado o produto final em relação aos ácidos carboxílicos, por HPLC (item 5.1.2).

Tabela 6: Planeamento experimental para avaliação da qualidade da lama através do *design fatorial 2²*.

#	Glicerol (%)	Lama
1	0,2	DA-VR
2	3,2	DA-VR
3	0,2	DA-VC
4	3,2	DA-VC
5	1,7	DA-VR
6	1,7	DA-VC

6.3.2 Pré-tratamento do glicerol bruto

De acordo com resultados do ensaio anterior, a lama que apresentou melhores resultados de produção de metano foi testada em dois tipos de pré-tratamentos do glicerol. O físico, utilizando ultrassons, e o biológico, utilizando o *Aspergillus niger* (AN) e *Escherichia coli* (EC) (TCS Biosciences disco MM 94 número 16404 e disco ATLC 25922, respetivamente).

6.3.2.1 Pré-tratamento biológico

As amostras de glicerol foram expostas aos microrganismos e após o seu período de crescimento e colocadas nos reatores anaeróbios com a adição do inóculo. Os períodos de crescimento para os microrganismos *A. niger* e *E. coli* é de 7 dias e 2 dias, respectivamente, em meio de cultivo líquido a uma temperatura de 28°C (Tabela 7).

Tabela 7: Meio de cultivo líquido para atividade lipásica.

Meio de cultivo sólido
Extrato de levedura 1%
Fonte de lipídeo nas concentrações determinadas
Tris-HCL pH 7,5 200 mM

O glicerol previamente metabolizado pelos microrganismos representados na Figura 8 (1) foram colocados no reator de mistura completa em batch (2) com 200 mL de inóculo (lama). Foi avaliada a CQO de entrada (lama + glicerol degradado previamente pelos microrganismos), após 15 dias e no final da experiência (30 dias). Determinaram-se sólidos (ST, SF, SV) com 15 dias e 30 dias de ensaio. A quantidade de gás e qualidade em percentagem de metano foram medidas diariamente (3).

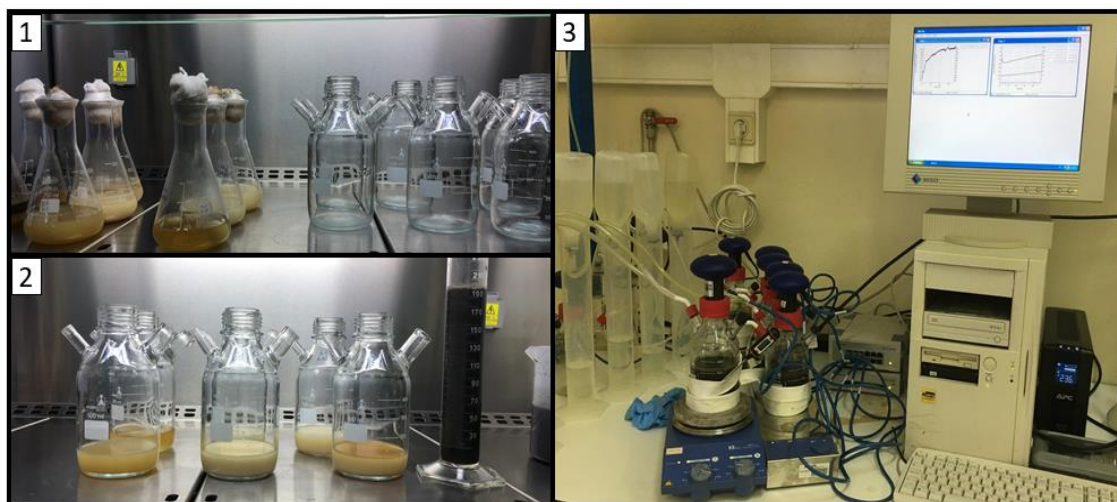


Figura 8: Avaliação de microrganismos para auxiliar a digestão anaeróbia.

O presente pré-tratamento foi analisado através do *design fatorial 2²* (Tabela 8).

Tabela 8: Planejamento fatorial utilizando microrganismos *A. niger* e *E. coli* através do *design fatorial 2²*.

Concentração Glicerol (%)	Microrganismo
0,2	<i>A. niger</i>
3,2	<i>A. niger</i>
0,2	<i>E. coli</i>
3,2	<i>E. coli</i>
1,7	<i>A. niger</i>
1,7	<i>E. coli</i>

6.3.2.2 Pré-tratamento físico

O pré-tratamento físico, utilizando ultrassons, seguiu a metodologia pela qual, a cada amostra, são adicionados 300 mL de inóculo e glicerol com as concentrações de 0,2, 1,7 e 3,2%. Posteriormente são colocadas no ultrassons (Selecta, 9 L) (Figura 9) durante uma hora por dia, até totalizar o tempo referido na Tabela 9. Foi avaliado o biogás produzido diariamente (% CH₄ e volume); a CQO (inicial, após 15 dias e final de 30 dias); os ST, SF e SV (15 dias e final de 30 dias) através de *design fatorial 2²* (Tabela 9).



Figura 9: Equipamento de ultrassons.

Tabela 9: Planeamento fatorial utilizando ultrassons através do *design fatorial 2*².

Concentração Glicerol (%)	Tempo de ultrassons (h)
0,2	3
3,2	3
0,2	15
3,2	15
1,7	9

6.4 Ensaio em contínuo usando um reator UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket Digestion)

6.4.1 Reactor UASB

Após os ensaios preliminares no reator batch de mistura completa, as condições experimentais mais favoráveis foram avaliadas num reator tipo UASB em “Y” (Figura 10). O reator era formado por dois tubos de PVC com diâmetro nominal de 10 cm. Os dois tubos adquirem uma forma de “Y”, sendo que um dos tubos com comprimento de 185 cm (153 cm de altura útil) é posto na vertical formando um ângulo de 45° com o segundo tubo de 86 cm de comprimento (57 cm de altura útil).

A alimentação do reator (Figura 10 – 1 a 3) é feita por meio de uma bomba peristáltica controlada por um temporizador, que fica ligada por um período de 15 min a um caudal de 2 mL.min⁻¹, em seguida, desliga por 15 min e assim sucessivamente. Isso resulta em um caudal diário de 1440 mL.d⁻¹ e um tempo de retenção hidráulico (TRH) de 11,5 d.

Com a recirculação em sistema fechado a 50°C é obtida uma temperatura interna no reator de 40 a 45°C, monitorizada por termopares ao longo do eixo vertical localizados nos pontos 6 e 7 (Figura 10).

A alimentação é introduzida em fluxo ascendente, com maior concentração de sólidos e biomassa no fundo do reator. A biomassa formada consome o substrato via digestão anaeróbia deixando-o estabilizado e libertando gás. Esse gás leva parte dos sólidos ao separador trifásico (Figura 10 - 8), ou seja, ocorre a separação das partículas sólidas que voltam por gravidade ao fundo do reator. O gás recolhido (Figura 10 - 9) é

quantificado em relação ao volume (Figura 10 - 15) e percentagem de metano (Figura 10 - 16). O material estabilizado segue o seu trajeto na secção inclinada (Figura 10 - 10) até ao decantador (Figura 10 - 11). O decantado (volume decantador 7 L) é bombeado (12) e recirculado voltando ao reator UASB (Figura 10 - 13) a um caudal de $16 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ controlado para funcionar quatro vezes por dia e durante 15 min.

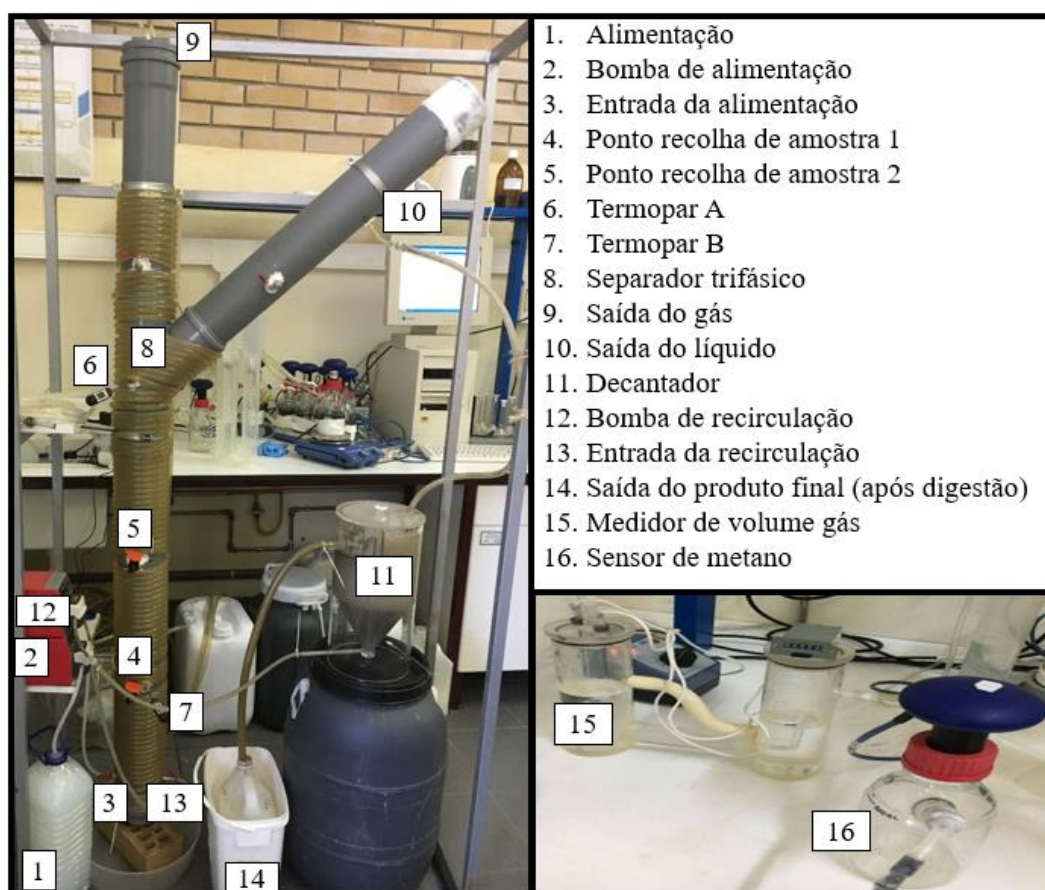


Figura 10: Ilustração experimental do reator UASB.

6.4.2 Ensaios experimentais em reator UASB

Inicialmente adicionou-se 13 litros da lama do reator anaeróbio da ETAR de Vila Real (DA-VR) ao reator UASB. Seguiu-se uma fase de adaptação dos microrganismos ao glicerol adicionando 200 mg/L metanol no primeiro dia e 100 mg/L de glicerol e 100 mg/L de metanol no segundo dia, totalizando 200 mg/L. Posteriormente submetido a uma alimentação com glicerol.

A cada 15 dias realizou-se a recolha de amostras no interior do reator (Figura 10 – 4 e 5), na alimentação e na saída do produto final após a digestão (Figura 10 – 14). Essas amostras foram analisadas seguindo os parâmetros da Tabela 10.

Tabela 10: Parâmetros monitorizados do reator UASB e frequência de amostragem.

Parâmetro	Frequência de Amostragem		
	Entrada do Reator	Reator	Saída do Reator
pH	Diário	Diário	Diário
Temperatura	Diário	Diário	Diário
Volume gás	-	-	Diário
% Metano	-	-	Diário
ST	Quinzenal	Quinzenal	Quinzenal
SF	Quinzenal	Quinzenal	Quinzenal
SV	Quinzenal	Quinzenal	Quinzenal
SDT	Quinzenal	Quinzenal	Quinzenal
SDV	Quinzenal	Quinzenal	Quinzenal
SST	Quinzenal	Quinzenal	Quinzenal
SSF	Quinzenal	Quinzenal	Quinzenal
SSV	Quinzenal	Quinzenal	Quinzenal
Fósforo	Quinzenal	Quinzenal	Quinzenal
CQO	Quinzenal	Quinzenal	Quinzenal

6.4.2.1 Alimentação com menor carga e comparação com o uso de ultrassons

A alimentação foi inicialmente preparada com a adição de glicerol, água destilada, nitrato de potássio, fosfato dissódico e bicarbonato de sódio. Em seguida, o reator foi alimentado com uma carga de $0,34 \text{ kg CQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ durante três semanas (equivalente a 0,2% de glicerol v/v). Após este período, durante duas semanas a alimentação de mesma carga passou previamente por 15 h de ultrassons (ultrassons-H, *Selecta*, 9 litros).

6.4.2.2 Alimentação com maior carga e comparação com o uso do microrganismo *Aspergillus niger*

Nos ensaios seguintes, o reator operou com uma carga volumétrica de 1,56 kg CQO.m⁻³.d⁻¹ durante três semanas (equivalente a 1,7% de glicerol v/v).

Para o pré-tratamento com *A. niger* adicionou-se, antes da alimentação, um reator aeróbio de 3,7 L com injeção de ar através de uma bomba (Aqual El 150, potência de 2,5W e injeção de 150 L_{ar}.h⁻¹). O fungo *A. niger* foi preparado previamente no meio de cultura (Tabela 7) durante 7 d no reator aeróbio. Após esse período, o reator aeróbio foi ligado ao digestor UASB com uma alimentação contínua de 1,56 kg CQO.m⁻³.d⁻¹ (2 mL.min⁻¹ a cada 15 min), a que corresponde um TRH de 2,6 d (Figura 11).



Figura 11: Reator aeróbio utilizado para alimentação do reator UASB com glicerol pré-tratado com *Aspergillus niger*.

7 Resultados e Discussão

7.1 Caracterização

7.1.1 Caracterização do substrato (glicerol)

A caracterização do glicerol (Tabela 11) está de acordo com os parâmetros encontrados na literatura, conforme Tabela 1. Devido à falta de azoto e fósforo no substrato, foram adicionados na alimentação nitrato de potássio e o fosfato dissódico, respeitando a relação C:N de 25:1 e C:P de 120:1, tendo em atenção o valor de carbono total (Probiogás, 2010). Linville *et al.* (2016) referem que os valores da alcalinidade devem estar na gama de 2000 a 5000 mg.L⁻¹ de CaCO₃, de forma a evitar inibição da fase metanogénese foi adicionado bicarbonato de sódio (2000 mg.L⁻¹).

Tabela 11: Caracterização do glicerol residual.

Parâmetro	Valor
pH	8,4
CQO (g.L ⁻¹)	1808
CT (g.L ⁻¹)	523
COT (g.L ⁻¹)	521
CIT (g.L ⁻¹)	1,3
NT (mg.L ⁻¹)	0,2
ST (g.L ⁻¹)	462
SF (g.L ⁻¹)	36
SV (g.L ⁻¹)	426
SDT (g.L ⁻¹)	456
SST (g.L ⁻¹)	5,8
SSV (g.L ⁻¹)	5,3
Ptotal (mg.L ⁻¹)	0,2
AGV (g.L ⁻¹)	9,7
Densidade (kg.m ⁻³)	1022

7.1.2 Caracterização do inóculo (lama do reator anaeróbio)

Foram testadas lamas provenientes de dois reatores anaeróbios, um da ETAR de Vila Real (DA-VR) e outro da ETAR de Vila do Conde (DA-VC). A relação SV/ST é um indicador da proporção de microrganismos encontrados nos sólidos da lama. Tawfik e Klapwijk (2010) e Al-Jamal e Mahamoud (2009) apontam valores de 0,66 e 0,67 como adequados para o bom desempenho do reator. Foi obtido para a razão SV/ST um valor de 0,75 para a lama do DA-VC e 0,65 para DA-VR (Figura 12), sendo que o DA-VR vai de encontro aos valores de referência da literatura. A um maior valor de SV/ST, corresponde uma maior estabilização da lama (von Sperling e Gonçalves, 2001). Tal foi comprovado a partir dos valores da CQO, em que a lama DA-VC (com maior relação SV/ST) registrou $0,5 \text{ g.L}^{-1}$, enquanto a lama DA-VR (com menor relação SV/ST) registrou $12,8 \text{ g.L}^{-1}$ para a CQO.

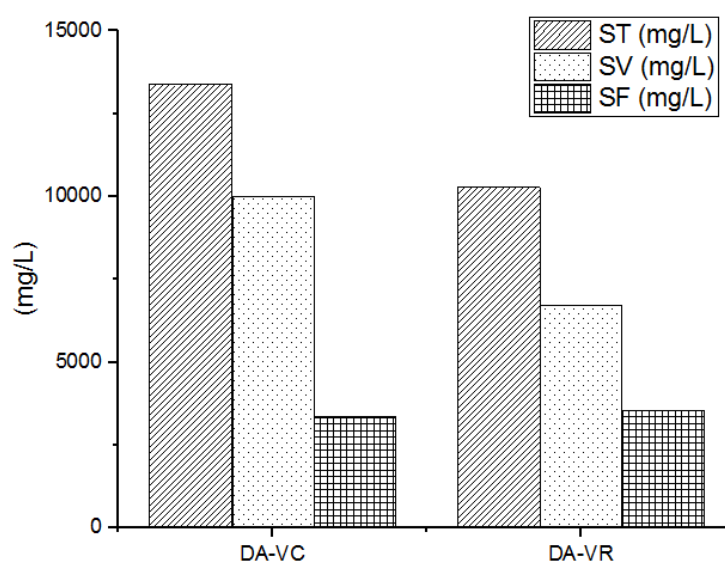


Figura 12: Concentração de sólidos (totais, voláteis e fixos) nas lamas dos reatores anaeróbios da ETAR de Vila Real (DA-VR) e Vila do Conde (DA-VC).

7.2 Via metabólica e degradação do glicerol

Os resultados do HPLC revelaram que ocorreu formação dos ácidos oxálico, propiónico e glutárico. Estas reações ocorrem devido à utilização de NAD, ATP e ADP sendo necessário adicionar uma fonte de fósforo na digestão anaeróbia.

O ácido propiônico ou propinato pode ser formado pela degradação do glicerol por digestão anaeróbia como refere Biebl *et al.* (1999) e Silva *et al.* (2009). Neste caso, o glicerol é convertido em dihidroxiacetona que se liga a um fósforo formando o dihidroxiacetona-P, de onde se obtém gliceraldeído-2-P que se transforma em ácido succínico ocorrendo a formação do ácido propiônico (Figura 13).

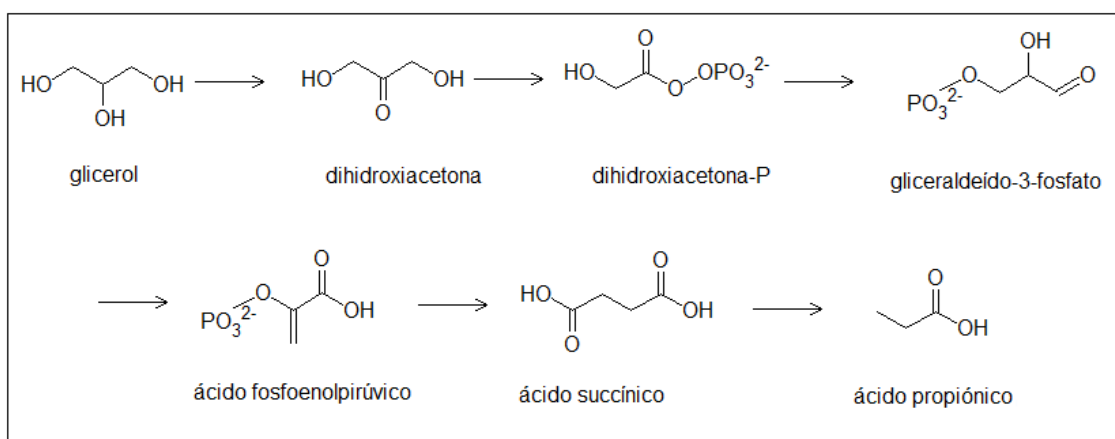


Figura 13: Formação de ácido propiônico a partir de glicerol (modificado Biebl *et al.*, 1999 e Silva *et al.*, 2009).

A formação do ácido oxálico foi descrita por Kwon e Koper (2010) num processo de eletro-oxidação do glicerol. Neste processo o glicerol é transformado em ácido glicérico, que por sua vez é transformado em ácido glicólico, obtendo-se o ácido oxálico (Figura 14).

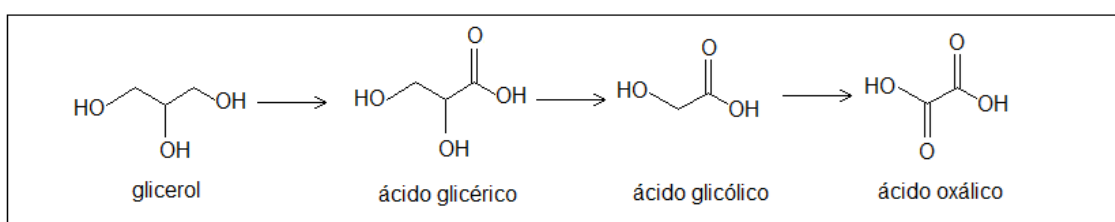


Figura 14: Formação do ácido oxálico a partir de glicerol (modificado Kwon e Koper, 2010).

Para a rota metabólica do ácido oxálico pode se utilizar como substrato glucose (Cleland e Johnson, 1955), ácidos gordos (Musial *et al.*, 2006) e glicerol (André *et al.*, 2010). Através da formação do gliceraldeído, seguida de glicolato e do ciclo do gliocilato obtém-se o oxalato (Cleland e Johnson, 1995).

A utilização de glicerol como substrato está relacionada com lípases e esterases (enzimas que catalisam reações de hidrólise de éster) produzidas pelos microrganismos, esses processos bioquímicos podem formar o ácido glutárico (Gilham e Lehner, 2005).

Estes ácidos possuem várias aplicações comerciais que se encontram descritas na Tabela 12.

Tabela 12: Aplicação dos ácidos carboxílicos derivados do glicerol.

Derivado do glicerol	Aplicação	Referência
Ácido oxálico	Limpeza ou branqueamento, remoção de pó, mordente (mantém a durabilidade da cor) em processos de tingimento, fermento em pó.	Bagheri <i>et al.</i> , 2015
Ácido propiônico	Intermediário químico importante na síntese de fibras de celulose, herbicidas, perfumes e produtos farmacêuticos. Também utilizado como conservante de alimentos.	Hsu e Yang, 1991; Gu <i>et al.</i> , 1998; Martínez-Campos e Torre, 2002
Ácido glutárico	Aplicação em pesticidas, medicamentos e aditivos alimentares.	McNamara <i>et al.</i> , 2006

7.3 Reator de mistura completa em batch

7.3.1 Efeito da lama no processo de digestão anaeróbia

O gráfico de efeito principal representa a influência dos fatores categóricos na resposta contínua, ou seja, quanto que um fator de entrada causa efeitos em um parâmetro de saída. A linha azul representa a extremidade dos fatores de entrada e a linha vermelha os pontos centrais de entrada. Quanto maior é a inclinação da linha, maior é a magnitude do efeito principal (Montgomery, 1997).

A partir da análise estatística obtida do *design fatorial 2²* foi possível avaliar os efeitos do tipo de lama e da concentração de glicerol nos parâmetros analisados (Figura 15). A concentração do glicerol teve mais interferência na produção de metano (A), na qualidade do gás (B) e na produção de biogás (C). Relativamente à remoção da CQO pode observar-se que a lama utilizada é o fator com maior influência (D). Os melhores

resultados foram obtidos com a concentração de 0,2% do glicerol. Os resultados mais satisfatórios foram obtidos com a lama de DA-VR.

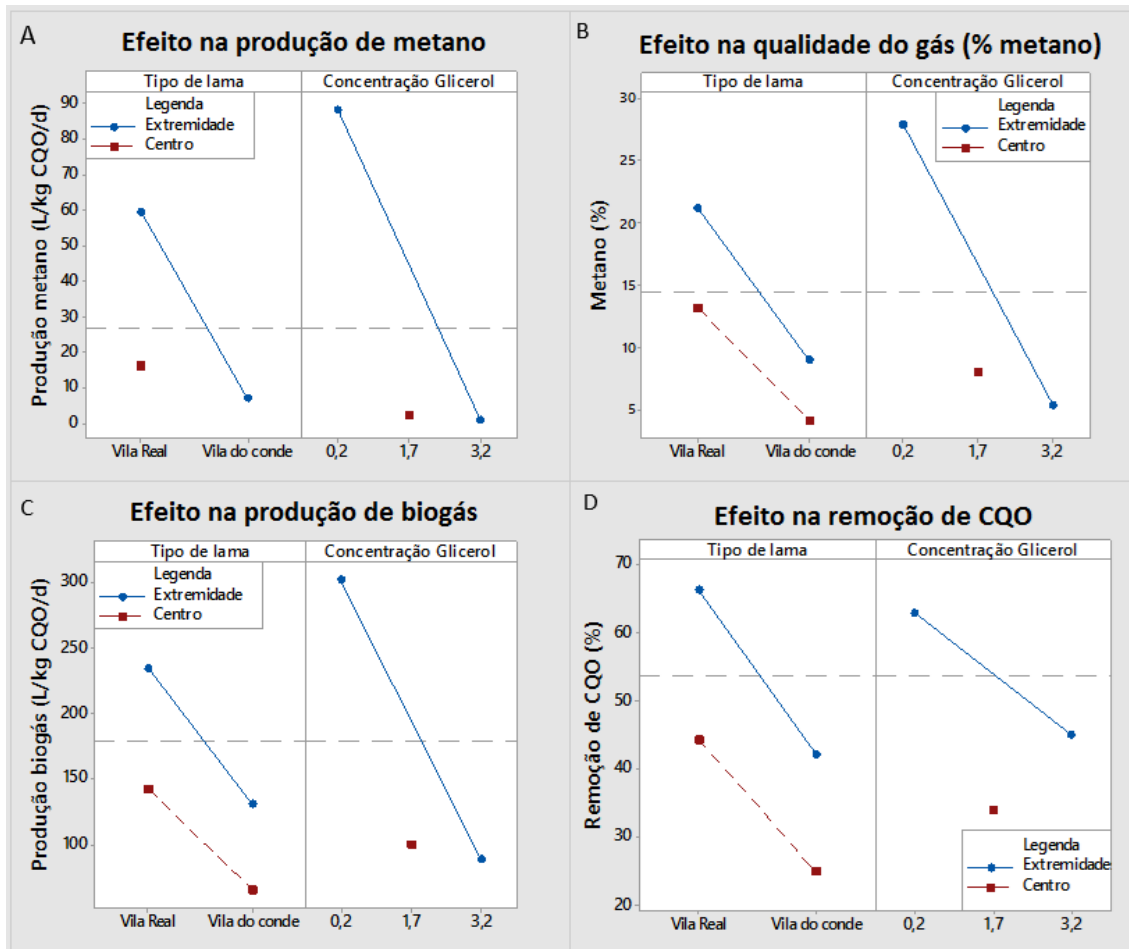


Figura 15: Efeito da concentração de glicerol e do tipo de lama na produção de biogás, metano e na remoção de CQO para o reator batch.

Verificaram-se efeitos significativos da CQO inicial na qualidade do biogás gerado (% CH₄), como é mostrado na Figura 16. Os SV e a relação entre os fatores SV e CQO não tiveram efeito significativo na produção de CH₄.

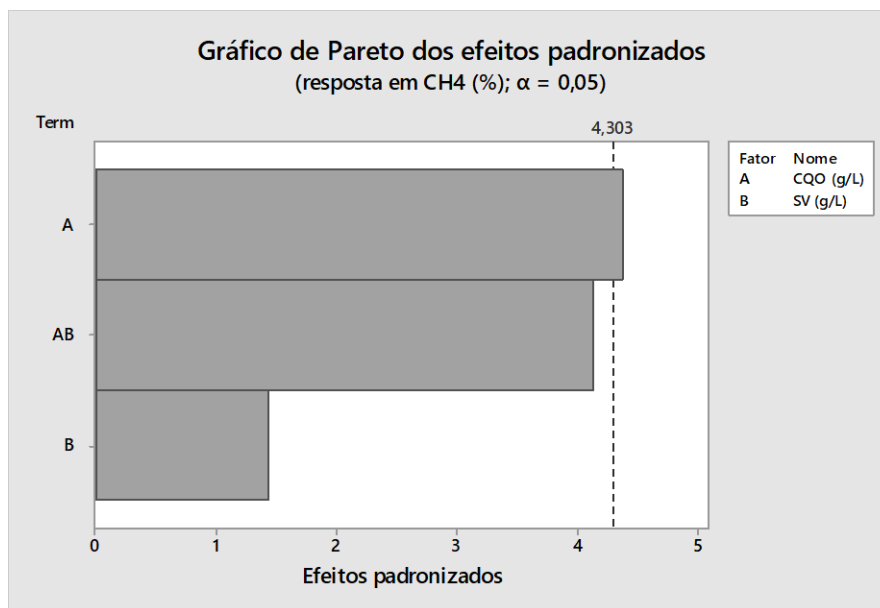


Figura 16: Gráfico de Pareto de efeitos padronizados (CQO e SV) sobre a qualidade do biogás formado.

A partir dos valores iniciais de SV para o ensaio experimental e dos valores iniciais da CQO de cada experiência, foi possível obter uma correlação entre os parâmetros % CH₄, CQO e SV, Equação 7, com um R² de 99,67, o valor-P é inferior a 5% representando a rejeição da hipótese nula (Montgomery, 1997).

$$\text{CH}_4 (\%) = 138,18 - 10,75.CQO - 9,155.SV + 0,751.CQO.SV \quad \text{Equação 7}$$

onde:

CH₄ (%), Percentagem de metano (%);

CQO, Carência Química de Oxigênio do glicerol (g.L⁻¹);

SV, Sólidos Voláteis iniciais (lama + substrato) (g.L⁻¹).

De acordo com os resultados da Figura 17, as experiências realizadas com 1,7% e 3,2% de glicerol obtiveram produções de biogás de 200 a 900 mL (A), no entanto, a qualidade do gás foi pouco relevante apresentando uma variação de volume de metano entre 0 e 15 mL (B). No caso da experiência com concentração de 0,2% de glicerol foi obtida uma produção de biogás com melhor qualidade, pois as lamas do DA-VR e do DA-VC apresentaram um volume de metano de 575 mL e 294 mL, respectivamente (B).

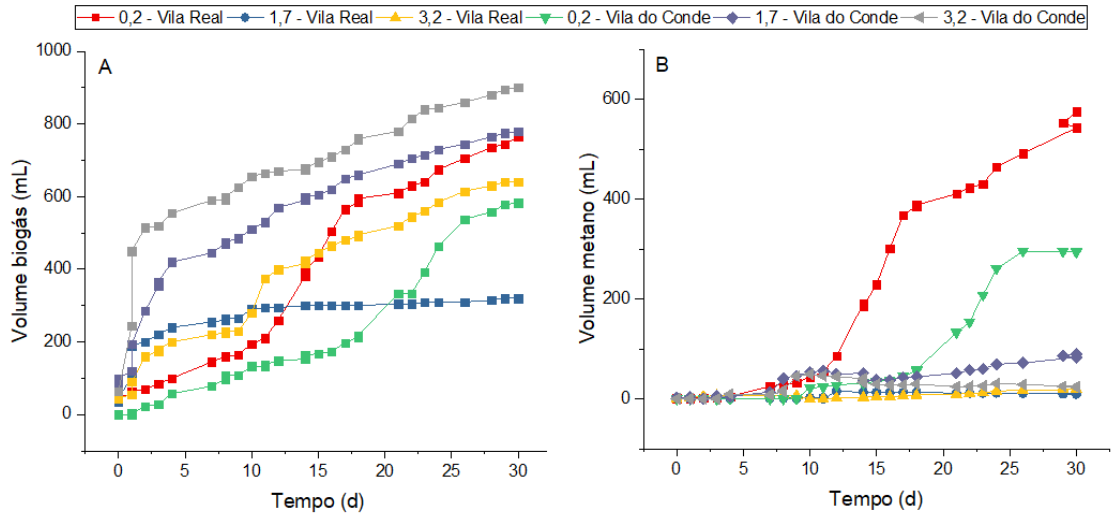


Figura 17: Volume de biogás e metano, no reator em batch, para as lamas DA-VR e DA-VC.

Os valores de remoção da CQO foram mais altos nos testes realizados com as lamas do DA-VR, obtendo-se valores de 69,4%, 58,5 e 64,3%, enquanto que nos testes realizados com lama do DA-VC, atingiram-se valores de 37,8%; 41,7% e 46,9%, para alimentação com percentagem de glicerol de 0,2%, 1,7% e 3,2%, respetivamente (Figura 18). Ma *et al.* (2008) em ensaios de co-digestão de glicerol com água residual do processamento de batata, obtiveram remoções da CQO de 75%, sendo mais próximo ao teste do DA-VR com 0,2% de glicerol.

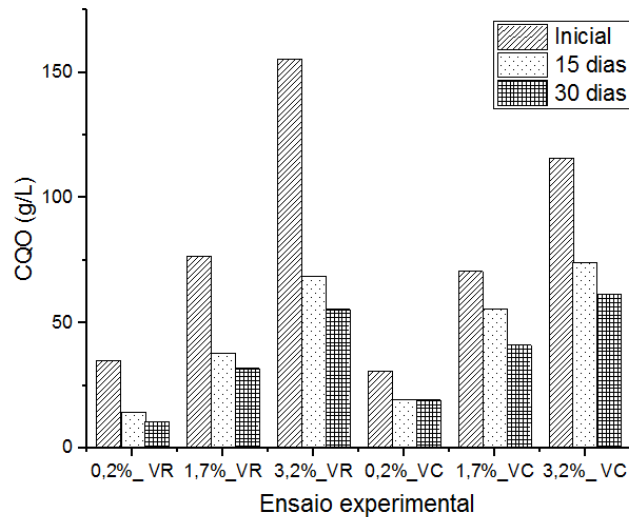


Figura 18: CQO para os ensaios experimentais em batch, usando dois tipos de lama.

No ensaio experimental com 0,2% de glicerol e lama do DA-VR, foram obtidos os melhores resultados em termos de produção de metano, 530 L CH₄.kg⁻¹ CQO (24 L CH₄.kg⁻¹ CQO removido) 938 L CH₄. kg⁻¹ glicerol (0,959 m³ CH₄. L⁻¹ glicerol) e 97 L CH₄.kg⁻¹ SV (Tabela 13). Nghiem *et al.* (2014) utilizaram um reator de mistura completa (50 L) em contínuo a 35°C com co-digestão anaeróbia de lama de esgoto e glicerol (0,63% v/v) obtendo 1,3 m³ CH₄.L⁻¹ glicerol. Siles *et al.* (2010) utilizaram a co-digestão de águas residuais da produção de biodiesel e glicerol acidificado e alcançaram a produção de metano de 310 L CH₄.kg⁻¹ CQO removido, a 1 atm e 25°C. Num sistema de co-digestão com efluente da indústria de frutos do mar e glicerol residual foram registradas produções de 291 L CH₄.kg⁻¹ SV (Panponga *et al.*, 2015).

Os ensaios experimentais com baixa percentagem de glicerol (0,2%) apresentaram produções de metano próximos da literatura. Enquanto que, as altas percentagens de glicerol (1,7% e 3,2%) foram responsáveis pela inibição dos microrganismos metanogénicos, ocorrendo apenas produção de biogás e não de metano (Tabela 13).

Tabela 13: Produção de biogás e metano para alimentação com diferentes % de glicerol e lama do DA-VR e do DA-VC.

Lama	Subs. (%)	CH ₄ (%)	CQO (g.L ⁻¹)	L biogás. kg ⁻¹ CQO	L CH ₄ . kg ⁻¹ CQO	SV (mg.L ⁻¹)	L biogás. kg ⁻¹ SV	L CH ₄ . kg ⁻¹ SV	L biogás. kg ⁻¹ glicerol	L CH ₄ . kg ⁻¹ glicerol
DA-VR	0,2	75,2	1,1	705	530,1	5,9	129	96,9	1248	937,9
	1,7	5,1	9,2	35	1,8	14,4	22	1,1	61	3,1
	3,2	3,6	17,4	35	1,3	13,5	46	1,7	63	2,3
DA-VC	0,2	56,3	1,1	473	266,2	8,8	59	33,0	837	471,1
	1,7	11,5	9,2	85	9,7	12,3	64	7,3	150	17,2
	3,2	7,5	17,4	52	3,9	14,2	63	4,8	92	6,9

No ensaio experimental com a lama do DA-VC e 3,2% de glicerol obteve-se uma maior produção de ácido glutárico e ácido propiónico, relacionada com a menor produção de metano (6,9 L CH₄.kg⁻¹ glicerol). O ácido oxálico manteve-se em concentrações similares para todas as concentrações de glicerol (Figura 19).

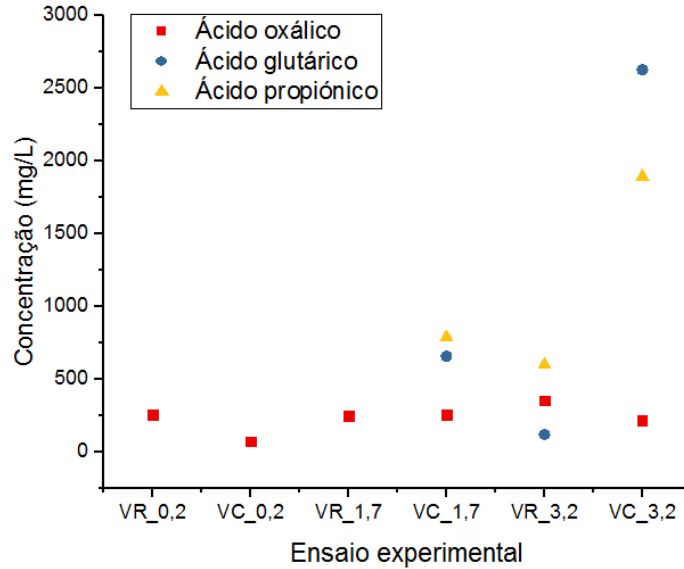


Figura 19: Concentração de ácidos carboxílicos no final do ensaio experimental para as duas lamas testadas.

A lama do DA-VR apresentou maior produção de metano com 0,2% de glicerol, sendo utilizada nos ensaios subseqüentes do presente estudo.

7.3.2 Efeito do pré-tratamento do glicerol por ultrassons no desempenho do processo de digestão anaeróbia

Nesta seção é avaliado o efeito da concentração de glicerol pré-tratado com diferentes tempos de ultrassons (3 h a 15 h), no desempenho global do processo de digestão anaeróbia.

Com os valores do tempo de exposição do glicerol aos ultrassons e a concentração de substrato foi possível obter a % CH₄ (qualidade do gás). Através da análise estatística pelo *design fatorial 2²* obteve-se a Equação 8, com um R² de 99,88% e valor-P de 0,003, que representa a rejeição da hipótese nula. Um exemplo de aplicação desta equação para um ensaio experimental, com um tempo total de exposição a ultrassons de 15 h e uma concentração de 0,2% de glicerol, a equação é: CH₄ (%) = 27,943 + 0,07 + 47,16 de onde se obtém um valor teórico de 75,2%, bastante próximo do valor experimental de 76,8%.

$$\text{CH}_4 (\%) = 27,943 + 0,01 (T_0) - 3,11 (T_3) + 3,03 (T_9) + 0,07 (T_{15}) + 47,16 \\ (S_{0,2\%}) - 22,85 (S_{1,7\%}) - 24,32 (S_{3,2\%})$$

Equação 8

onde:

CH_4 (%), Percentagem de metano (%);

T, tempo de ultrassons (h);

$S_{0,2\%}$, substrato de 0,2% de glicerol;

$S_{1,7\%}$, substrato de 1,7% de glicerol;

$S_{3,2\%}$, substrato de 3,2% de glicerol.

De acordo com a Figura 20, quanto menor a concentração do glicerol e maior a E_{esp} (energia específica, Equação 6), melhor é a qualidade do gás (C) e maior a produção de metano em relação ao glicerol (A) e os SV (B) é obtida. Bougrier *et al.* (2005) referem que o aumento da E_{esp} origina uma tendência decrescente no d_{50} (50% das partículas com diâmetro igual ou inferior ao original). Quando as partículas diminuem o tamanho há um aumento da área de contato com os microrganismos, aumentando a produção de metano.

A razão SV/ST (Figura 20 - D) é menor com o aumento da E_{esp} e para menor carga de glicerol, o que resulta numa lama menos estabilizada, na fase de crescimento dos microrganismos (Al-Jamal e Mahamoud, 2009; Tawfik e Klapwijk, 2010).

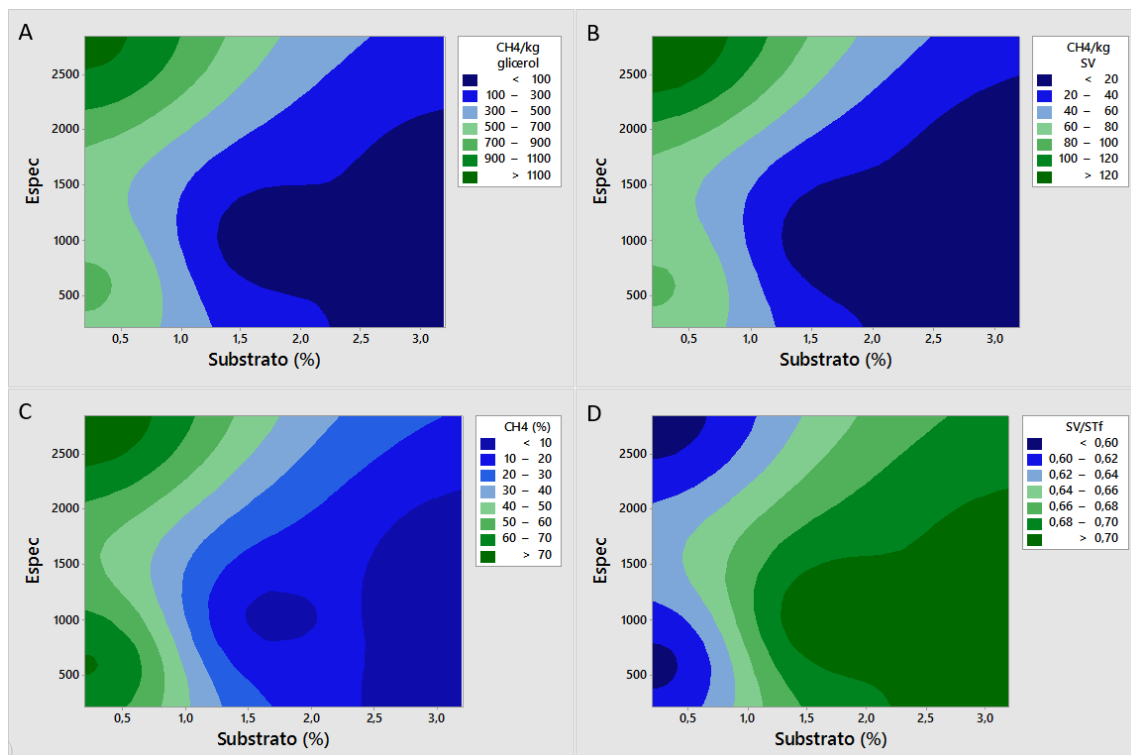


Figura 20: Relação da E_{esp} e da concentração de substrato com os parâmetros analisados.

Segundo Pavlostathis e Gossett (1986) e Weemaes e Verstraete (1998) a exposição de células microbianas a energia ultrassônica liberta material intracelular. Para a concentração de 0,2% de glicerol, o volume de metano aumentou de 575 mL (Figura 17 – b) para 707 mL após 15 h submetido a ultrassons (Figura 21 – b), um acréscimo de 23%. Ao passo que para a concentração de glicerol de 1,7% e 9 h de ultrassons o volume de metano obtido foi de 55 mL. E na concentração de glicerol de 3,2%, o volume de metano foi de 23,5 mL para o tempo de 3 h.

As concentrações de glicerol de 1,7% e 3,2% não conseguiram atingir produções elevadas, sendo a percentagem de metano de 8,1% e 2,1%, respetivamente. No entanto, para a concentração de glicerol de 0,2% obtiveram-se resultados mais satisfatórios, quer no volume de biogás gerado, quer na qualidade do gás, alcançando 78% de metano (Figura 21 e Tabela 14).

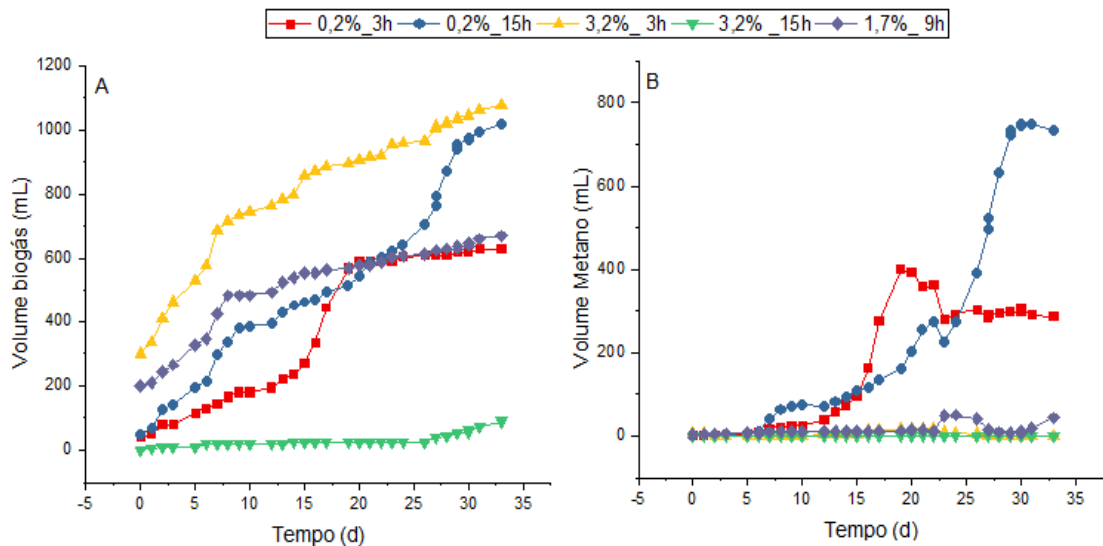


Figura 21: Volume acumulado de biogás e de metano: pré-tratamento do glicerol por ultrassons.

Os ensaios experimentais em que o glicerol foi previamente sujeito a ultrassons, apresenta remoções significativas da CQO, no intervalo 30% a 80%, como mostra a Figura 22. Estes valores de remoção são similares aos obtidos por Ma *et al.* (2008) com 75% na remoção de CQO na co-digestão anaeróbia do glicerol e água residual do processamento de batata (2 mL de glicerol por litro de água residual) com alimentação contínua em reator UASB e Silvestre *et al.* (2015) com remoção de 57% de CQO na co-digestão de glicerol (1,25% v/v) e lama de esgoto em um reator de mistura completa em contínuo. No entanto são valores baixos quando comparados com os registados por Athanasoulia e Aivasidis (2014), entre 88% e 96,4%, na co-digestão de glicerol bruto de biodiesel e lamas de efluente doméstico.

De acordo com Hutnan *et al.* (2013), o tratamento microbiológico a longo prazo do glicerol bruto não diluído levou à inibição do processo devido ao acúmulo de sais inorgânicos dissolvidos. Os ultrassons podem ter provocado maior dissolução dos sais inorgânicos no meio, resultando em melhores remoções de CQO e melhor produção de metano.

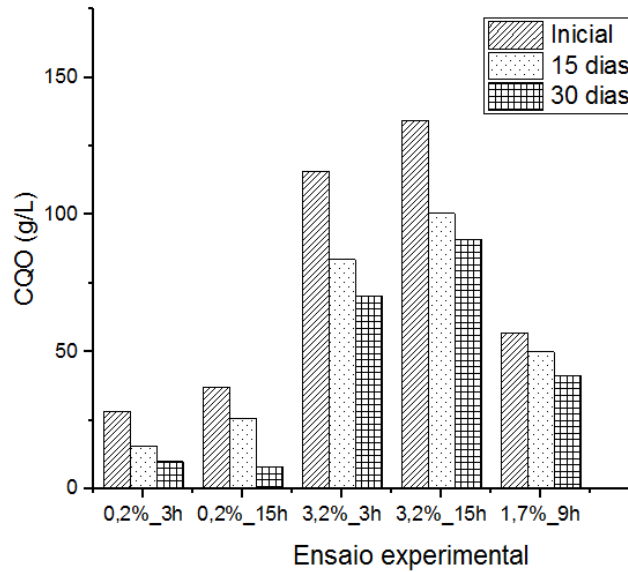


Figura 22: Remoção da CQO: pré-tratamento do glicerol, por ultrassons.

O pré-tratamento com ultrassons apresentou resultados positivos, tendo-se verificado um aumento da produção de metano: glicerol a 0,2% e 15 h de ultrassons, 1,7% de glicerol com 9 h de ultrassons e 3,2% de glicerol com 3 h de ultrassons.

No ensaio com glicerol a 0,2%, quando a exposição aos ultrassons passou de 3 para 15 h, a produção de metano registou um acréscimo de 70% quando referida à concentração de SV, de 60% por massa de CQO alimentada e de 60% por massa de glicerol. Para o presente estudo a produção de biogás sem e com 15 h de ultrassons na concentração de 0,2% de glicerol registou um aumento em 23% quando referida à concentração de SV, de 40% por massa de CQO alimentada e de 23% por massa de glicerol (Tabela 14).

Para alimentação com glicerol a 3,2% ($17,3 \text{ g CQO.L}^{-1}$) a produção de metano foi bastante baixa, pelo que o efeito do pré-tratamento por ultrassons não se sentiu. O fator principal terá sido a produção de ácidos gordos voláteis na etapa intermédia, face à elevada concentração de CQO da alimentação, e que vieram a condicionar o rendimento do processo de digestão (Tabela 14). Na literatura, Athanasoulia *et al.* (2014) apontam inibição do processo de digestão anaeróbia com a utilização de 4% de glicerol pelos mesmos motivos.

Segundo Wang *et al.* (1999), a digestão anaeróbia acoplada a um pré-tratamento por ultrassons, potência de 200 W e frequência de 9 kHz, por períodos de 10, 20, 30 e 40 minutos aumentou a produção de metano em 15%, 38%, 68% e 75%, respetivamente. A produção de metano num reator anaeróbio em batch, com lamas de

esgoto, utilizando ultrassons obtiveram um aumento de 14% na produção de metano, conforme Martínez *et al.* (2015). O aumento da produção de metano é devido ao facto dos ultrassons provocarem a desaglomeração de flocos e a quebra oxidativa dos compostos recalcitrantes (Adewuyi, 2001) (Tabela 14).

Tabela 14: Produção de biogás e metano nos ensaios experimentais com pré-tratamento do glicerol por ultrassons.

Tempo ultrassons (h)	Subs. (%)	E _{esp}	CH ₄ (%)	CQO (g.L ⁻¹)	L biogás s.kg ⁻¹ CQO	L CH ₄ . kg ⁻¹ CQO	SV (g.L ⁻¹)	L biogás s.kg ⁻¹ SV	L CH ₄ . kg ⁻¹ SV	L biogás. kg ⁻¹ glicerol	L CH ₄ .kg ⁻¹ glicerol
-	0,2	-	75,15	1,1	705	530	5,9	129	97	1248	938
3	0,2	586	70,33	1,1	581	409	5,4	116	82	1028	723
15	0,2	2846	76,80	1,1	848	652	5,1	181	139	1501	1153
-	3,2	-	3,60	17,4	35,4	1,3	13,5	45,7	1,7	62,7	2,3
3	3,2	215	2,18	17,4	62	1,4	12	89	1,9	110	2,4
15	3,2	1387	2,07	17,4	7,5	0,16	9,1	14	0,3	13	0,3
-	1,7	-	5,11	9,2	34,7	1,8	14,4	22,3	1,1	61,4	3,1
9	1,7	1029	8,12	9,2	73	5,9	6,4	105	8,5	129	11

A produção dos três ácidos encontrados foi maior para a concentração de glicerol de 1,7% com 9 h de ultrassons. Para a concentração de 0,2% de glicerol apenas foi detectado o ácido oxálico, sendo que para 3,2% de glicerol se produziram ácido oxálico e glutárico (Figura 23).

O glicerol é formado em ácido propiónico através da digestão anaeróbia, caso esse ácido não seja processado pelos microrganismos acetogénicos e metanogénicos, há um acúmulo desse material no produto final da digestão. Além disso, a concentração de ácido propiónico segue ao aumento da adição de glicerol, pois o aumento de sobrecarga orgânica compromete as etapas seguintes a acidogénese (Angelidaki *et al.*, 1999; Yazdani e Gonzalez, 2007; Athanasoulia e Aivasidis, 2014).

A formação de ácido glutárico está relacionada diretamente com a atividade da lipase liberada pelos microrganismos (Gilham e Lehner, 2005). Não ocorreu detecção deste ácido para concentração baixas de glicerol (0,2%), entretanto obtiveram-se produções para 1,7% e 3,2% de glicerol. A maior concentração foi em 1,7% de glicerol

em que as 9 h de ultrassons deixaram o substrato mais disponível aos microrganismos. Já para 3,2% de glicerol ocorreu um aumento de produção do ácido glutárico das 3 h para as 15 h de ultrassons, porém essas produções não significativas estão relacionadas a inibição dos microrganismos a essa concentração elevada de substrato e pela maior formação de ácido oxálico.

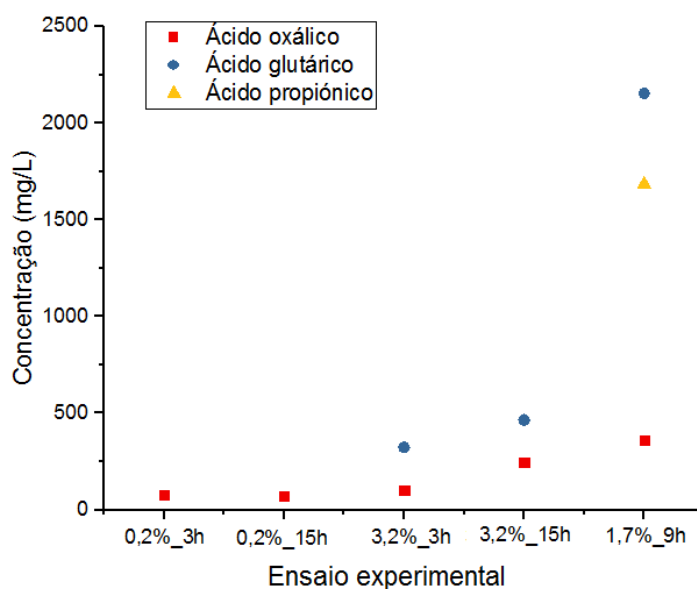


Figura 23: Concentração de ácidos carboxílicos no subproduto da digestão, com pré-tratamento por ultrassons.

7.3.3 Efeito do pré-tratamento do glicerol por microrganismos no desempenho do processo de digestão anaeróbia

Nesta seção é avaliado o efeito da concentração de glicerol pré-tratado com diferentes tipos de microrganismos, no desempenho global do processo de digestão anaeróbia. Os microrganismos usados com pré-tratamento foram *Aspergillus niger* e *Escherichia coli*.

A concentração de glicerol adicionada na alimentação teve influência na produção do metano (A e B) e na qualidade do gás (C), tal como era expectável face aos resultados de ensaios anteriores (Tabela 13). Relativamente ao tipo de microrganismo utilizado *A. niger* no pré-tratamento, este interferiu na produção de metano quando expressa em termos de SV (A), bem como na eficiência da remoção de CQO (D) (Figura 24).

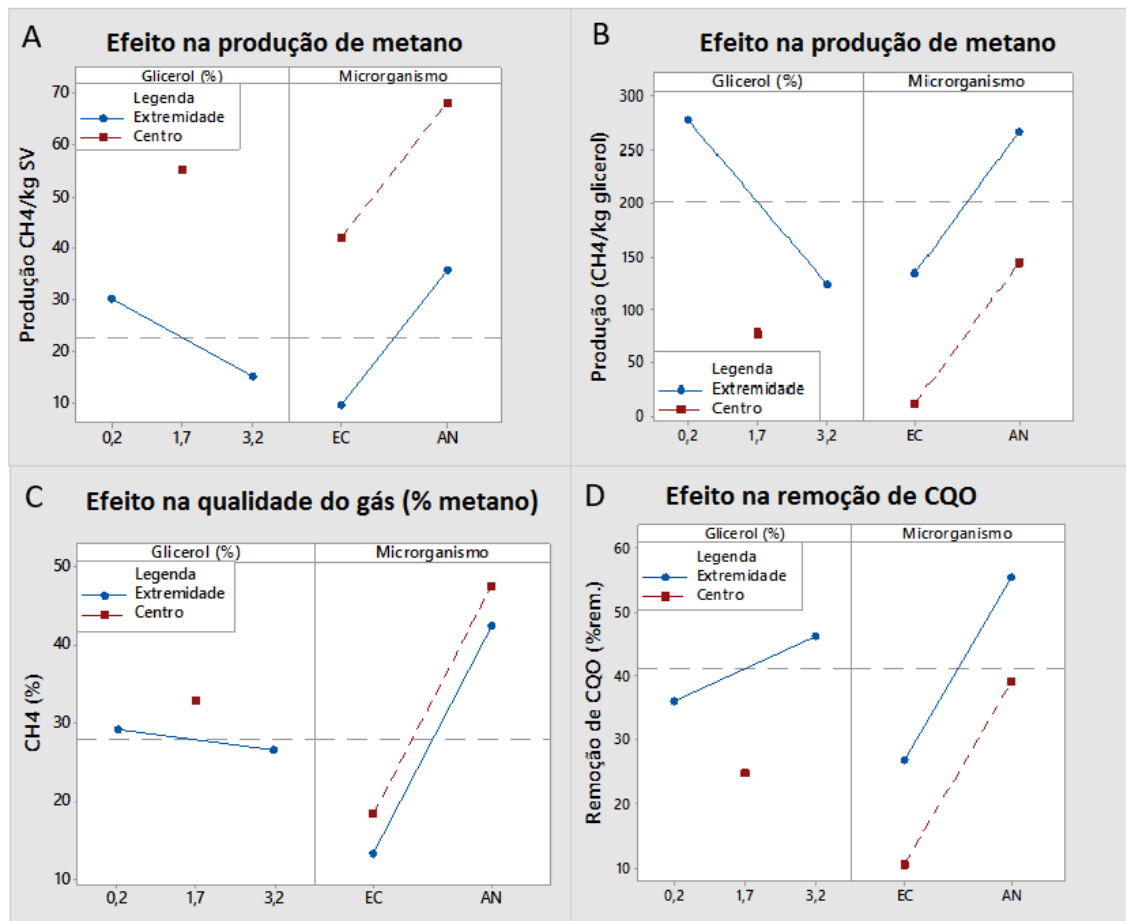


Figura 24: Interação dos parâmetros concentração de glicerol e pré-tratamento por microrganismos na produção de metano, na % CH₄ no biogás e na remoção da CQO para o reator batch.

A interação entre o tipo de microrganismo e a concentração de glicerol apresentam resultados estatisticamente significativos para a superfície de resposta da produção de metano (CH₄.kg⁻¹ CQO), como se pode observar na Figura 25. No entanto estes mesmos parâmetros isolados não apresentaram efeito significativo, sendo inferior a 95%.

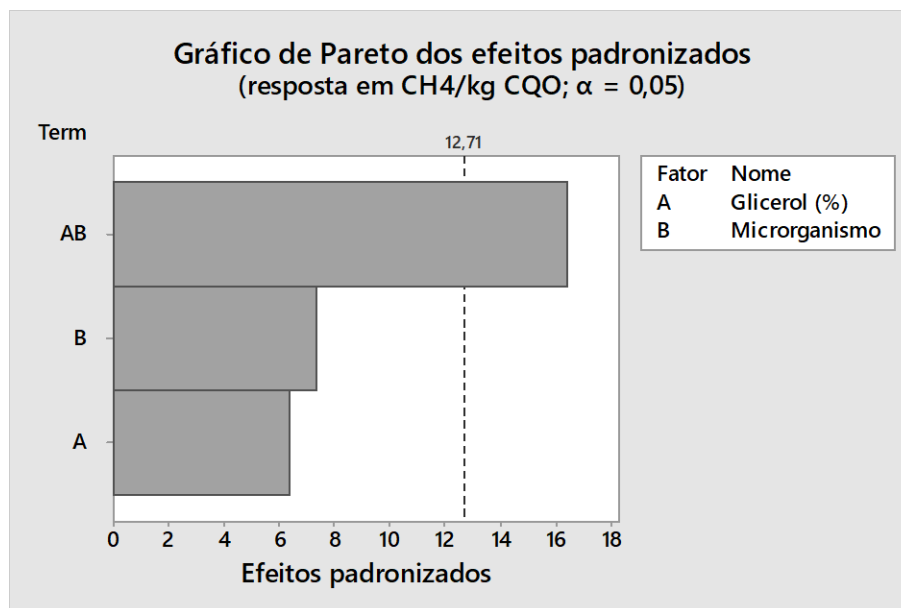


Figura 25: Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados (% glicerol e microrganismo) para a resposta à produção de metano por massa de CQO.

A partir da estatística efetuada, foi possível descrever essa superfície de resposta, por meio de uma regressão linear Equação 9, com R^2 de 99,76% e valor-P inferior a 0,05.

$$P_{CH_4} = 163,5 - 29,29.G + 168,66.M - 75,04.G.M \quad \text{Equação 9}$$

onde:

P_{CH_4} , Produção de metano (L CH₄.kg⁻¹ CQO);

G, Concentração de glicerol (%);

M, Microrganismo (sendo 0 para *E. coli* e 1 para *A. niger*).

Dos dois microrganismos testados, a bactéria *E. coli* apresentou uma redução da produção de metano em todos os ensaios experimentais realizados (três concentrações de glicerol), indicando total inibição dos microrganismos metanogênicos em 1,7% e 3,2% de glicerol onde as produções foram nulas (Yazdani e Gonzalez, 2007; Athanasoulia e Aivasidis, 2014).

No caso do fungo *A. niger*, ocorreu um aumento da produção de metano para as concentrações de glicerol de 1,7% e 3,2%. O aumento mais significativo foi com concentração de 1,7%, em que o tratamento sem microrganismo teve uma produção de 3,1 L CH₄.kg⁻¹ glicerol, o pré-tratamento com 9 h de ultrassons chegou a 11 L CH₄.kg⁻¹ glicerol e com o microrganismo *A. niger* esse valor chegou a 117,4 L CH₄.kg⁻¹ glicerol

(Tabela 15). Também nesta experiência foi atingido o maior volume de metano com o valor de 611,7 mL (Figura 26). Tendo em conta que o glicerol é um excedente industrial (He, *et al.*, 2017) é de suma importância os resultados obtidos, pois o *A. niger* permitiu trabalhar com uma maior concentração de glicerol e aumentar o volume de metano produzido.

A maior produção de biogás por SV foi obtida pelo ensaio experimental com 1,7% de glicerol com o pré-tratamento do *A. niger*, que aumentou a produção em 14% em relação ao ensaio com o mesmo microrganismo, mas com concentração de 0,2% de glicerol (Tabela 15).

O pré-tratamento com *A. niger* não resultou em valores superiores ao branco para a concentração de 0,2%, demonstrando que houve mineralização da matéria orgânica no pré-tratamento. Tal facto é comprovado pela diminuição da CQO inicial com a utilização do microrganismo. Entretanto, para 1,7% de glicerol, a metabolização do glicerol resultou no favorecimento dos microrganismos metanogénicos, isso pode ser observado na Tabela 15, em que a qualidade de gás atingiu os 65% de metano.

Tabela 15: Produção de biogás e metano utilizando uma etapa prévia de tratamento do glicerol por microrganismo.

Micro.	Subs. (%)	CH ₄ (%)	CQO (g.L ⁻¹)	L biogás. kg ⁻¹ CQO	L CH ₄ . kg ⁻¹ CQO	SV (g.L ⁻¹)	L biogás .kg ⁻¹ SV	L CH ₄ . kg ⁻¹ SV	L biogás. kg ⁻¹ glicerol	L CH ₄ . kg ⁻¹ glicerol
<i>A. niger</i>	0,2	58,4	1,1	539	315	5,7	103	60	954	558
<i>E. coli</i>	0,2	44,4	1,1	309	137	5,4	62	28	547	243
Sem	0,2	75,2	1,1	705	530	5,9	129	97	1248	938
<i>A. niger</i>	1,7	65,4	9,2	101	66	8,0	117	77	179	117
<i>E. coli</i>	1,7	0	9,2	48	0	7,8	57	0	0	0
Sem	1,7	5,1	9,2	34,7	1,8	14,4	22	1,1	61,4	3,1
<i>A. niger</i>	3,2	8,7	17,4	25	2	14,6	30	2,6	45	9,9
<i>E. coli</i>	3,2	1,1	17,4	0	0	9,5	0	0	0	0
Sem	3,2	3,6	17,3	35	1,3	13,5	45,7	1,7	62,7	2,3

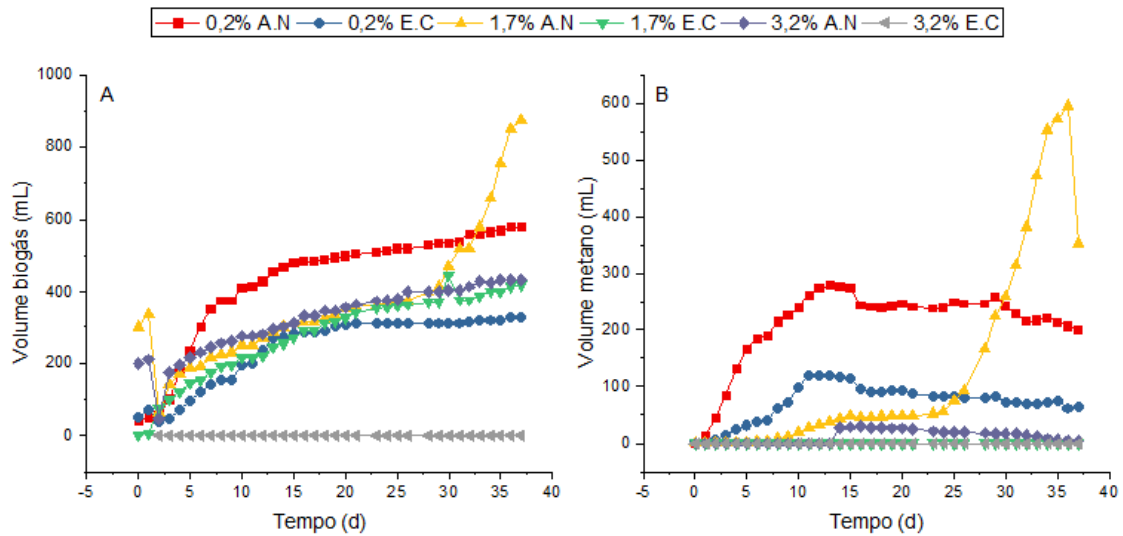


Figura 26: Volume acumulado de biogás e de metano: pré-tratamento do glicerol por *Aspergillus niger* e *Escherichia coli*.

O glicerol já digerido pelos microrganismos junto a lama foi utilizado para determinação da CQO inicial, dessa forma, essa eficiência de remoção refere-se somente ao processo de digestão anaeróbia. A eficiência de remoção da CQO, ao fim de 30 dias, conforme a Figura 27 variou na gama 26%-57%; o maior valor foi registado para o ensaio com glicerol 3,2% e pré-tratamento com *A. niger*.

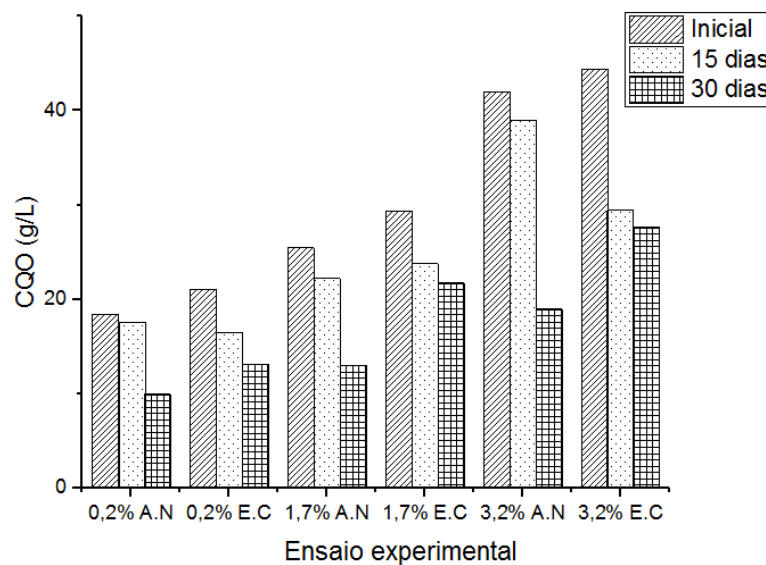


Figura 27: Remoção de CQO: pré-tratamento do glicerol por *Aspergillus niger* e *Escherichia coli*.

A *E coli* inibiu a produção de metano para as concentrações de glicerol de 1,7% e 3,2% (Tabela 15), sendo que, para a concentração de 3,2% ocorreu a produção de ácido propiónico com um máximo de 7368 mg.L⁻¹ (Figura 28). A elevada carga

orgânica implica em uma maior concentração de ácidos gordos voláteis, que está relacionada a inibição dos microrganismos anaeróbios (Angelidaki *et al.*, 1999; Yazdani e Gonzalez, 2007). O ácido propiônico foi formado na fase acidogénese e a inibição das etapas subsequentes da digestão anaeróbia resulta em seu acúmulo ao material já digerido (Yazdani e Gonzalez, 2007; Athanasoulia e Aivasidis, 2014), tal facto é confirmado para o teste com o *E. coli* com 3,2% de glicerol que teve alta concentração de ácido propiônico e produção nula de biogás. E para a mesma concentração utilizando o *A. niger* não houve a formação deste ácido e a produção de biogás foi de 9,9 L CH₄.kg⁻¹ glicerol (Tabela 15).

O ácido glutárico variou de 4,14 mg.L⁻¹ a 1082,9 mg.L⁻¹ (Figura 28) tendo-se formado nos ensaios 1,7% *E. coli* e 3,2% *A. niger e E. coli*. O ácido oxálico foi produzido em todos os ensaios experimentais variando entre 68,9 mg.L⁻¹ e 261,8 mg.L⁻¹. A maior concentração de ácido oxálico foi com 3,2% de glicerol e pré-tratamento com *E. coli*. Segundo André *et al.* (2010) a conversão biotecnológica do glicerol relevou que a limitação do azoto levou à secreção de ácido oxálico e à acumulação de lípidos intracelulares, em qualquer caso, observou-se a produção sequencial de lipídio e ácido oxálico.

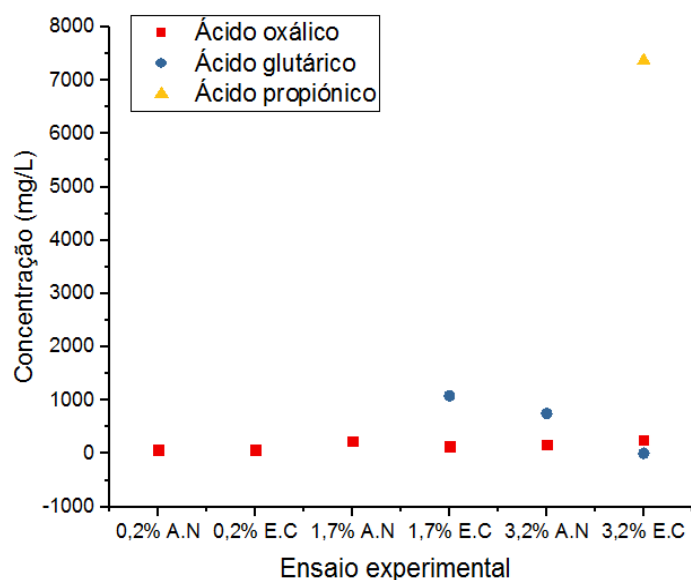


Figura 28: Produção de ácidos carboxílicos no material digerido da digestão anaeróbia do glicerol com pré-tratamento com microrganismos *A. niger* e *E. coli*.

7.3.4 *Comparação da eficiência do processo de digestão anaeróbia em função do pré-tratamento aplicado ao glicerol*

Verificou-se um aumento de 23% em relação ao branco (glicerol bruto e sem qualquer tratamento) e com uma qualidade do gás em metano próxima dos 77%. De acordo com a Figura 29 (A), a maior produção de 1153 L CH₄.kg⁻¹ glicerol, registou-se para uma alimentação com 0,2% de glicerol e pré-tratamento deste por ultrasons durante 15 h.

O *A. niger* produz lípase capaz de catalizar e sintetizar vários ácidos dicarboxílicos e dióis, além disso, há estudos que esse fungo pode otimizar reações de síntese biocatalítica de carbonato de glicerol em 12% (Okumura *et al.* 1984; Ilham e Saka, 2016).

Para a concentração de 1,7% de glicerol, o melhor resultado corresponde ao pré-tratamento do glicerol pelo fungo *A. niger*, com valores de metano gerado (117 L CH₄.kg⁻¹ glicerol, aumento de 76%) bem inferiores aos anteriormente citados para 0,2% (Figura 29 - B). Contudo é de salientar, que este valor representa um passo significativo face ao valor praticamente nulo obtido para o glicerol bruto.

Da Figura 29 - C conclui-se que uma alimentação com concentração de glicerol de 3,2% conduz a resultados bastantes desinteressantes no que respeita ao objetivo deste estudo, produzir o maior volume de biogás por massa de glicerol. O reduzido volume gerado, que não ultrapassou os 4 L CH₄.kg⁻¹ glicerol, quer a baixa percentagem de metano no biogás (8,7%), afastam liminarmente a utilização destas condições operacionais. O valor de 3,2% de glicerol na alimentação inibiu os microrganismos metanogénicos em todos os ensaios experimentais, desta forma, não foi realizado qualquer ensaio no reator UASB com essa concentração. Na literatura, Athanasoulia *et al.* (2014), referem igualmente resultados desoladores, apontando inibição do processo de digestão anaeróbia com a utilização de 4% de glicerol.

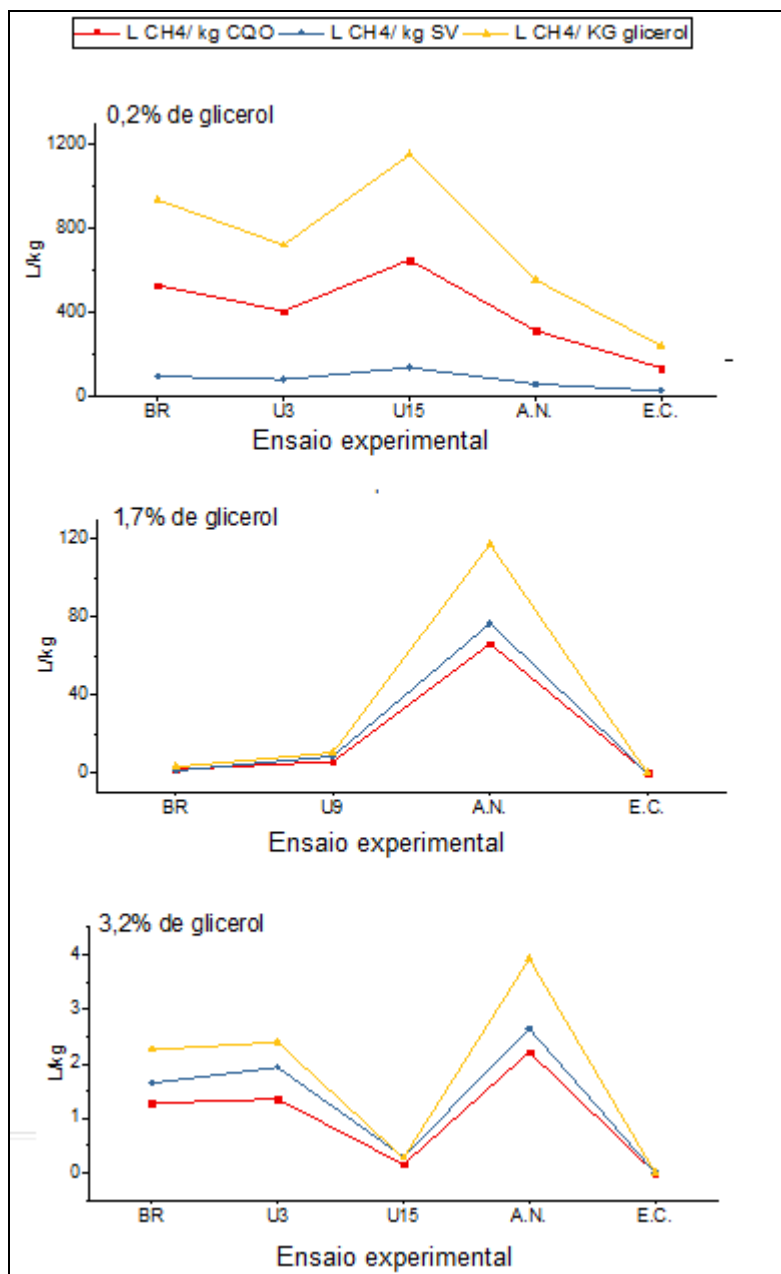


Figura 29: Produção de metano para três concentrações de glicerol utilizadas no reator em batch sem e com pré-tratamento (físico e biológico).

O volume de metano ao longo do tempo para as duas experiências com maiores produções de metano nas diferentes concentrações de glicerol está representado na Figura 30. O teste de 0,2% de glicerol e 15 h de ultrassons teve o pico máximo (733 mL) com 31 dias de ensaio e o teste de 1,7% de glicerol com pré-tratamento com o *A. niger* apresentou maior produção (595 mL) com 35 dias de ensaio. Tempo superior da digestão anaeróbia, implica um maior volume de reator (neste caso um aumento em 13%), logo maiores custos e menor produção quando indexada em termos de tempo necessário (Braun, 1982 citado por Probiogás, 2010). Entretanto, em termos de uso do

glicerol excedente (He *et al.*, 2017) o teste com 1,7% de glicerol com o *A. niger* utilizaria 88% de substrato em um mesmo volume de reator, com redução de 49% de biogás.

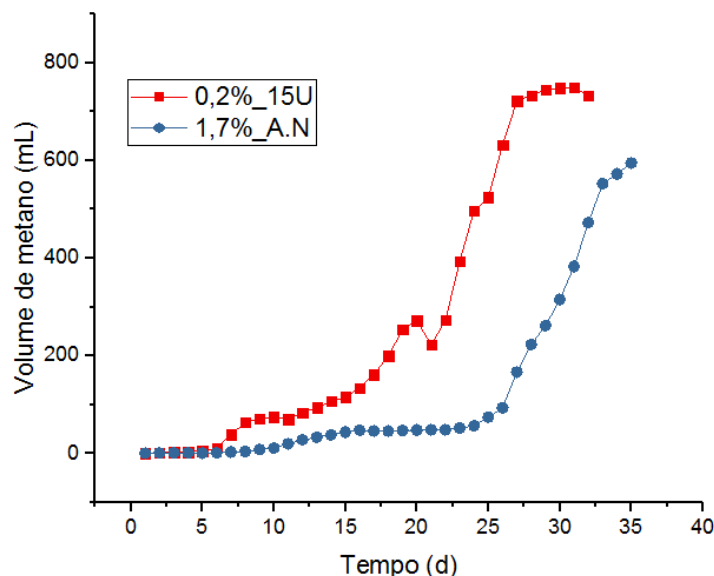


Figura 30: Volume de metano produzido nos ensaios: 0,2% de glicerol e 15 h de ultrassons e 1,7% de glicerol com pré-tratamento por *A. niger*.

Os melhores resultados obtidos no presente estudo foram comparados com trabalhos de diversos autores, utilizando contudo, outros tipos de lama para a co-digestão anaeróbia do glicerol (Tabela 16).

Tabela 16: Produção de metano a partir da digestão anaeróbia do glicerol.

Inóculo	Glicerol	Reator	Tem p (°C)	Geração	Referência
Lama de esgoto	0,63% (v/v)	reator de mistura completa contínuo (50 L)	35	1,3 m ³ CH ₄ .L ⁻¹ glicerol	Nghiem <i>et al.</i> , 2014
Lama de esgoto	1%	reator de mistura completa contínuo (4 L)	35	1400 a 2094 mL CH ₄ .d ⁻¹	Fountoulakis <i>et al.</i> , 2009
Moinho de oliva e matadouro	1%	reator de mistura completa contínuo (4 L)	35	479-1210 mL CH ₄ .d ⁻¹	Fountoulakis <i>et al.</i> , 2009
Lama de esgoto	25-60%	reator de mistura completa contínuo (4 L)	37	Aumento de 82-280% na produção de metano	Nartker <i>et al.</i> , 2014

Tabela 16: Produção de metano a partir da digestão anaeróbia do glicerol (continuação).

Inóculo	Glicerol	Reator	Tem p (°C)	Geração	Referência
Lama de esgoto	-	reator de mistura completa contínuo (5,5 L)	35-55	Aumento 66% produção de metano	Silvestre <i>et al.</i> , 2015
dejeto de suíno	3% (v/v)	reator de mistura completa contínuo (5,5 L)	55	De 0,17 a 0,47 L biogás.g ⁻¹ SV	Astals, <i>et al.</i> ,2013
dejeto de vaca leiteira	-	reator (4,5 L)	37	1,4 L ⁻¹ CH ₄ .d ⁻¹ e 549 L ⁻¹ CH ₄ .kg ⁻¹ SV	Usack e Angenent,2015
lama da ETAR do DA-VR	0,2% + ultrassons	reator em batch de 300 mL	40-45	1153 L ⁻¹ CH ₄ .kg ⁻¹ glicerol	Este estudo
lama da ETAR do DA-VR	1,70% + microorganismo (<i>A. niger</i>)	reator em batch de 300 mL	40-45	117 L ⁻¹ CH ₄ .kg ⁻¹ glicerol	Este estudo

A comparação entre os três ensaios experimentais, realizados com a lama do DA-VR, foram denominados conforme a Tabela 17, para maior facilidade de análise dos resultados.

Tabela 17: Resumo dos ensaios experimentais realizados para digestão anaeróbia do glicerol.

Ensaio experimental	Concentração de glicerol	Tratamento	Denominação
Branco	0,2%	-	1
	1,7%	-	2
	3,2%	-	3
Ultrassons	0,2	3 h	1A
	0,2	15 h	1B
	3,2	3 h	3A
	3,2	15 h	3B
	1,7	9 h	2C

Tabela 17: Resumo dos ensaios experimentais realizados para digestão anaeróbia do glicerol (continuação).

Ensaio experimental	Concentração de glicerol	Tratamento	Denominação
Microorganismo	0,2	<i>A. niger</i>	1-1
	0,2	<i>E. coli</i>	1-2
	1,7	<i>A. niger</i>	2-1
	1,7	<i>E. coli</i>	2-2
	3,2	<i>A. niger</i>	3-1
	3,2	<i>E. coli</i>	3-2

A CQO inicial são menores nos testes que envolvem os microrganismos e ultrassons em relação ao ensaio em branco (Figura 31), evidenciando que os microrganismos utilizaram o glicerol como substrato para realizar as suas vias metabólicas (Legisa e Mettey, 1986; Tudorache *et al.*, 2012; Abdella *et al.*, 2016; Ilham e Saka, 2016). Também, a exposição de células microbianas a energia ultrassônica pode ter favorecido a digestão através do rompimento da parede celular e a libertação do material intracelular (Pavlostathis e Gossett, 1986; Weemaes e Verstraete, 1998).

Nos ensaios em branco registaram-se as maiores reduções da CQO; ao fim de 30 dias de digestão anaeróbia para as experiências 1, 2 e 3, foram registradas eficiência de remoção de CQO de 69%, 58% e 64%, repetivamente. Este fato decorre nos ensaios em que o glicerol foi tratado previamente por ultrassons ou por microrganismos, a redução significativa da CQO ocorre nesse estágio inicial.

A observação da Figura 32, permite concluir que a concentração de sólidos é maior quando se utiliza pré-tratamento por ultrassons. Este auxilia a desaglomeração dos flocos biológicos e transforma as partículas orgânicas de grandes dimensões em partículas de menor tamanho (Pavlostathis e Gossett, 1986; Weemaes e Verstraete, 1998). Por exemplo, para os ensaios 3 e 3A (glicerol a 3,2%), a concentração de ST ao fim de 15 dias, registrava aproximadamente 20 g.L⁻¹ para o ensaio branco, sendo que para pré-tratamento por ultrassons o valor duplicou, acima de 40 g.L⁻¹.

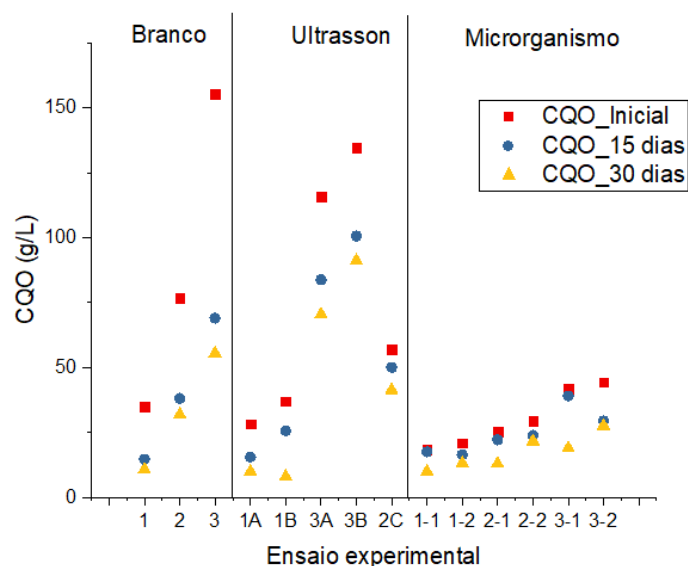


Figura 31: Carência Química de Oxigênio nos instantes inicial, 15 e 30 dias, para os ensaios experimentais realizados.

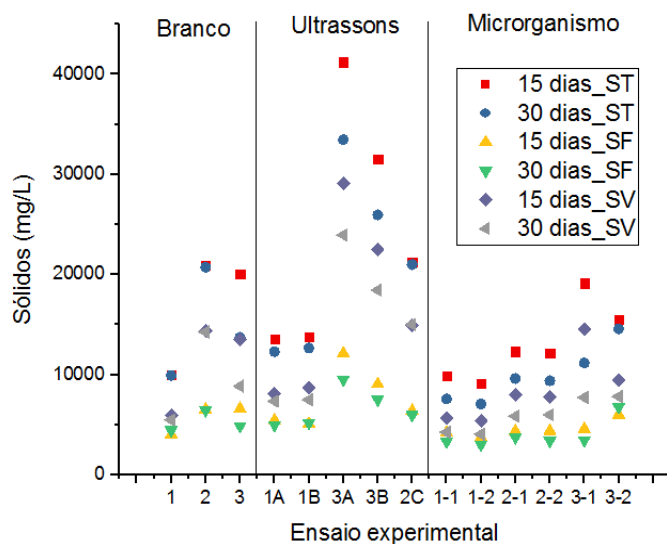


Figura 32: Concentração de sólidos nos instantes inicial, 15 e 30 dias para os ensaios experimentais realizados.

A produção de ácido propiônico e ácido glutárico não ocorreu em nenhum teste com concentração de 0,2% de glicerol. Verificou-se ainda, a formação de ácido oxálico em todos os testes com concentrações variando entre 0,07 g.L⁻¹ a 0,36 g.L⁻¹.

As maiores concentrações de ácido glutárico (2,15 g.L⁻¹) e oxálico (0,36 g.L⁻¹) foram no teste com 1,7% de glicerol com 9 h de ultrassons. Os ultrassons proporcionaram maior exposição do substrato ao microrganismo (Pavlostathis e Gossett 1986, Weemaes e Verstraete, 1998), que ocasionou maior atividade lipásica (Gilham e

Lehner, 2005) e a preferência pela rota metabólica de formação do ácido oxálico (Kwon e Koper, 2010).

A formação de ácido propiónico no material já digerido foi maior no teste com 3,2% de glicerol com o microrganismo *E. coli*, chegando a concentração de 7,37 g.L⁻¹. A inibição das fases acetogénese e metanogénese provocou um acúmulo do ácido propiónico ao final da digestão anaeróbia (Yazdani e Gonzalez, 2007; Athanasoulia e Aivasidis, 2014), tal facto é confirmado pela produção nula de biogás neste teste.

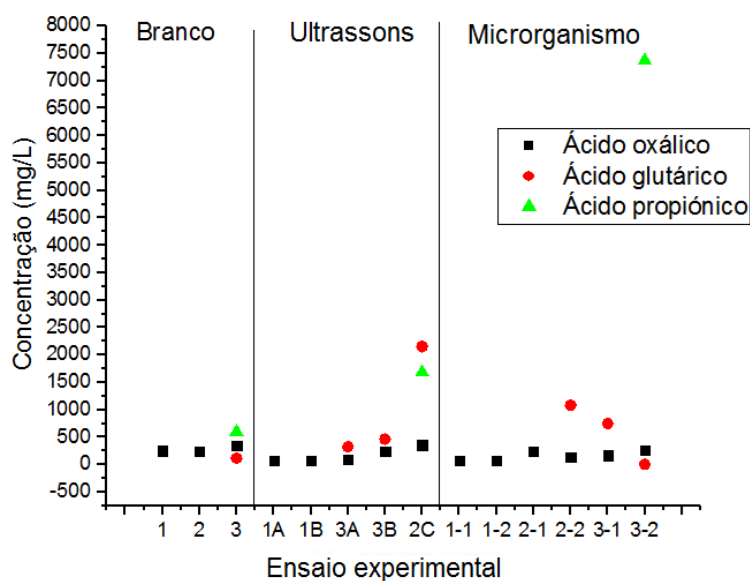


Figura 33: Concentração de ácidos carboxílicos ao fim de 30 dias para os ensaios experimentais realizados.

Os melhores resultados da produção de ácidos carboxílicos obtidos durante este estudo foram comparados com referências bibliográficas que utilizaram outras fontes de carbono (Tabela 18), onde se pode observar uma produção considerável de ácido propiónico e glutárico.

Tabela 18: Produção de ácidos carboxílicos no presente estudo e na literatura.

Tipo de ácido	Fonte de carbono	Sistema de cultura	Microrganismo	Concentração	Referência
Ácido propiônico	Glicerol (0,01 L.h ⁻¹)	Semi-contínuo		47,28 g.L ⁻¹	Zhu <i>et al.</i> , 2010
	Glicerol	Semi-contínuo	<i>Propionibacterium acidipropionici</i>	106 g.L ⁻¹	Zhang e Yang, 2009
	Glicerol	Batch		6,77 g.L ⁻¹	Coral <i>et al.</i> , 2008
	Glicerol (3,2%)	Batch	<i>E. coli</i> + digestão anaeróbia	7,37 g.L ⁻¹	Presente estudo
Ácido Oxálico	Sacarose	Semi-contínuo	<i>A. niger</i>	38 g.L ⁻¹	Strasser <i>et al.</i> , 1994;
	Glicerol	Eletro-oxidação	-	1 mM	Kwon e Koper, 2010
	Glicerol (1,7%)	Batch	Ultrassons 9h + digestão anaeróbia	0,36 g.L ⁻¹ ou 4 mM	Este estudo
Ácido glutárico	Glicerol (1,7%)	Batch	Ultrassons 9h + digestão anaeróbia	2,15 g.L ⁻¹	Este estudo

Foram estimados para cada experiência, em função da produção de metano, os potenciais ganhos económicos, de acordo com o proposto por Eriksson (2010). Os cálculos tiveram em consideração o preço atual da energia elétrica, 0,1652 €. kWh⁻¹ e partindo do pressuposto que no *scale-up* do reator o processo comportaria de forma linear. O cálculo foi realizado relacionando a produção de biogás e seu valor energético com a quantidade do glicerol de cada experiência e também a produção em relação a concentração de SV no reator (Figura 34).

Para alimentação sem qualquer pré-tratamento do glicerol, a maior valorização económica do processo foi registada para a menor concentração de glicerol (0,2%), 1550 €.t⁻¹ glicerol e 160 €.m⁻³ SV. (Figura 34). Quando o glicerol (0,2%) foi previamente exposto a ultrassons durante 15 h (ensaio 1B), o valor económico agregado alcançou os 1904,3 €.t⁻¹ glicerol e 229 €.m⁻³ SV. Atendendo aos ensaios em que o glicerol foi submetido a pré-tratamento por microrganismos, a maior valorização económica do processo corresponde à utilização de *A. niger*, glicerol a 0,2% com um valor de 921 €.t⁻¹ glicerol e para 1,7% com um valor de 127 €.m⁻³ reator (Figura 34).

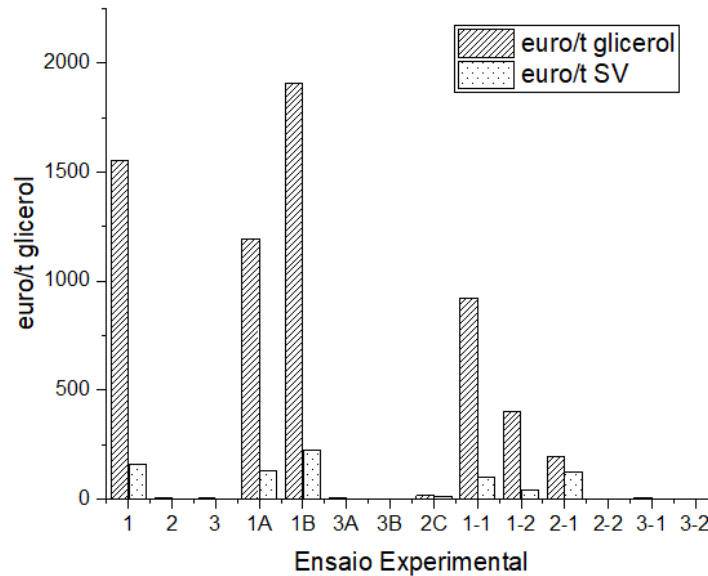


Figura 34: Valor económico do metano produzido por digestão anaeróbia do glicerol.

7.4 Reator UASB

Após os ensaios no reator batch de mistura completa, foi investigado durante 10 semanas em um reator UASB as seguintes situações: (A) alimentação de 0,34 kg CQO.m⁻³.d⁻¹ (semana 1-3); (B) alimentação de 0,34 kg CQO.m⁻³.d⁻¹ com 15 h de ultrassons (semana 4-5); (C) alimentação de 1,56 kg CQO.m⁻³.d⁻¹ (semana 6-8) (D) alimentação de 1,56 kg CQO.m⁻³.d⁻¹ e pré-tratamento por microrganismos (semana 9-10).

7.4.1 Temperatura interna no reator UASB

O controlo da temperatura interna é importante para a estabilidade do processo de digestão anaeróbia, porque os microrganismos metanogénicos não resistem a mudanças drásticas de temperatura (Probiogás, 2010; Kumaran *et al.*, 2016). Estes microrganismos são, na sua maioria, mesófilos com um maior rendimento para temperaturas entre 20 e 40°C (Chernicharo, 2007).

O sistema de aquecimento foi suficiente para manter a temperatura do reator anaeróbio, mesmo no inverno. A Figura 35, mostra a evolução da temperatura interna do reator, sendo que está se manteve durante os 75 dias de operação do reator num intervalo restrito, 40 a 43,8°C, gama mesófila. Esta estabilidade da temperatura interna

do reator permite afirmar que este parâmetro não foi quem condicionou de forma menos favorável em determinadas fases do estudo, o desempenho do processo anaeróbio relativamente à produção de biogás e sua qualidade (item 7.4.7).

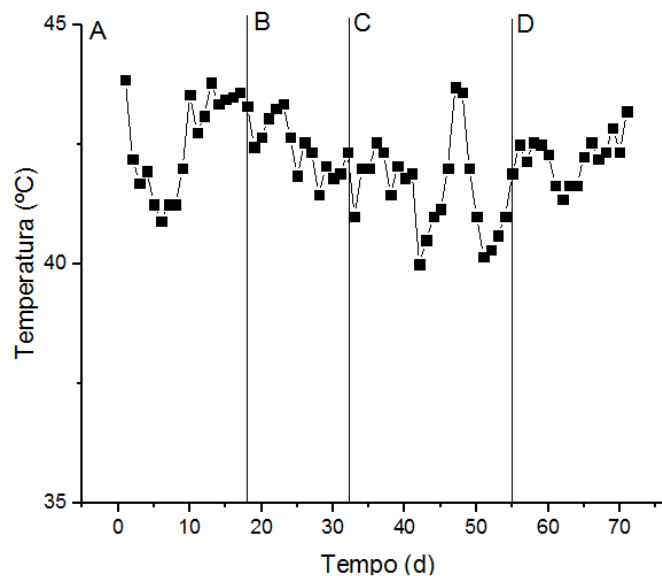


Figura 35: Evolução da temperatura interna do reator UASB durante os 75 dias do estudo.

7.4.2 Variação do pH ao longo do tempo no reator UASB

Em qualquer tratamento biológico é necessário acompanhar a variação do pH para manter o crescimento biológico. O valor ideal do pH na digestão anaeróbia é entre 6 e 8. Este parâmetro está diretamente relacionado com a alcalinidade, que confere um efeito tampão ao sistema (Ma *et al.*, 2008; Hutnan *et al.*, 2009; Razaviarani e Buchanan, 2015).

O pH interno do reator UASB variou no intervalo de 6 a 7,4, como mostrado na Figura 36. Os valores encontram-se dentro da gama ideal referida na literatura. As variações de pH foram mais significativas quando ocorreu mudança da alimentação (entre B e C).

Todos os valores de pH registados nos pontos de amostragem intermédios do reator, bem como à saída, encontram-se entre 6 e 8, demonstrando que a quantidade de bicarbonato de sódio adicionado na alimentação foi suficiente para se obter a alcalinidade pretendida, tendo como finalidade um efeito tampão adequado (Hutan *et al.*, 2013b; Razaviarani e Buchanan, 2015).

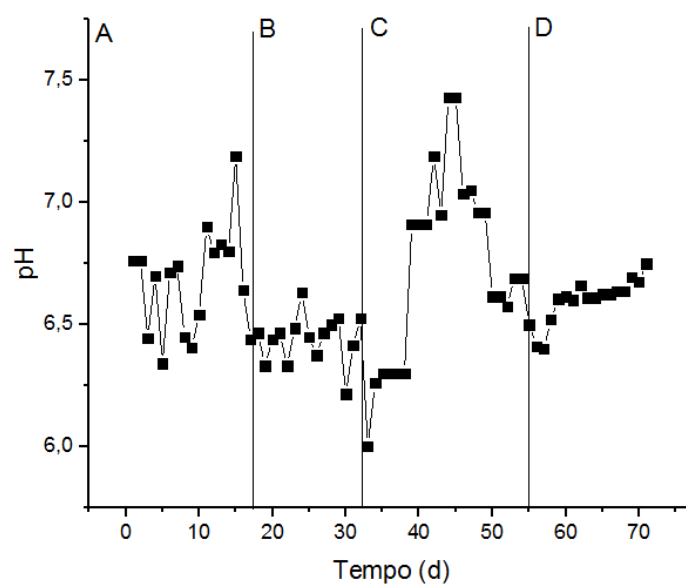


Figura 36: Variação do pH no interior do reator UASB durante o estudo experimental.

Os valores de pH na alimentação e na saída do reator podem ser visualizados na (Figura 37). Ao se aplicar uma carga de $0,34 \text{ kg CQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ o pH da entrada variou entre 6,1 e 7,4 (A e B) e com $1,56 \text{ kg CQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ foi de 7,1 a 8,1 (C e D). A alcalinidade adicionada no reator foi proporcional a concentração de glicerol, entretanto ao comparar os valores de saída o pH teve pouca variação entre uma carga orgânica volumétrica e outra, de 6,9 a 7,9 (A e B) e de 6,3 a 7,9 (C e D).

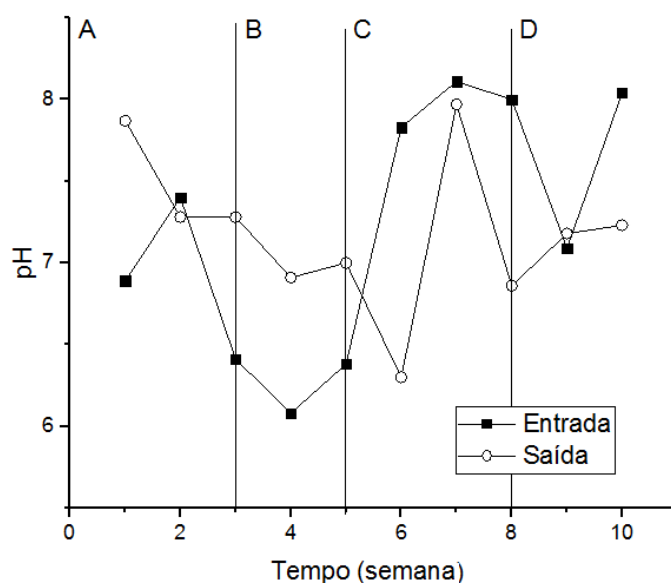


Figura 37: Valores do pH na entrada e na saída do reator durante as semanas do estudo.

7.4.3 Carência Química de Oxigênio (CQO) no reator UASB

Os valores de CQO, para os ensaios realizados nas 10 semanas do estudo, estão representados na Figura 38. Para o ensaio experimental com alimentação de 0,34 kg CQO.m⁻³.d⁻¹, a remoção da CQO alcançou um valor máximo de 20% (A). Foi significativo o aumento registado na remoção de CQO, quando o glicerol foi submetido a pré-tratamento com ultrassons, tendo a eficiência de remoção variado no intervalo 60 a 69% (B).

Os dados da Figura 38-B evidenciam que os ultrassons são responsáveis logo à partida por um abaixamento significativo da CQO da alimentação; por exemplo, comparando os dados das semanas 3 e 4, com o pré-tratamento conseguiu-se reduzir a CQO da alimentação em cerca de 70% (11,7 g.L⁻¹ para 3,6 g.L⁻¹). Isso pode ser explicado, pelo facto dos ultrassons aumentarem a solubilidade do glicerol na solução de alimentação, o que se traduziu em valores inferiores para a CQO.

Para o pré-tratamento por *A. niger*, embora dado o valor da carga alimentada, 1,56 kg CQO.m⁻³.d⁻¹, seria espectável obter remoções menores. Os valores de remoção entre 12 e 19% (C), com o auxílio do microrganismo, passaram para o intervalo de 26 a 36% (D).

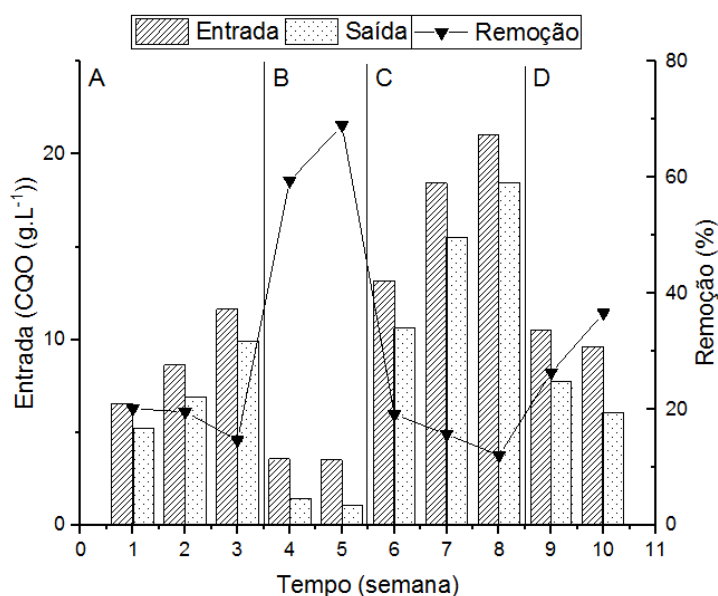


Figura 38: Valores de CQO na entrada e na saída do reator durante as semanas do estudo.

Os pré-tratamentos usados aumentaram a percentagem de remoção da CQO, no entanto, os valores são baixos quando comparados com a literatura. Ma *et al.* (2008)

relatam valores de remoção de 85%, utilizando um reator UASB na co-digestão do glicerol e água residual do processamento de batata. Hutan *et al.* (2013a) usaram um reator UASB na monodigestão de glicerol, tendo obtido remoções de 80% para a CQO.

7.4.4 Concentração de fósforo total no reator UASB

O fósforo (P) proporciona energia na forma de ATP e ADP, que é utilizada pelos microrganismos para quebrar as moléculas do glicerol (Biebl *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2009).

Ao analisar a variação da concentração de fósforo entre os pontos de entrada e saída do reator UASB (Figura 39), observa-se que ocorreu um consumo médio de 2, 0,8, 15 e 6 mg.L⁻¹ nas fases A, B, C e D, respectivamente.

Os pré-tratamentos (B e D) apresentaram maiores remoções de CQO (Figura 38) e menores remoções de P (Figura 39), isto ocorre, pois, a quebra inicial das moléculas (hidrólise e acidogénese) inicia nos pré-tratamentos. Dessa forma, a quantidade de fósforo requerido para a digestão anaeróbia é menor.

No tratamento de águas residuais domésticas utilizando reator UASB foi obtida uma remoção de P de 48,4% (Moawad *et al.*, 2009). No presente estudo a remoção de P foi de 45,1 e 47,5% na semana 7 e 8 em C, respectivamente.

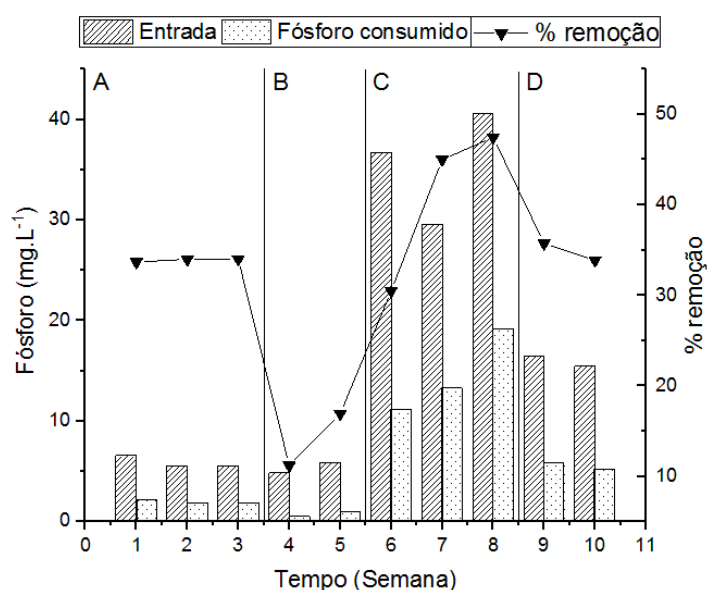


Figura 39: Evolução da concentração de fósforo total na entrada e na saída do reator durante as semanas do estudo.

7.4.5 Avaliação da concentração de sólidos no reator UASB

A razão SV/ST exprime o valor da concentração da biomassa no reator, sendo que, e para um bom funcionamento do reator UASB, o valor ideal segundo Tawfik *et al.*, (2008) e Al-Jamal e Mahmoud, (2009), deve situar-se em torno de 0,67. No presente estudo, de acordo com a Figura 40, o valor obtido foi inferior ao referido na literatura (0,44 a 0,61), contudo, não foi possível encontrar um efeito direto entre este valor e a produção de metano.

Como pode ser observado na Figura 41, a remoção média de ST foi de 30%, 45%, 33% e 48% para A, B, C e D, respectivamente. Os dados em B e D estão de acordo com o seguinte referencial bibliográfico, Lin *et al.* (2000) utilizaram a co-digestão de lixiviado de aterro e esgoto com uma redução de 45% de ST. Os pré-tratamentos (B e D) auxiliaram na remoção de sólidos, assim como na remoção de CQO (Figura 38).

Os ST da alimentação são constituídos principalmente por STD representando uma parcela de 64%, 74%, 64% e 60% para os tratamentos A, B, C e D. Conforme anteriormente discutido, os ultrassons provocaram a diminuição do tamanho das partículas.

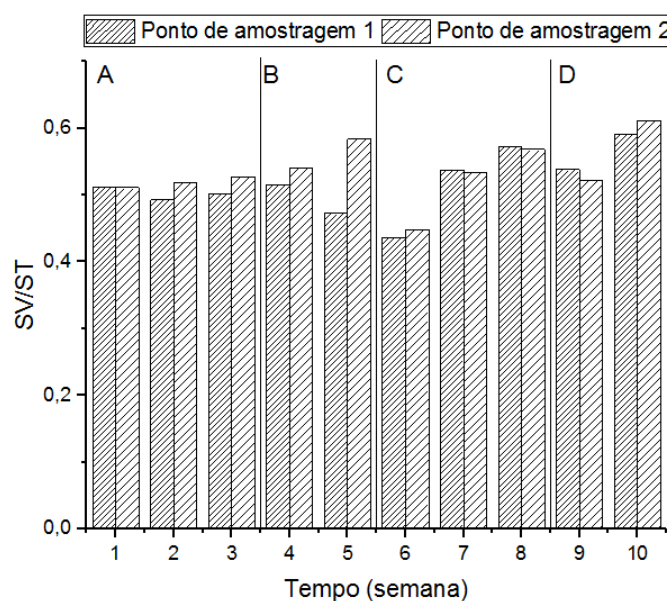


Figura 40: Razão SV/ST nos pontos de amostragem 1 e 2 no reator UASB.

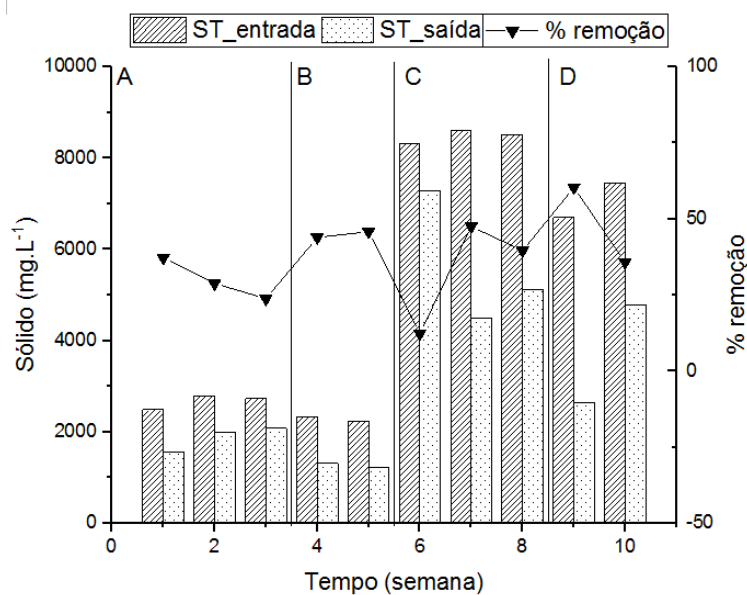


Figura 41: Concentração de sólidos totais na entrada e saída no reator UASB.

7.4.6 Ácidos carboxílicos formados no processo de digestão anaeróbia no UASB

Verificou-se a formação dos mesmos três ácidos carboxílicos, tanto no reator UASB em contínuo, como havia sido observado para os ensaios de digestão em batch (Figura 42). No reator UASB, a formação de ácido oxálico ocorreu durante todo o período experimental, obtendo-se maiores valores com maior carga aplicada; 9 a 18 mg.L⁻¹ (0,34 kg CQO.m⁻³.d⁻¹ em A), 11 a 13 mg.L⁻¹ (0,34 kg CQO.m⁻³.d⁻¹ + 15 h ultrassons em B), 74 a 100 mg.L⁻¹ (1,56 kg CQO.m⁻³.d⁻¹ em C) e 80 a 88 mg.L⁻¹ (1,56 kg CQO.m⁻³.d⁻¹ + *A. niger* em D). Entre A e C houve um aumento de 10% na concentração de ácido oxálico no material biodigerido, que pode estar relacionada com o aumento da carga orgânica aplicada.

O ácido glutárico está relacionado com a atividade lipásica dos microrganismos (Gilham e Lehner, 2005), foi observado sua formação com a carga de 0,34 kg CQO.m⁻³.d⁻¹. O aumento da carga em C (Figura 42) levou a não formação deste ácido. Entretanto a utilização do *A. niger* no pré-tratamento favoreceu a formação de lipase (Okumura *et al.* 1984), o que resultou em produções máximas de 325 mg.L⁻¹ em D (semana 10).

A formação de ácido propiónico em A e B conduziu-se pela via metabólica descrita por Biebl *et al.* (1999) e Silva *et al.* (2009). A formação de ácido em A é maior

do que em B, assim como, seu consumo de P (Figura 39). Nos ensaios experimentais C e D o consumo de P também foi observado, mas não ocorreu a formação de ácido propiónico, o que pode ser explicado pela preferência dos microrganismos por vias metabólicas alternativas.

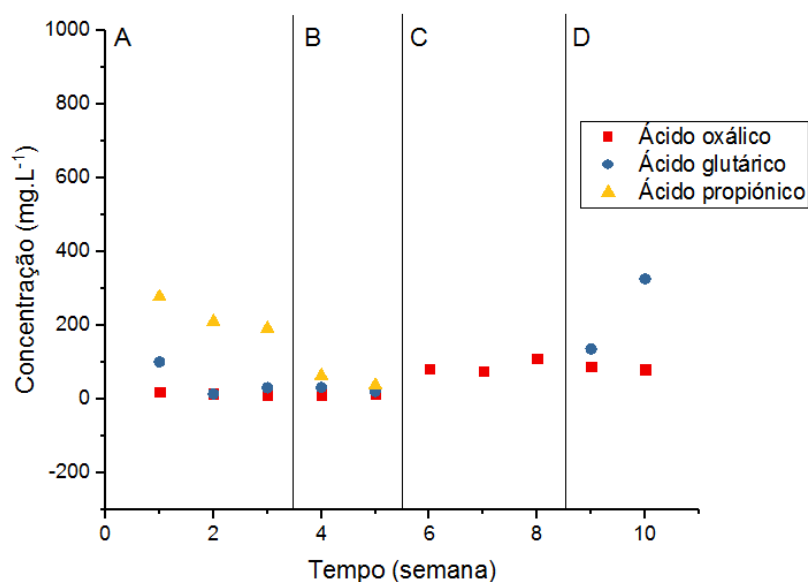


Figura 42: Concentração de ácidos carboxílicos na corrente de saída do reator UASB para o período de estudo.

7.4.7 Produção de biogás e metano em reator UASB

O reator UASB alimentado em contínuo com $0,34 \text{ kg CQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$, apresentou uma variação no volume de metano gerado por digestão anaeróbia, entre $1,3$ e $3,6 \text{ m}^3 \text{ CH}_4 \cdot \text{kg}^{-1} \text{ glicerol} \cdot \text{d}^{-1}$ (A). Quando alimentação idêntica foi submetida a um pré-tratamento com ultrassons durante 15 h, a produção diária para um período de 15 dias, variou de $3,2$ a $4,0 \text{ m}^3 \text{ CH}_4 \cdot \text{kg}^{-1} \text{ glicerol}$ (B) (produção média diária de $3,6 \text{ m}^3 \text{ CH}_4 \cdot \text{kg}^{-1} \text{ glicerol}$) (Figura 43). O pré-tratamento com ultrassons aumentou em cerca de 43% a produção de metano relativamente ao ensaio branco, resultado superior ao encontrado no sistema em batch que proporcionou um aumento de 23%. As maiores produções de metano ocorreram no ensaio experimental com 0,2% de glicerol e 15 h de ultrassons (B), que foi confirmado pelas maiores remoções de CQO (60 a 69%) e ST (74%), também pela menor concentração de ácidos carboxílicos no material digerido, totalizando $88 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

Para uma carga orgânica de $1,56 \text{ kg CQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ e um período de 23 dias, a produção de metano apresentou valores entre 0,01 e $0,86 \text{ m}^3 \text{ CH}_4 \cdot \text{kg}^{-1} \text{ glicerol} \cdot \text{d}^{-1}$ (C). Nestas condições e adicionando um pré-tratamento do glicerol pelo fungo *A. niger*, o volume de metano produzido variou no intervalo de 0,8 a $1,0 \text{ m}^3 \text{ CH}_4 \cdot \text{kg}^{-1} \text{ glicerol} \cdot \text{d}^{-1}$ (D), a que corresponde uma produção média diária de $0,95 \text{ m}^3 \text{ CH}_4 \cdot \text{kg}^{-1} \text{ glicerol}$. O pré-tratamento com *A. niger* proporcionou um aumento médio de 4 vezes na produção de metano, embora em termos absolutos o volume gerado seja pouco significativo.

Entre as cargas orgânicas aplicadas em A e C a formação de ácido oxálico foi 10% superior em C, sendo inversamente proporcional a produção de metano. Isso é confirmado pelo maior consumo de fósforo de $15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ em C comparado com A ($2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$).

Os dados de produção de metano, tendo como substrato 0,2% de glicerol com pré-tratamento de 15 h com ultrassons (produção média de $3,7 \text{ m}^3 \text{ CH}_4 \cdot \text{L}^{-1} \text{ glicerol}$ e $560 \text{ L CH}_4 \cdot \text{kg CQO}_{\text{remov.}} \cdot \text{m}^3$), são superiores aos encontrados na literatura. Nghiem *et al.* (2014) obtiveram uma produção de $1,3 \text{ m}^3 \text{ CH}_4 \cdot \text{L}^{-1} \text{ glicerol}$ com digestor de mistura completa (50 L) com a co-digestão de 0,63% (v/v) de glicerol com lama de esgoto. Siles *et al.* (2010) variaram a carga orgânica de $0,27\text{-}0,36 \text{ g COD} \cdot \text{g}^{-1} \text{ VSS d}^{-1}$ com a co-digestão de glicerol e água residual da fabricação de biodiesel e registraram $310 \text{ L CH}_4 \cdot \text{kg}^{-1} \text{ CQO}_{\text{remov.}}$ que permaneceu constante em $630 \text{ L CH}_4 \cdot \text{kg}^{-1} \text{ VSS} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ CQO}_{\text{remov.}} \cdot \text{h}^{-1}$. Panponga *et al.* (2015) utilizaram alga azul para melhorar o tratamento da co-digestão anaeróbia de águas residuais de frutos do mar e glicerol (1% v/v) e obtiveram $4,4 \text{ m}^3 \text{ CH}_4 \cdot \text{m}^3 \text{ água residual}$.

Para a produção de biogás (L), relativa à CQO (kg) removida, foram obtidos resultados médios de: 553 L (A), 560 L (B), 127 L (C) e 437 L (D). Comparando as cargas orgânicas aplicadas com e sem os pré-tratamentos, percebe-se que de A para B o aumento foi de apenas 1% (ultrassons). Já de C para D o aumento é de 3,5 vezes (*A. niger*), demonstrando que o fungo gerou vias metabólicas de degradação do glicerol que favoreceram a produção de metano.

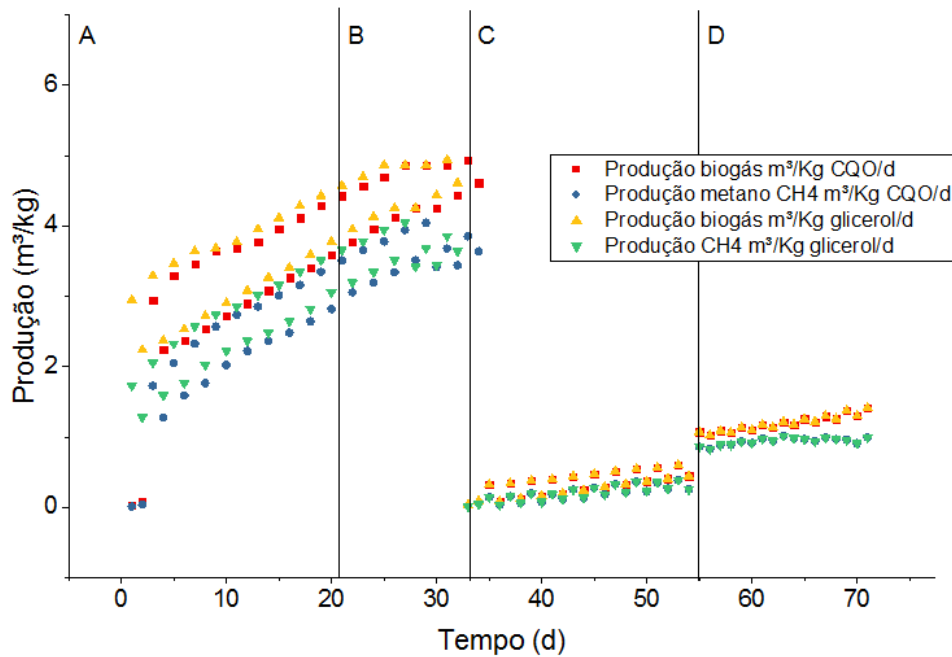


Figura 43: Produção de biogás e metano no reator UASB em contínuo.

A qualidade do biogás, expressa em termos da percentagem de metano, apresentada na Figura 44, descreve as variações verificadas no digester com o decurso do processo. Para alimentação de $0,34 \text{ kg CQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$, a % de metano variou na gama 62%-79% (A) e 79%-81% (B), para experiência sem e com pré-tratamento por ultrassons, respetivamente. Na linha dos resultados obtidos em termos do volume de biogás gerado, o processo de digestão anaeróbia foi inibido para a alimentação de $1,56 \text{ kg CQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$, o que se traduziu também num gás de menor qualidade, % de CH_4 entre 36% e 57% (C). O recurso ao pré-tratamento do glicerol por microrganismo *A. niger*, mostra que é bastante benéfico no que respeita ao acréscimo significativo da percentagem de metano, 70% e 80% (D). Em termos globais com exceção dos ensaios experimentais correspondentes à secção C, podemos afirmar que a digestão anaeróbia permitiu biogás com boa qualidade. Na bibliografia para sistemas de cogeração o teor de metano no biogás não pode ser inferior a 40-45%, pois teores baixos impedem a operação dos motores (Probiogás, 2010).

Athanasoulia *et al.* (2014) estudaram a co-digestão de lama de esgoto com diferentes concentrações de glicerol, num digester anaeróbio contínuo de mistura completa, e obtiveram 78% de metano no biogás. Ao utilizar um reator UASB em contínuo, Ma *et al.* (2008) obtiveram concentração de metano de 59%, na co-digestão de água residual do processamento de batata e glicerol.

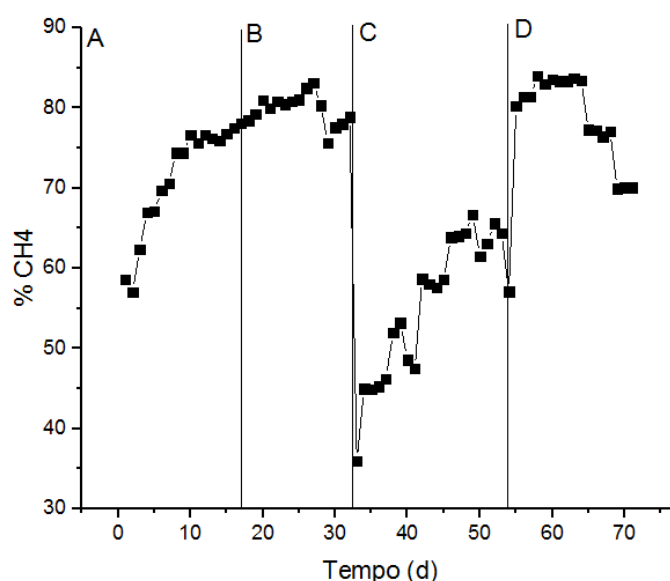


Figura 44: Variação da porcentagem de metano no reator UASB.

Com a qualidade do gás produzido, foram estimados os ganhos energéticos (Figura 45) de acordo com Eriksson (2010), em consideração o valor do preço atual da energia elétrica, 0,1652 €. kWh⁻¹. Os cálculos relacionaram a produção de biogás por massa de glicerol e pela concentração de SV.

Ao comparar o ganho de energia em euros por quantidade de substrato adicionado, a menor concentração de glicerol obteve melhores resultados (Figura 45, 1–A e B), o pré-tratamento com ultrassons aumentou o ganho em 42%, variando entre 4,7 e 6,4 €.kg⁻¹ glicerol (média de 5,8 €.kg⁻¹ glicerol). As produções em relação a concentração de SV obtiveram um aumento em 87% de A para B, as produções variaram entre 157 e 357 €.SV⁻¹ (A) (média de 306 €.kg⁻¹ SV).

Panpong *et al.* (2014) com a co-digestão anaeróbia de águas residuais de frutos do mar e glicerol (1% v/v) obtiveram a geração de 58 kWh de eletricidade para 1 m³ de água residual misturada. No presente estudo, a geração em kWh por massa de glicerol (kg) foi de: 12 a 33 (A), 35 a 40 (B), 1 a 4 (C) e 8 a 10 (D).

Os microrganismos proporcionaram um ganho de 4 vezes na produção em relação a concentração de SV, relacionando C para D. A produção em D variou entre 89 e 109 €.kg⁻¹ SV, resultando em uma produção média de 102 €.kg⁻¹ SV.

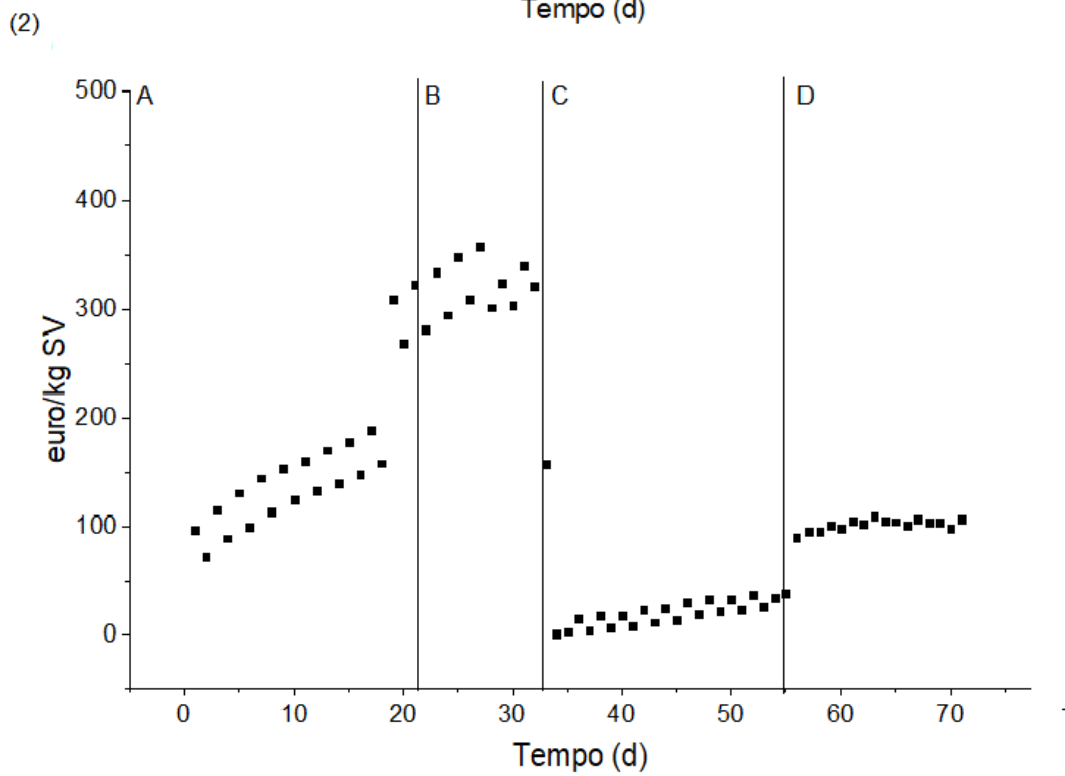
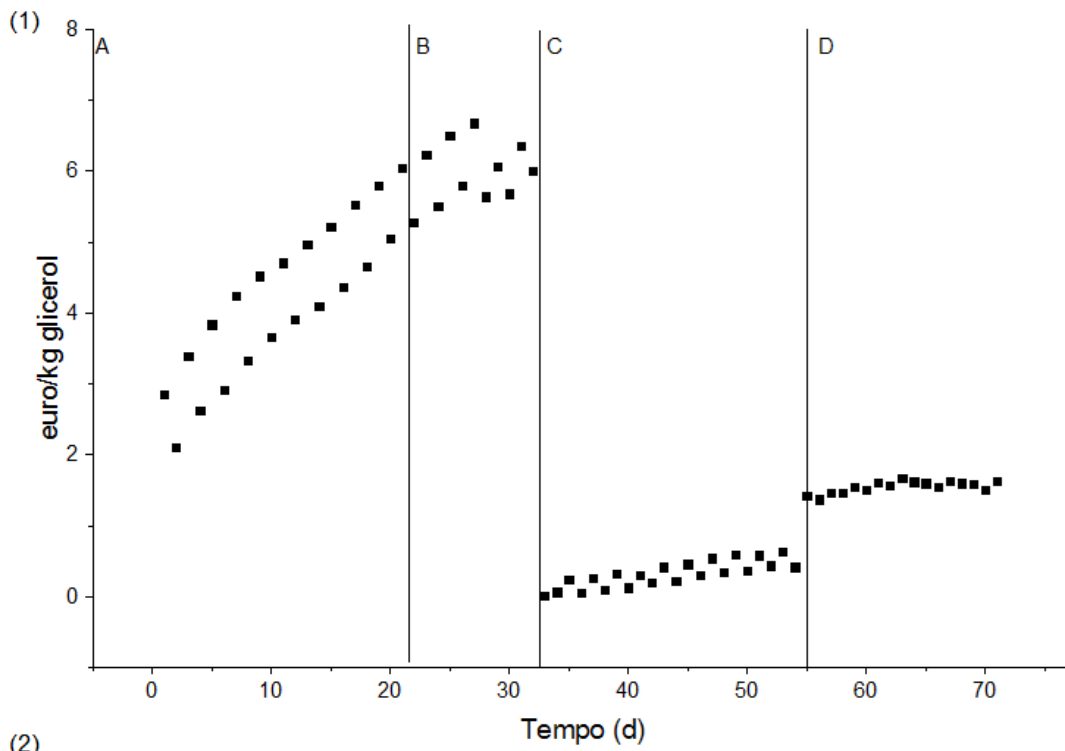


Figura 45: Valor económico do biogás gerado no reator UASB.

8 Conclusões

A caracterização do glicerol, permitiu concluir, que os valores obtidos para um conjunto de parâmetros (CQO, ST, NT, pH, CT, AGV e densidade), estão de acordo com o referido na literatura. A concentração de azoto total e fósforo total são praticamente nulas, havendo necessidade de os adicionar na alimentação, assim como a alcalinidade. Além disso, foi obtida uma CQO de 1800 g.L⁻¹, densidade de 1,02 kg.L⁻¹ e pH 8,4.

Entre os dois tipos de lama testados (digestor anaeróbio da ETAR de Vila Real DA-VR e da ETAR de Vila do Conde DA-VC), a lama DA-VR obteve, de maneira geral, melhores resultados para uma alimentação com 0,2% de glicerol, registando-se uma produção de 937 L CH₄.kg⁻¹ glicerol com 75% de metano. A lama do DA-VR obteve uma relação de SV/ST de 0,65 para uma alimentação de 12,8 g CQO.L⁻¹.

Para os ensaios em reator batch, os resultados mais satisfatórios foram conseguidos com concentração de 0,2% de glicerol e pré-tratamento deste por ultrassons durante um período de 15 h; foi obtido um biogás com 77% de metano, e o volume gerado atingiu os 1153 L CH₄.kg⁻¹ glicerol. Para concentração de 1,7% de glicerol e tratamento prévio por *A. Niger*, o gás resultante apresentou uma % de CH₄ de 65% e produção de 117 L CH₄.kg⁻¹ glicerol. A alimentação com 3,2% de glicerol indicou uma inibição em todos os ensaios experimentais.

Para o reator UASB, e alimentação de 0,34 kg CQO.m⁻³.d⁻¹ com pré-tratamento por ultrassons, foi obtido um volume de metano de 4000 L CH₄.kg⁻¹ glicerol. Relativamente ao valor económico do biogás gerado quando se usou pré-tratamento por ultrassons, foi obtido um acréscimo de 43% no valor agregado, quando comparado com a mesma carga aplicada sem o pré-tratamento (5,8 €.kg⁻¹ glicerol e 2,0 €.L⁻¹ reator). Este valor é superior ao correspondente ao ensaio experimental em batch, que proporcionou um aumento na valorização energética de 23%. Foi neste ensaio experimental que se registou a maior produção em volume, bem como o biogás de melhor qualidade (79% - 81% de metano) do biogás. Este ensaio experimental está ainda associado ao valor mais elevado de remoção de CQO (60 a 69%) e de ST (74%), sendo que no digerido foi registada a menor concentração de ácidos carboxílicos (88 g.L⁻¹).

A alimentação de 1,56 kg CQO.m⁻³.d⁻¹ com o glicerol pré-tratado com *Aspergillus niger*, proporcionou uma produção de 1000 L CH₄.kg⁻¹ glicerol, o que

correspondeu a um aumento em 4 vezes no volume de biogás produzido relativamente à mesma carga aplicada sem pré-tratamento (1,6 €. kg^{-1} glicerol e 2,4 €. L^{-1} reator). A qualidade do biogás apresentou uma percentagem de metano na gama 70% a 80%. A utilização do *A. niger* no pré-tratamento favoreceu a formação de lípase, o que resultou em produções máximas de ácido glutárico de 325 mg.L^{-1} , na 10ª semana.

Os ácidos carboxílicos produzidos pela degradação do glicerol, foram: ácidos carboxílicos, oxálico, propiónico e glutárico. A produção de ácido oxálico ocorreu durante todo o período experimental, com maiores concentrações para a alimentação de 1,56 $\text{kg CQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ (11 a 13 mg.L^{-1}), onde foi registada a menor produção de metano. O ácido propiónico teve maior produção para a carga mássica de 0,34 $\text{kg CQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, experiência em que o consumo de fósforo atingiu o valor mais elevado.

9 Referências bibliográficas

- Abdella, A.; Mazed, T. El-S.; El-Braz, A.F.; Yang, S.T. (2016). Production of β -glucosidase from wheat bran and glycerol by *Aspergillus niger* in stirred tank and rotating fibrous bed bioreactors. *Process Biochemistry*, 51, p. 1331-1337.
- Adewuyi, Y.G. (2001). Sonochemistry: Environmental science and engineering application. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 40(22), 4681–4715.
- Al-Jamal, W., Mahmoud, N. (2009). Community onsite treatment of cold strong sewage in a UASB-septic tank. *Bioresource Technology*, 100, 1061-1068
- Amaral, P.F.F.; Ferreira, T.F.; Fontes, G.C.; Coelho, M.A.Z. (2009). Glycerol valorization: New biotechnological routes. *Foods and Bioproducts Processing*, 87, p. 179-186.
- André, A., Diamantopoulou, P., Philippoussis, A., Sarris, D., Komaitis, M., Papanikolaou, S. (2010). Biotechnological conversions of bio-diesel derived waste glycerol into added-value compounds by higher fungi: production of biomass, single cell oil and oxalic acid. *Industrial Crops and Products*, v. 31, p. 407–416.
- Angelidaki, I., Ellegaard, L., Ahring, B.K. (1999). A Comprehensive Model of Anaerobic Bioconversion of Complex Substrates to Biogas. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 63, p. 363-372.
- Anônimo. (1998). Die Herstellung von Biodiesel; innerves news; Anwendungsbeispiel Biogas 3/98; Monique.
- APHA. Standard Methods for the examination of water and wastewater. (1998). American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environmental Federation, 20th Edition Washington.
- Astals S, Nolla-Ardèvol V, Mata-Alvarez J. (2013). Thermophilic co-digestion of pig manure and crude glycerol: process performance and digestate stability. *Journal of Biotechnology*, 166:97–104.
- Athanasoulia E, Melidis P, Aivasidis A. (2014). Co-digestion of sewage sludge and crude glycerol from biodiesel production. *Renew Energy*, v. 8, p.62-73.
- Bagheri, S., Muid, N., Yehye, W.A. (2015). Catalytic conversion of biodiesel derived raw glycerol to value added products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 41, 113–127.
- Balat, M., Balat, H. (2010). Progress in biodiesel processing. *Applied Energy*, v. 87, issue 6, p. 1815–1835.
- Barbosa, R.L.; Silva, F.M.; Salvador, N.; Volpato, S.C.E. (2006). Desempenho comparativo de um motor de ciclo diesel utilizando diesel e misturas de biodiesel. Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola na Universidade Federal de Lavras.

- Biebl, H.; Menzel, K.; Zeng, A.P.; Deckwer, W.D. (1999). Microbial production of 1,3-propanediol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 52, p. 289-297.
- Bougrier, C.; Carrere, H.; Delgenes, J.P. (2005). Solubilization of waste-activated sludge by ultrasound treatment. *Chemical Engineering Journal*, J. 106, p. 163–169.
- Buchauer, K. (1998). A comparison of two simple titration procedures to determine volatile fatty acids in influents to wastewater and sludge treatment processes. *Water S. A.*, v. 24, n. 1, p. 49-56.
- Chatzifragkou A, Dietz D, Komaitis M, Zeng A.P, Papanikolaou S. (2010). Effect of biodiesel-derived waste glycerol impurities on biomass and 1,3-propanediol production of *Clostridium butyricum* VPI 1718. *Biotechnology Bioengineering* 107, p.76–84.
- Chatzifragkou, A.; Papanikolaou, S. (2012). Effect of impurities in biodiesel-derived waste glycerol on the performance and feasibility of biotechnological. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95, p. 13-27.
- Chaudhary, N.; Ngadi, M.O.; Simpson, B.K.; Kassama, L.S. (2011). Biosynthesis of Ethanol and Hydrogen by Glycerol Fermentation Using *Escherichia coli*. *Advances in Chemical Engineering and Science*, v. 1, p. 83-89.
- Chernicharo, C.A.L. (2007). *Anaerobic Reactors. Biological Wastewater Treatment Series, Department of Sanitary and Environmental Engineering.*
- Chu, C.P.; Chang, B.V.; Liao, G.S.; Jean, D.S.; Lee, D.J. (2001). Observations on changes in ultrasonically treated waste-activated sludge. *Water Research*, 35, issue 4, 1038–1046.
- Cleland, W.W.; Johnson, M.J. (1955). Studies on the formation of oxalic acid by *Aspergillus niger*. *Journal of Biological Chemistry*, p. 220: 595
- Comissão Europeia. (2013). *Viver bem, dentro dos limites. 7º PAA – o Programa Geral de Ação da União para 2020 em matéria de Ambiente.*
- Converse, C.A.; Cooper, A.; Nutley, M.A. (1981). A radial-diffusion assay for serum lipase. *Biochemical Society Transactions*, v. 9, p. 320-321.
- Coral J, Karp S.G, Vanderberghe L.P, Parada J.L, Pandey A, Soccol C.R. (2008). Batch fermentation model of propionic acid production by *Propionibacterium acidipropionici* in different carbon sources. *Applied Biochemistry Biotechnology*, v. 151, p. 333–41.
- Decreto-Lei nº 117 de Portugal de 25 de outubro de (2010). Determina os critérios para a qualificação dos biocombustíveis e biolíquidos como sustentáveis e cria um novo mecanismo de apoio à incorporação dos biocombustíveis no cabaz de combustíveis consumidos no sector dos transportes, dando continuidade aos mecanismos de promoção da utilização dos biocombustíveis, previstos nos Decretos-Leis nºs 62/2006, de 21 de março, e 49/2009, de 26 de fevereiro.

- Dhamodaran, G.; Krishnan, R.; Pochareddy, Y.K.; Pyarelal, H.M.; Sivasubramanian, H.; Ganeshram, A.K. (2017). A comparative study of combustion, emission, and performance characteristics of rice-bran-, neem-, and cottonseed-oil biodiesel with varying degree of unsaturation. *Fuel* 187, 296-305.
- Diretiva 2009/28/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 23 de abril de 2009. (2009). Relativa à promoção da utilização de energia proveniente de fontes renováveis que altera e subsequentemente revoga as Diretivas 2001/77/CE e 2003/30/CE.
- Dobrowolski, A.; Mitula, P.; Rymowicz, W.; Mironczuk, A.M. (2016). Efficient conversion of crude glycerol from various industrial wastes into single cell oil by yeast *Yarrowia lipolytica*. *Bioresource Technology*, v. 207, p. 237-243.
- EBB. Grouping European Biodiesel. (2015). Producers and Promoting the use of Biodiesel in the EU European biodiesel board. Disponível em: < <http://www.ebb-eu.org/>>. Acesso dia 25 de out 2016.
- EBB. Grouping European Biodiesel. (2016). Statistics the EU biodiesel industry. Disponível em: < <http://www.ebb-eu.org/>>. Acesso dia 28 de out 2016.
- Elbeshbishy, E.; Nakhla, G. (2011). Comparative study of the effect of ultrasonication on the anaerobic biodegradability of food waste in single and two-stage systems. *Bioresource Technology*, 102, p. 6449-6457.
- Eriksson, O. (2010). Environmental technology assessment of natural gas compared to biogas. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/>> Acesso em: 2 jun. 2017.
- FAO, IFAD, IMF, OECD, UNCTAD, WFP, World Bank, WTO, IFPRI and UN HLTF, (2011). Price volatility in food and agricultural markets: policy responses. Rome, FAO.
- Ferreira, P.; Lopes, M.; Mota, M.; Belo, I. (2016). Oxygen mass transfer impact on citric acid production by *Yarrowia lipolytica* from crude glycerol. *Biochemical Engineering Journal*, v. 110, p. 35-42.
- Fonseca, M.M.; Teixeira, J.A. (2007). *Reactores Biológicos - Fundamentos e Aplicações*. Lidel, Lisboa, 3-27.
- Fountoulakis, M.S.; Manios, T. (2009). Enhanced methane and hydrogen production from municipal solid waste and agro-industrial by-products co-digested with crude glycerol. *Bioresource Technology*, 100, p. 3043-3047.
- Fountoulakis, M.S.; Petousi, I.; Manios, T. (2010). Co-digestion of sewage with glycerol to boost biogas production. *Waste Management*, vol. 30; issue 10, p. 1849-1853.
- Gavala, H.N.; Angelidaki, I.; Ahring, B.K. (2003). Kinetics and Modeling of Anaerobic Digestion Process. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol. 81, p. 57-93.

- Ghobadian, B.; Rahimi, H.; Nikbakht, A.M.; Najafi, G.; Yusaf, T.F. (2009). Diesel engine performance and exhaust emission analysis using waste cooking biodiesel fuel with an artificial neural network. *Renewable Energy* 34, 976-982.
- Gilham, D., Lehner, R. (2005). Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro, 36, 139–147.
- Gu, Z., Glatz, B.A., Glatz, C.E. (1998). Effects of propionic acid on propionibacteria fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 229, p. 13–18.
- Habibullah M, Masjuki H, Kalam M, Fattah IR, Ashraful A, Mobarak H. (2014) Biodiesel production and performance evaluation of coconut, palm and their combined blend with diesel in a single-cylinder diesel engine. *Energy Conversion and Management*; 87:250–7.
- Hanaki, K.; Matsuo, T.; Nagase, M. (1981). Mechanism of inhibition caused by long-chain fatty acids in anaerobic digestion process. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 23, p. 1591-1610.
- Hassan, M.H.; Kalan, A.M. (2013). An overview of biofuel as a renewable energy source: development and challenges. *Procedia Engineering* 56, 39-53.
- Hazimah, A.H.; Ooi, T.L.; Salmiah, A. (2003). Recovery of glycerol and diglycerol from glycerol pitch. *Journal of Oil Palm Research*, v. 15, p. 1-5.
- He, Q.S., Mcnutt, J., Yang, J. (2017). Utilization of the residual glycerol from biodiesel production for renewable energy generation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 71, p. 63–76.
- HLPE. Biofuels and food security. (2013). A report by the High Level Panel of Experts on Food Security and Nutrition of the Committee on World Food Security, Rome.
- Hsu, S., Yang, S. (1991). Propionic Acid Fermentation of Lactose. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 38, p. 571-578.
- Hu, S.; Luo, X.; Wan, C.; Li, Y. (2012). Characterization of crude glycerol from biodiesel plants. *Agricultural and Food Chemistry*, 60, 5915-5921.
- Hutan, M.; Kolesárová, N., Bodík, I.; Czölderová, M. (2013a). Long-term monodigestion of crude glycerol in a UASB reactor. *Bioresource Technology*, v. 130, p. 88–96.
- Hutnan, M.; Kolesárová, N.; Bodík, I. (2013b). Anaerobic digestion of crude glycerol as sole substrate in mixed reactor. *Environmental Technology*, 34, p. 2179-2187.
- Hutnan, M.; Kolesárová, N.; Bodík, I.; Spalková, V.; Lazor, M. (2009). Possibilities of anaerobic treatment of crude glycerol from biodiesel production. 36^o International Conference of Slovak Society of Chemical Engineering, Tatranské Matliare, Slovakia.

- Hwu, C.S.; Tseng, S.K.; Yuan, C.Y.; Kulik, Z.; Lettinga, G. (1998). Biosorption of long-chain fatty acids in UASB treatment process. *Water Research*, 32, p. 1571-1579.
- Ilham, Z.; Saka, S. (2016). Esterification of glycerol carbonate in non-catalytic supercritical dimethyl carbonate. *Springer Plus*, 5:923, p. 1-6.
- Jaeger, K.E.; Ransac, S.; Dijkstra, B. W.; Colson, C.; van Heuvel, M.; Misset, O. (1994). Bacterial lipases. *Microbiology Reviews*, v. 15, p. 29-63.
- Jawed, M.; Tare, V. (1999). Microbial composition assessment of anaerobic biomass through methanogenic activity tests. *Water SA* 25, p. 345-350.
- Khanal, S.K.; Grewell, D.; Sung, S.; Leeuwen, J.H.V. (2007). Ultrasound Applications in Wastewater Sludge Pretreatment: A Review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 37, p. 277-313.
- Koster, I.W.; Cramer, A. (1987). Inhibition of Methanogenesis from Acetate in Granular Sludge by Long-Chain Fatty Acids. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 54, no. 2, p. 403-409.
- Kouker, G.; Jaeger, K.E. (1987). Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 53, p. 211-213.
- Kumaran, P., Hephzibah, D., Sivasankari, R., Normanbay Saifuddin, A., Shamsuddin, H. (2016). A review on industrial scale anaerobic digestion systems deployment in Malaysia: Opportunities and challenges. *Renewable and Sustainable Energy Review*, 56, 929-940.
- Kwon, Y. e Koper, M.T.M. (2010). Combining Voltammetry with HPLC: Application to Electro-Oxidation of Glycerol. *Analytical Chemistry*, v. 82, p. 5420-5424.
- Lalman, J.A.; Bagley, D.M. (2000). Anaerobic degradation and inhibitory effects of linoleic acid. *Water Research*, v. 34. Issue 17, p. 4220-4228.
- Lawrence, A. W. (1971). Application of Process Kinetics to Design of Anaerobic Processes. *Advances in Chemistry*, R.F. Gould, ed, American Chemical Society, Washington, DC, p. 163-190.
- Legisa, M.; Matthey, M. (1986). Glycerol synthesis by *Aspergillus niger* under citric acid accumulating conditions. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 8, issue 10, p. 607-609.
- Leoneti, A.B.; Aragão-Leoneti, V.; Oliveira, S.V.W.B. (2012). Glycerol as a by-product of biodiesel production in Brazil: Alternatives for the use of unrefined glycerol. *Renewable Energy*, vol. 45, p. 138-145.
- Li, M.; Li, Y.; Peng, S.; Lu, G.; Li, S. (2009). Photocatalytic hydrogen generation using glycerol wastewater over Pt/TiO₂. *Frontiers in Chemistry*. v. 4, n. 1, p. 32-38.
- Lin, C., Chang, F., Chang, C. (2000). Co-digestion of leachate with septage using a UASB reactor. *Bioresource Technology*, v. 73, p. 175-178.

- Linville, J.L., Shen, Y., Schoene, R.P., Nguyen, M., Urgan-Demirtas, M. (2016). Impact of trace element additives on anaerobic digestion of sewage sludge with in-situ carbon dioxide sequestration. *Process Biochemistry*, 51, 1283-1289.
- López, J.A.S.; Santos, M.Á.M.; Pérez, A.F.C.; Martín, A.M. (2009). Anaerobic digestion of glycerol derived from biodiesel manufacturing. *Bioresource Technology*, v. 100, issue 23, p. 5609-5615.
- Luo, G.; Xie, L.; Zhou, Q.; Angelidaki, I. (2011). Enhancement of bioenergy production from organic wastes by two-stage anaerobic hydrogen and methane production process. *Bioresource Technology*, v. 102, issue 18, p. 8700-8706.
- Ma, F.; Hanna, M.A. (1999). Biodiesel production: a review. *Bioresource Technology*, vol. 70, Issue 1, p. 1-15.
- Ma, J.; Van Wambeke, M.; Carballa, M.; Vertraete, W. (2008). Improvement of the anaerobic treatment of potato processing wastewater in a UASB reactor by co-digestion with glycerol. *Biotechnology Letters*, 30, p. 861-867.
- Marshall, A.T.; Haverkamp, R.G. (2008). Production of hydrogen by the electrochemical reforming of glycerol–water solutions in a PEM electrolysis cell. *International Journal of Hydrogen Energy*. v. 33, p. 4649 – 4654.
- Martín, M.A.; Fernández, A.; Siles, S.J.A. (2013). Semi-continuous anaerobic co-digestion of orange peel waste and residual glycerol derived from biodiesel manufacturing. *Waste Management*, 33, p. 1633-1639.
- Martínez, E.J.; Rosas, J.G.; Morán, A.; Gómez, X. (2015). Effect of Ultrasound Pretreatment on Sludge Digestion and Dewatering Characteristics: Application of Particle Size Analysis. *Water*, 7, p. 6483-6495.
- Martínez-Campos, R.; Torre, M. (2002). Production of propionate by fed-batch fermentation of *Propionibacterium acidipropionici* using mixed feed of lactate and glucose. *Biotechnology Letters*, v. 24, p. 427–431.
- Mazumdar, S.; Clomburg, J.M.; Gonzalez, R. (2010). *Escherichia coli* Strains Engineered for Homofermentative Production of D-Lactic Acid from Glycerol. *Applied and Environment Microbiology*, p. 4327-4336.
- McNamara, D.P., Childs, S.L., Giordano, J., Iarriccio, A., Cassidy, J., Shet, M.S., Park, A. (2006). Use of a Glutaric Acid Cocrystal to Improve Oral Bioavailability of a Low Solubility API. *Pharmaceutical Research*, v. 23, p. 1888–1897.
- Mes, T.Z.D.; Stams, A.J.M.; Zeeman, G. (2003). Chapter 4. Methane production by anaerobic digestion of wastewater and solid wastes. *Biomethane and Biohydrogen. Status and perspectives of biological methane and hydrogen production*, 58-94.
- Mironczuk, A.M.; Dobrowolski, A.; Rakicka, M.; Rywinska, A.; Rymowicz, W. (2015). Newly isolated mutant of *Yarrowia lipolytica* MK1 as a proper host for efficient erythritol biosynthesis from glycerol. *Process Biochemistry*, v. 50, p. 61-68.

- Moawad, A., Mahmoud, U., El-Khateeb, M., & El-Molla, E. (2009). Coupling of sequencing batch reactor and UASB reactor for domestic wastewater treatment. *Desalination*, v. 242, p. 325-335.
- Montgomery, D.C. (1997). *Design and analysis of experiments*. John Wiley & Sons, INC, fifth edition, ISBN 0-471-31649-0.
- Moon C, Ahn JH, Kim SW, Sang BI, Um Y. (2010). Effect of biodiesel-derived raw glycerol on 1,3-propanediol production by different microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 161, p.502–510.
- Musial, I.; Rymowicz, W.; Witkowska, D. (2006). Effect of Span 20 Concentration on Oxalic Acid Production, from Post-Refining Fatty Acids by *Aspergillus niger* XP*. *Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences*, v. 60, p. 388–390.
- Nartker, S.; Ammerman, M.; Aurandt, J.; Stogsdil, M.; Hayden, O.; Antle, C. (2014). Increasing biogas production from sewage sludge anaerobic co-digestion process by adding crude glycerol from biodiesel industry. *Waste Management*, 34, p. 2567-2571.
- NEEE. Núcleo de Estudos Estratégicos de Energia, (2015). *Ranking Mundial de Energia e Socioeconómica*. SPE/MME.
- Nghiem L.D, Nguyen T.T, Manassa P, Fitzgerald S.K, Dawson M, Vierboom S. (2014) Co-digestion of sewage sludge and crude glycerol for on-demand biogas production. *Int Biodeterior Biodegrad*, v. 95(A), p. 160–6.
- Nitayavardhana, S.; Khanal, S.K. (2011). Biodiesel-derived crude glycerol bioconversion to animal feed: A sustainable option for a biodiesel refinery. *Bioresource Technology*, 102, p. 5808-5814.
- Nuchdang, S.; Phalakornkule, C. (2012). Anaerobic digestion of glycerol and co-digestion of glycerol and pig manure. *Journal of Environmental Management*, 101, p. 164-172.
- OECD/FAO. (2015). *Biofuels*. Agricultural, 144.
- Okumura, S.; Iwai M.; Tominaga, Y. (1984). Synthesis of Ester Oligomer by *Aspergillus niger* Lipase. *Agricultural and Biological Chemistry*, 11, p. 2805-2808.
- Pachapur, V.L.; Kutty, P.; Brar, S.K.; Ramirez, A.A. (2016). Enrichment of Secondary Wastewater Sludge for Production of Hydrogen from Crude Glycerol and Comparative Evaluation of Moni-, Co- and Mixed-Culture Systems. *International Journal of Molecular Sciences*, p. 17-92.
- Pagliari, M.; Ciriminna, R.; Kimura, H.; Rossi, M.; Pina, C.D. (2007). From glycerol to value-added products. *Angewandte Chemie*, ed. 2007, 46, p. 4434-4440.
- Pan, C.; Tan, Giin-Y, A.; Ge, L.; Chen, C-L.; Wang, J.Y. (2016). Microbial removal of carboxylic acids from 1,3-propanediol in glycerol anaerobic digestion effluent by PHAs-producing consortium. *Biochemical Engineering Journal*, 122, p. 269-276.

- Panpong, K.; Srisuwan, G.; O-Thong, S.; Kongjan, P. (2013). Anaerobic Co-digestion of Canned Seafood Wastewater with Glycerol Waste for Enhanced Biogas Production. *Energy Procedia*, 52, p. 328-336.
- Panponga, K.; Nuithitikulc, K.; O-thongd, S.; Kongjan, P. (2015). Anaerobic Co-Digestion Biomethanation of Cannery Seafood Wastewater with *Microcystis* SP; Blue Green Algae with/without Glycerol Waste. *Energy Procedia*, 79, p. 103-110.
- Papanikolaou, S.; Fakas, S.; Fick, M.; Chevalot, I.; Galiotou-Panayotou.; Komaitis, M.; Marc, I.; Aggelis, G. (2008). Biotechnological valorization of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: Production of 1,3-propanediol, citric acid and single cell oil. *Biomass and bioenergy*, vol. 32, issue 1, p. 60-71.
- Paul, E.L.; Obeng, V.A.; Kresta, S.M. (2003). *Handbook of industrial mixing: science and practice*. Censored by the North American Mixing Forum.
- Pavlostathis, S.G., Gossett, J.M. (1986). A kinetic model for anaerobic digestion of biological sludge. *Biotechnol. Bioenergy* 28, 1519–1530.
- Pavlostathis, S.G.; Gomez, E.G. (1991). Kinetics of Anaerobic Treatment: A critical Review. *Critical Reviews in Environmental Control*, 21 (5, 6), p. 411-490.
- Portal Energia. (2008). Os biocombustíveis em Portugal. Disponível em: <<http://www.portal-energia.com>>. Acesso dia 16 de fev de 2017.
- Probiogás. (2010). *Guia prático do Biogás: Geração e Utilização*. Publicado pela Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e V. (FNR), com o apoio do Ministério da Nutrição, Agricultura e Defesa do Consumidor da Alemanha, em virtude de uma decisão do Parlamento Federal Alemão.
- Przystałowska, H.; Lipinski, D.; Slomski, R. (2015). Biotechnological conversion of glycerol from biofuels to 1,3-propanediol using *Escherichia coli*. *Acta Biochimica Polonica*, v. 62, p. 23-34.
- Rawlyer, A.; Siegenthaler, P.A. (1989). A single and continuous spectrophotometric assay for various lipolytic enzymes, using natural, non-labelled lipid substrates. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 1004, p. 337-344.
- Razaviarani, V.; Buchanan, I.D. (2015). Anaerobic co-digestion of biodiesel waste glycerin with municipal wastewater sludge: Microbial community structure dynamics and reactor performance. *Bioresour Technol*, 182, p. 8-17.
- REN21. Renewable Energy Policy Network for the 21st Century. (2015). *Annual Reporting on Renewables: Ten years of excellence*.
- Rinzema, A.; Boone, M.; Knippenberg, K.V.; Lerringa, G.B. (1994). Bactericidal Effect of long Chain Fatty Acids in Anaerobic Digestion. *Water Environment Research*, v. 66, p. 40-49.

- Rivaldi, J.D.; Sarrouh, B.F.; Silva, S.S. (2007). Development of biotechnological processes using glycerol from biodiesel production. *Current Research Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, p. 429-232. Disponível em: <books.google.pt>. Acesso dia 16 de jan de 2017.
- Samad, M.Y.A.; Razak, C.N.A.; Salleh, A.B.;Yunus, W.M.Z.W.; Ampon, K.; Basri, M. (1989). A plate assay for primary screening of lipase activity. *Journal of Microbiological Methods*, v. 9, p. 51-56.
- Schmidell, W., Facciotti, M.C.R. (2001). *Biorreatores e Processos fermentativos*. Cap. 8 in W.; Schmidell, W., Lima, U., A Aquarone, E., Borzani. *Engenharia Bioquímica (Biotecnologia Industrial)*. Ed. Edgard Blucher Ltda., vol. 2, São Paulo, 2001.
- Serrano, A.; Siles, J.A.; Chica, A.F.; Martin, M.A. (2014). Improvement of mesophilic anaerobic co-digestion of agri-food waste by addition of glycerol. *Journal of Environmental Management* 140, p. 76-82.
- Siles, J.A.; Martín, M.A.; Chica, A.F.; Martín, A. (2010). Anaerobic co-digestion of glycerol and wastewater derived from biodiesel manufacturing. *Bioresource Technology*, v. 101, issue 16, p. 6315-6321.
- Silva, G.P.; Mack, M.; Contiero, J. (2009). Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advances*, 27, p. 30-39.
- Silvestre, G.; Fernández, B.; Bonmatí, A. (2015). Addition of crude glycerin as strategy to balance the C:N ratio on sewage sludge thermophilic and mesophilic anaerobic co-digestion. *Bioresource Technology*, 193, p. 377-385.
- Strasser, H., Burgstaller, W., Schinner, F. (1994). High-yield production of oxalic acid for metal leaching processes by *Aspergillus niger*. *FEMS Microbiol Lett*, v. 119, p., 365-370.
- Sundus, F., Fazal, M.A., Masjuki, H.H. (2017). Tribology with biodiesel: A study on enhancing biodiesel stability and its fuel properties. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 70, p. 399-412.
- Tawfik, A., Klapwijk, A. (2010). Polyurethane rotating disc system for posttreatment of anaerobically pre-treated sewage. *Journal of Environmental Management*, 91, 1183-1192.
- Tchobanoglous, G.; Burton, F.L.; Stensel, H. D. (1993). *Wastewater engineering: Treatment and reuse*. New York, NY: McGraw Hill
- Thompson, J.C.; He, B.B. (2006). Characterization of Crude Glycerol from Biodiesel Production from Multiple Feedstocks. *Applied Engineering Agriculture*, 22, p. 261-265.
- Tiehm, A.; Nickel, K.; Zellhorn, M.M.; Neis, U. (2001). Ultrasound waste activated sludge disintegration for improving anaerobic stabilization. *Water Research*, vol. 35, issue 8, p. 2003-2009.

- Tippawan, P.; Thammasit, T.; Assabumrungrat, S.; Arpornwichanop, A. (2016). Using glycerol for hydrogen production via sorption-enhanced chemical looping reforming: Thermodynamic analysis. *Energy Conversion and Management*, 124, p. 325-332.
- Trchounian, K.; Poladyan, A.; Trchounian, A. (2016). Optimizing strategy for *Escherichia coli* growth and hydrogen production during glycerol fermentation in batch culture: Effects of some heavy metal ions and their mixtures. *Applied Energy*, v. 177, p. 335-340.
- Tudorache, M.; Proteseseu, L.; Coman, S.; Parvulescu, V. (2012). Efficient bioconversion of glycerol-to-glycerol carbonate catalyzed by lipase extracted from *Aspergillus niger*. *Green Chemistry*, 14, 478.
- U.S. department of Energy. (2016). Clean cities Alternative Fuel Price Report. Energy Efficiency & Renewable Energy.
- UFOP-Schriften. (2011). International biodiesel markets: Developments in production and trade. Bericht, 2011.
- Usack J.G, Angenent L.T. (2015). Comparing the inhibitory thresholds of dairy manure co-digesters after prolonged acclimation periods: part 1 – performance and operating limits. *Water Research*, 87:446-57.
- Valle, A.; Cabrera, G.; Cantero, D.; Bolivar, J. (2017). Heterologous expression of the human Phosphoenol Pyruvate Carboxykinase (hPEPCK-M) improves hydrogen and ethanol synthesis in the *Escherichia coli* *dcuD* mutant when grown in a glycerol-based medium. *New Biotechnology*, v. 35, p. 1-12
- Vásquez, J.; Nakasaki, K. (2016) Effects of shock loading versus stepwise acclimation on microbial consortia during the anaerobic digestion of glycerol. *Biomass and Bioenergy*, 86, p. 129-135.
- Venkataramanan K.P, Boatman J.J, Kurniawan Y, Taconi K.A, Bothum G.D, Scholz C. (2012). Impact of impurities in biodiesel-derived crude glycerol on the fermentation by *Clostridium pasteurianum* ATCC 6013. *Applied Microbiology and Biotechnology* 93, p.1325–1335.
- Viana, Michel B. (2011). Produção de biogás a partir de glicerol oriundo de biodiesel. Dissertação de Mestrado da Universidade de São Paulo. São Carlos-SP.
- Vivek, N.; Pandey, A.; Binod, P. (2016). Biological valorization of pure and crude glycerol into 1,3-propanediol using a novel isolate *Lactobacillus brevis* N1E9.3.3. *Bioresource Technology*, 213, p. 222-230.
- von Sperling, M.E., Gonçalves, R.F. (2001). Lodo de esgotos: características e produção. In: Andreoli, C. V.; von Sperling, M. E.; Fernandes, F. (Org.) Lodo de esgoto: tratamento e disposição final. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, UFMG, Curitiba: SANEPAR, 484 p. (Princípios do tratamento biológico de águas residuais, v. 6, cqp. 2, p. 17-67).

- Wang, Q.; Kuninobu, M.; Kakimoto, K.; Ogawa, H.I.; Kato, Y. (1999). Upgrading of anaerobic digestion of waste activated sludge by ultrasonic pretreatment, *Bioresource Technology* 68, 309–313.
- Weemaes, M.P.J.; Verstraete, W.H. (1998). Evaluation of current wet sludge disintegration techniques. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 73, 83–92.
- Witteveen, C.F.B.; Visser, J. (1995). Polyol pools in *Aspergillus niger*. *FEMS Microbiology Letters*, 134, p. 57-62.
- Yang, F.; Hanna, M.A.; Sun, R. (2012). Value-added uses for crude glycerol-a byproduct of biodiesel production. *Biotechnology for Biofuels*, 5:13.
- Yazdani, S.S., & Gonzalez, R. (2007). Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Current Opinion in Biotechnology*, p. 213–219.
- Yong, K.C.; Ooi, T.L.; Dzulkefly, K.; Wanyunus, W. M. Z.; Hazimah, A. H. (2001). Characterization of glycerol residue from a palm kernel oil methyl ester plant. *Journal of Oil Palm Research*, v. 13, n 2, p. 1-6.
- Zhang A., Yang S.T. (2009). Engineering *Propionibacterium acidipropionici* for enhanced propionic acid tolerance and fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 104, p. 766–773.
- Zhang, Y.; Dubé, M.A.; McLean, D.D. (2003). Biodiesel production from waste cooking oil: 1. Process design and technological assessment. *Bioresource Technology*, vol.89, issue 1, p. 1-16.
- Zhu, Y., Li, J., Tan, M., Liu, L., Jiang, L., Sun, J., Fee, P, Du, G., Chen, J. (2010). Optimization and scale-up of propionic acid production by propionic acid-tolerant *Propionibacterium acidipropionici* with glycerol as the carbon source. *Bioresource Technology*, v. 101(22), p. 8902–8906.