

Biosistemas integrados na codigestão do glicerol bruto em resíduos agroindustriais para a geração de H₂ e CH₄

Integrated biosystems in the co-digestion of crude glycerol in agro-industrial wastes for the H₂ and CH₄ generation

Caroline Varella Rodrigues^{1,2}, Luan Vieira Adames^{1,2},
Rodrigo Fernando Costa Marques^{1,3}, Ana Paula Jacobus²,
Lorena Oliveira Pires¹, Sandra Imaculada Maintinguer^{2,4}

¹ Instituto de Química, IQ/UNESP, Rua Professor Francisco Degni, n.55, Araraquara, São Paulo, Brasil.

² Instituto de Pesquisa em Bioenergia, IPBEN/UNESP, Rua 10, n.2527, Rio Claro, São Paulo, Brasil.

³ Centro de Monitoramento e Pesquisa da Qualidade de Combustíveis, Biocombustíveis, Petróleo e Derivados, Cempec-IQ/UNESP, Rua Professor Francisco Degni, n.55, Araraquara, São Paulo, Brasil.

⁴ Universidade de Araraquara, UNIARA, Rua Voluntários da Pátria, n.1309, Araraquara, São Paulo, Brasil.

e-mail: carolvr61@hotmail.com, lvadames@gmail.com, urgentissimo@gmail.com, lorena.pires@unesp.br, main-ting2008@gmail.com

RESUMO

A produção de biodiesel tem crescido e ganhado destaque no cenário energético mundial. Com isso, seu principal coproduto, o glicerol bruto (GB), tem acompanhado esse aumento, ocasionando a formação de grandes estoques deste resíduo. Uma alternativa promissora para a sua redução consiste na utilização por processos biológicos anaeróbios visando à produção de biogás, tanto hidrogênio (H₂) quanto metano (CH₄). Sabe-se que a eficiência dessa bioconversão aumenta por meio da codigestão com outros resíduos orgânicos. Assim, o objetivo deste estudo consistiu na codigestão do GB, proveniente da produção de biodiesel a partir de óleos residuais domésticos, com vinhaça citrícola (VC), em dois estágios sequenciais. No 1º estágio (Ensaio 1), o reator anaeróbio foi operado em batelada, alimentado com 5 g DQO L⁻¹ GB e 5 g DQO L⁻¹ VC, na presença de cultura mista pertencente ao gênero *Clostridium* sp., a 37 °C, pH 5,5, *headspace* com N₂, gerando 4,48 mmol H₂ L⁻¹ em 112 h de experimento, sendo consumidos 93,19 % de GB e 74,00 % de glicose. Um ensaio controle (Controle 1) foi montado com apenas 5 g DQO L⁻¹ GB, não sendo verificada produção de H₂. O efluente gerado no Ensaio 1 (200 mL) foi usado como substrato no 2º estágio (Ensaio 2) por um inóculo *in natura* identificado por consórcio de bactérias anaeróbias fermentativas e archaeas metanogênicas, no reator anaeróbio metanogênico (500 mL), *headspace* com N₂, pH 7,0, a 37 °C, gerando 229,08 mmol CH₄ L⁻¹ em 624 h de operação. Além disso, 87,34 % da DQO e 93,75 % do metanol proveniente do GB foram consumidos. O efluente gerado pelo Controle 1 produziu apenas 40,58 mmol CH₄ L⁻¹ (Controle 2). Dessa forma, constatou-se que a codigestão elevou a geração de biogás, com consumos de resíduos orgânicos e tóxicos presentes no GB por meio dos sistemas integrados.

Palavras-chave: Biodiesel. Digestão anaeróbia. Hidrogênio. Metano.

ABSTRACT

The biodiesel production has grown and it gained prominence in the global energy scenario. As a result, its main co-product, crude glycerol (CG), has accompanied this increase, causing the formation of large stocks of this residue. A promising alternative for its reduction is the use by anaerobic biological processes aiming at the biogas production, as hydrogen (H₂) as methane (CH₄). It is known that the efficiency of this bioconversion increases through co-digestion with other organic waste. Thus, the objective of this study consisted in the co-digestion of CG, from the biodiesel production through waste cooking oils, with citrus vinasse (CV), in two sequential stages. In the 1st stage (Assay 1), the anaerobic reactor was operated in batch, fed with 5 g COD L⁻¹ CG and 5 g COD L⁻¹ CV, in the presence of a mixed culture belonging to the genus *Clostridium* sp.,

at 37 °C, pH 5.5, headspace with N₂, generating 4.48 mmol H₂ L⁻¹ in 112 h of experiment, being consumed 93.19 % of CG and 74.00 % of glucose. A control assay (Control 1) was assembled with only 5 g COD L⁻¹ CG, without H₂ production. The effluent generated in Assay 1 (200 mL) was used as a substrate in the 2nd stage (Assay 2) by an inoculum *in natura* identified by a consortium of anaerobic bacteria and methanogenic archaea, in the anaerobic methanogenic reactor (500 mL), headspace with N₂, pH 7.0, at 37 °C, generating 229.08 mmol CH₄ L⁻¹ in 624 h of operation. In addition, 87.34 % of COD and 93.75 % of methanol from CG were consumed. The effluent generated by Control 1 produced only 40.58 mmol CH₄ L⁻¹ (Control 2). Thus, it was found that co-digestion increased the biogas generation, with consumption of organic and toxic waste present in CG through integrated systems.

Keywords: Anaerobic digestion. Biodiesel. Hydrogen. Methane.

1. INTRODUÇÃO

A indústria do biodiesel tem mostrado um enorme crescimento nos últimos anos. No Brasil a sua produção tem sido encorajada por leis governamentais com porcentagens crescentes deste biocombustível à matriz energética brasileira, visando substituir gradativamente o óleo diesel de origem fóssil. A mistura do biodiesel ao diesel se tornou mandatória a partir de 2008 com a adição de 2 % à matriz energética brasileira [1]. Esta adição ocorreu gradualmente com os anos, sendo 3 % em 2009, 4 % a partir de julho de 2009, 5 % em 2011 e 2012 e 6 % em 2014 [2]. Uma nova lei (No. 613/2015) de 23 de março de 2016 estabeleceu a adição de 8 % de biodiesel ao diesel em 2017, 9 % em março de 2018, 10 % em março de 2019 e 11 % a partir de setembro de 2019, onde esta última porcentagem encontra-se em vigor atualmente [1, 3, 4]. Em 2017 foram produzidos mundialmente um total de 36 bilhões de litros de biodiesel, dos quais 4,3 bilhões de litros foram produzidos pelo Brasil que ocupou a terceira posição em produção [5, 6]. Estima-se que a produção de biodiesel em 2020 chegue a 6,8 bilhões de litros, correspondendo a um incremento de 20 % em relação à produção de 2019, movimentando a economia nacional em R\$ 19 bilhões [7].

No Brasil, as principais matérias-primas empregadas para a produção de biodiesel correspondem ao óleo de soja (68,30 %), seguida da gordura bovina (12,99 %), outros materiais graxos (12,78 %), gordura de porco (2,05 %) e outras matérias-primas dentre elas óleo de algodão, óleo de fritura, gordura de frango, óleo de palma, de dendê e de milho, somando 3,88 % da produção nacional [3]. Assim, o maior problema da comercialização do biodiesel refere-se ao custo requerido para as matérias-primas, correspondendo cerca de 70-95 % do custo total da produção usando-se convencionalmente triglicerídeos, tais como óleos vegetais virgens ou gorduras animais [8].

Como forma de fornecer vantagens econômicas à produção do biodiesel, o óleo de cozinha é considerado uma aplicação ambientalmente sustentável, servindo como matéria-prima para a obtenção deste biocombustível, uma vez que é observada a redução de custos da produção de 60-70 % [9]. De acordo com o relatório da SABESP [10], somente 2,5 a 3,5 % do óleo comestível descartado no Brasil é reciclado anualmente. Em São Paulo, nos meses entre julho/agosto de 2017, o preço do óleo residual doméstico era R\$0,90 por litro [11], enquanto que o preço do óleo de soja virgem era R\$3,31 por litro [12], um valor cerca de 3,7 vezes maior do que o óleo de cozinha reciclado. Em 2020, o preço do óleo de soja virgem chegou à R\$6,00 [13]. Além disso, destaca-se a redução dos problemas associados com sua disposição inadequada podendo causar a poluição da água e do solo [9]. Cerca de 1 litro de óleo pode contaminar um milhão de litros de água, podendo ser difícil a sua degradação por processos biológicos além de levar à formação de filmes, obstruindo a passagem de oxigênio para a água, aumentando assim a carga orgânica em corpos d'água, ocasionando em um impacto negativo na vida aquática [14].

Segundo dados da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) e da Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais (ABIOVE), no ano de 2018, contabilizou-se 88.384 m³ de óleo residual doméstico alocados para a produção de biodiesel, superpassando o ano de 2017 com 55.408 m³ [15]. De acordo com a Associação de Produtores de Biodiesel do Brasil (APROBIO), cada 1 litro de óleo de cozinha usado podem ser produzidos cerca de 980 mililitros de biodiesel [16]. Apesar de algumas dificuldades quanto ao uso do óleo residual doméstico na obtenção de biodiesel, como a presença de ácidos graxos livres que ocasionam a formação de produtos saponificados, não se inviabiliza seu uso para esta produção. Pesquisas no Instituto de Biotecnologia (Ibiotec) da Universidade de Araraquara- SP levaram à construção da planta piloto de produção de biodiesel a partir de óleo residual doméstico, coletado de residências, escolas municipais e estabelecimentos comerciais. O biodiesel gerado nesta unidade já abastece os caminhões da Cooperativa de Reciclagem Acácia (Cooperativa de Catadores de Materiais Recicláveis) de Araraquara (SP), numa proporção de 50 % de diesel comum e 50 % do biodiesel. Além de reutilizarem este resíduo para a produção do biocombustível, já é avaliada a redução de custos com combustível de 50 % [17, 18].

A produção crescente de biodiesel tem elevado também a produção do coproduto desta reação, o glicerol bruto (GB). Estima-se que para cada 100 kg de biodiesel produzidos são gerados 10 kg de glicerol bruto [19]. Este resíduo apresenta uma grande dificuldade em ser absorvido pelas indústrias convencionais que fazem o seu consumo, como por exemplo, a indústria farmacêutica e a alimentícia, pois ele contém impurezas como metanol, sabão, ácidos graxos livres, triglicerídeos, vindos do processo da transesterificação, e assim, purificá-lo corresponde a um processo oneroso e inviável economicamente, sendo o custo estimado para a purificação de R\$282,52/kg [20–22].

Diante deste cenário surge a necessidade de desenvolver usos alternativos para o glicerol bruto a fim de tornar a produção de biodiesel sustentável a longo prazo. Desse modo, a sua utilização em plantas de digestão anaeróbia se mostra uma solução promissora, sendo considerado uma excelente matéria-prima para a produção de biogás como o metano (CH_4) (poder calorífico inferior de $50,02 \text{ KJ g}^{-1}$) [23] e hidrogênio (H_2) (poder calorífico inferior de $119,93 \text{ KJ g}^{-1}$) [19].

O glicerol bruto representa um substrato potencial para processos de fermentação biológica [24]. A codigestão corresponde à digestão simultânea de uma mistura homogênea de dois ou mais substratos com características complementares entre si, a fim de fornecer nutrientes em quantidades equilibradas, permitindo dessa forma uma fermentação estável [25, 26]. Segundo KURAHASHI *et al.* [27], a codigestão pode aumentar a atividade de microrganismos anaeróbios, tendo em vista que uma mistura adequada de resíduos proporciona efeitos complementares e sinérgicos que compensam a falta de carbono e demais nutrientes de alguns substratos, ao mesmo tempo em que diluem substâncias nocivas ou excessivas que possam inibir a atividade destes microrganismos. Além disso, a codigestão pode resultar em produções de biogás mais elevadas, podendo representar aumentos de 25 % a 400 % sob a mono digestão das mesmas matérias-primas, com uma melhoria na remoção da matéria orgânica [28, 29].

A codigestão do glicerol bruto facilita, portanto, o seu consumo pelos microrganismos, uma vez que podem ser encontrados baixos teores de glicerol nesta matriz, além de elevadas porcentagens de metanol e sabão, como observados por RODRIGUES *et al.* [30] onde foram detectados teores de glicerol, sabão e metanol de 10 %, 23,38 % e 15,84 %, respectivamente, em um glicerol bruto advindo de óleos residuais domésticos. A inviabilidade da purificação do glicerol bruto faz com que estas substâncias permaneçam na fase glicerínica, o que acabam sendo tóxicos para a atividade microbiológica [17, 31, 32]. Sendo assim, a sua codigestão com outros resíduos de matéria orgânica prontamente assimiláveis corresponde a uma alternativa atrativa para a sua utilização e recuperação.

A codigestão do glicerol bruto pode ser feita por meio de biosistemas de dois estágios sequenciais: fermentação para a geração de H_2 seguida de metanogênese para a produção de CH_4 . A produção de biohidrogênio, que corresponde à fase acidogênica no metabolismo dos microrganismos, é sempre acompanhada pela formação de ácidos graxos voláteis, tais como ácido acético, ácido butírico e ácido propiônico além de gerar também álcoois principalmente etanol, butanol e propanol, correspondendo a cerca de 80 % da DQO (Demanda Química de Oxigênio) do meio líquido. Tais ácidos e álcoois podem ser utilizados como substratos apropriados para a produção de CH_4 no segundo estágio do processo de geração de biogás. Assim, a produção de CH_4 , na fase metanogênica, é considerada como uma etapa adequada de pós-tratamento da produção de H_2 , otimizando o consumo da matéria orgânica restante [28, 33].

Diversos resíduos orgânicos de processos industriais podem ser testados na codigestão anaeróbia com consequente geração de biogás como, por exemplo, do processamento de frutas cítricas. O Brasil corresponde ao principal país produtor de cítricos no mundo. Em 2014, a produção total de laranja atingiu 16,9 milhões de toneladas, representando assim 33 % da produção mundial. Dentro dessas estatísticas, o Estado de São Paulo é o mais representativo, com 12,3 milhões de toneladas (73 %) [34]. No mesmo período, a quantidade total de resíduos cítricos gerados no processamento da laranja pelas indústrias brasileiras foi de cerca de 8,4 milhões de toneladas [35]. O processamento de cítricos é baseado principalmente na extração de suco, deixando como resíduos as cascas (60-75 %), membranas segmentadas (30-35 %) e sementes (10 %) que são principalmente compostas por carboidratos altamente fermentáveis, correspondendo a milhões de toneladas geradas anualmente na produção do suco desta fruta. Assim, a disposição desses resíduos em aterros, além de ser dispendiosa, pode aumentar a produção de gás metano, causando graves impactos ambientais [35, 36].

A grande alternativa promissora e lucrativa para estes resíduos consiste na obtenção do etanol de segunda geração (2G) por meio da fermentação de monômeros de carboidratos desta biomassa cítrica. Similar à produção de bioetanol através da cana-de-açúcar, quantidades significativas de vinhaça são geradas do processamento do etanol 2G do resíduo cítrico [35, 36]. A vinhaça cítrica (VC) é caracterizada por seu elevado teor de matéria orgânica e nutrientes sendo um substrato promissor para a geração de H_2 na fermentação [35], podendo servir na codigestão do glicerol bruto.

Dessa forma, a codigestão anaeróbia do glicerol bruto pode ser uma excelente solução integrada para a gestão destes resíduos, gerando bioenergia de uma forma ambientalmente amigável na produção de biogás, H_2 e CH_4 , com a concomitante remoção de resíduos do ambiente [26]. Portanto, para essa configuração, uma variedade de matérias-primas podem ser empregadas, como os resíduos agroindustriais, principalmente os citrícolas, que possuem fontes de carbonos prontamente assimiláveis.

Nesse sentido, o objetivo principal deste estudo consistiu na utilização de glicerol bruto, proveniente da transesterificação de óleo residual doméstico na produção de biodiesel, em reatores biológicos operados em dois estágios sequenciais: fermentativo e metanogênico. Essa matriz foi testada em reatores anaeróbios em batelada na codigestão com resíduos citrícolas da indústria do processamento do bagaço da laranja, a fim de melhorar a produção de biogás e elevar as taxas de remoção de matéria orgânica neles contidas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Glicerol Bruto (GB)

Foi utilizado glicerol bruto proveniente da planta piloto de produção de biodiesel do Instituto de Biotecnologia (Ibiotec) da Uniara, Araraquara – SP. O biodiesel foi produzido por processo de transesterificação a partir de óleos residuais domésticos, metanol e hidróxido de sódio (catalisador). O GB originado foi previamente caracterizado em trabalhos anteriores [17] e utilizado como fonte de carbono na montagem dos reatores anaeróbios em batelada. Ele continha $1.961,0 \text{ g DQO L}^{-1}$, 10,41 % de teor de glicerol livre, 23,38 % de sabão, 15,84 % de metanol, 22,75 % de umidade e materiais voláteis, 5,84 % de água, 3,04 % de cinzas e 34,57 % de MONG (Matéria Orgânica Não Glicerol), além do pH 10,0.

2.2 Vinhaça Citrícola (VC)

A vinhaça citrícola foi proveniente da obtenção do etanol de segunda geração da fermentação de carboidratos da biomassa da indústria citrícola (Matão - SP), contendo $187,55 \text{ g DQO L}^{-1}$; $41,02 \text{ g L}^{-1}$ de glicose; $62,21 \text{ g L}^{-1}$ de frutose; 8,94 % de sólidos totais solúveis (Brix); 6 % de sólidos suspensos e pH 4,07 [35].

2.3 Consórcio anaeróbio produtor de H_2 – 1º Estágio - Fermentação

O consórcio anaeróbio produtor de H_2 foi proveniente do reator UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor) termofílico ($55 \text{ }^\circ\text{C}$) usado no tratamento da vinhaça sucroalcooleira (Pradópolis – Brasil), pré-tratado à quente ($100 \text{ }^\circ\text{C}$, 15 minutos) para a inibição de archaeas metanogênicas e identificado em trabalhos anteriores [17] como pertencente à ordem *Clostridiales* (número de acesso SRX1786831) [19]. Este consórcio foi submetido à reativação 72 h antes da montagem do ensaio fermentativo, no qual as células microbianas cresceram em um meio de cultivo ($0,650 \text{ L}$) em reatores anaeróbios em batelada ($1,00 \text{ L}$) composto de (g L^{-1}): peptona (5,00), extrato de carne (5,00), extrato de levedura (5,00) e glicerina (10,00), pH 5,5, *headspace* preenchido com N_2 (100 %) e mantidos em estufa a $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

2.4 Consórcio anaeróbio produtor de CH_4 – 2º Estágio - Metanogênese

O consórcio anaeróbio produtor de CH_4 foi obtido do lodo granular mesofílico de reator UASB usado no tratamento de resíduos de avicultura (Avícola Dacar – Tietê – SP), sendo utilizado *in natura* e identificado por técnica de biologia molecular, conforme descrito a seguir.

2.5 Biologia Molecular do consórcio anaeróbio produtor de CH_4

O DNA do consórcio anaeróbio produtor de CH_4 foi extraído segundo GRIFFITHS *et al.* [37] com modificações e identificado pela plataforma NGS Illumina MiSeq [38, 19]. As sequências obtidas foram submetidas ao NCBI (National Center for Biotechnology Information - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) pelo número “Sequence Read Archive” (SRA) SRP191566 e número de acesso SAMN11375072 (Archaeal Inoculum used for anaerobic Codigestion of the crude glycerol) e número de acesso do projeto PRJNA531496.

2.6 Operação dos reatores anaeróbios fermentativos – 1º estágio

O ensaio fermentativo para a geração de H_2 (Ensaio 1) foi montado em reatores anaeróbios em batelada ($0,50 \text{ L}$) em duplicata, com o volume de trabalho de $0,40 \text{ L}$ alimentados com (g L^{-1}): peptona (5,00), extrato de carne (5,00) e extrato de levedura (5,00), com $5,00 \text{ g DQO L}^{-1}$ de CG e $5,00 \text{ g DQO L}^{-1}$ de VC, pH 5,50, *headspace* ($0,10 \text{ mL}$) com N_2 (100 %) durante 15 minutos, $0,12 \text{ STV (g L}^{-1})$ de inóculo, a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 112 horas. Ensaio controle (Controle 1) contendo somente glicerol bruto como resíduo ($5,00 \text{ g DQO L}^{-1}$ de CG)

foi montado sob as mesmas condições descritas acima a fim de comparar os resultados com o ensaio de codigestão. Os reatores foram fechados com tampa de butila e rosca plástica.

2.7 Operação dos reatores anaeróbios metanogênicos – 2° estágio

O efluente gerado no ensaio fermentativo foi utilizado como substrato no ensaio metanogênico (Ensaio 2) (Figura 1). A separação do consórcio do 1° estágio do meio líquido ocorreu por meio de centrifugação a 4 °C, a 9000 rpm, durante 10 minutos. O meio líquido (0,20 L), rico em ácidos e álcoois que foram gerados no processo fermentativo, foi utilizado na montagem dos reatores anaeróbios em batelada (0,50 L) no 2° estágio. O pH dos efluentes foi ajustado para 7,00 com adições de NaOH (1M) ou HCl (1 M) e foi adicionado 20 % (v/v) (1,5 g STV L⁻¹) do consórcio metanogênico a 37 °C. O *headspace* foi preenchido com N₂ (100 %) a fim de serem garantidas as condições anaeróbias. O mesmo foi realizado para o efluente gerado no controle fermentativo para a geração de CH₄ (Controle 2). Os reatores foram fechados com tampa de butila e rosca plástica e operados por período de 624 h.

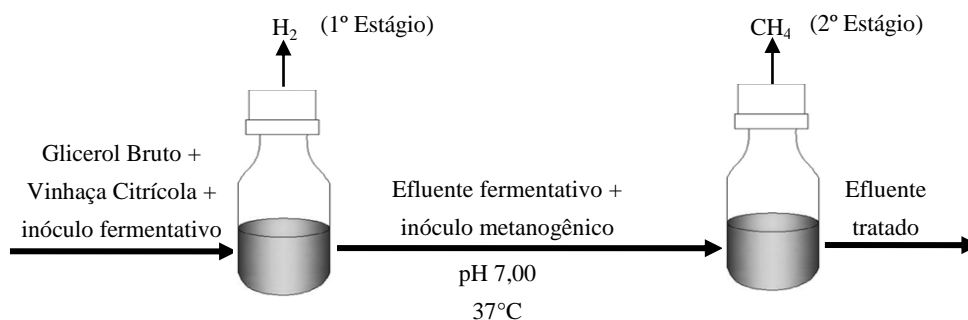


Figura 1: Esquema da montagem dos reatores anaeróbios em batelada em dois estágios sequenciais: Fermentação (H₂) seguida da Metanogênese (CH₄).

2.8 Determinação de biogás

O volume de H₂ e CH₄ produzidos foram quantificados por um sistema de deslocamento de volume adaptado do modelo descrito por AQUINO *et al.* [39]. As medidas de biogás nos reatores foram realizadas a cada 2 horas para os ensaios fermentativos e a cada 24 horas para os ensaios metanogênicos.

2.9 Análises cromatográficas e químicas de compostos orgânicos no meio líquido

Os álcoois e os ácidos graxos voláteis gerados no 1° estágio foram determinados por cromatografia em fase gasosa (CG) com detector por ionização de chama (GC-FID). Anteriormente às análises por CG, a biomassa era separada do meio líquido por centrifugação a 9000 rpm por 10 minutos a 4°C, armazenando-se a fase superior em freezer a -20 °C. Alíquotas de 2,00 mL das amostras foram transferidas para *vials* de 22 mL com 1 g de NaCl (para fornecer o efeito “*salting out*”). Os compostos orgânicos foram mensurados por CG (Shimadzu, Modelo 2010) equipado com amostrador automático de *headspace* (AOC-5000 Plus), injetor split/splitless, detector por ionização de chama e coluna capilar de sílica fundida 30,00 m x 0,32 mm x 3,00 mm (Restek, RTX-1). Anteriormente à injeção, as amostras eram aquecidas a 100 °C e agitadas por 15 minutos. Ambos injetor e detector permaneceram a 250 °C. Hélio foi usado como gás de arraste com taxa de 1,00 mL min⁻¹ (51,6 cm s⁻¹). A temperatura do forno foi programada inicialmente a 45 °C por 1 minuto seguido de uma rampa de 50 °C min⁻¹ até a temperatura final de 250 °C, mantidos por 3 minutos. Os compostos foram quantificados pelo método de calibração externa [40].

O consumo de açúcares foi realizado segundo DUBOIS *et al.* [41]. O consumo de glicerol foi feito pelo método colorimétrico segundo BONDIOLLI e BELLA [42]. A DQO, STV (Sólidos Totais Voláteis) e o pH foram analisados segundo APHA [43].

2.10 Ajuste dos dados experimentais

Os dados experimentais obtidos durante os ensaios foram ajustados para os valores médios obtidos das duplicatas dos reatores em batelada utilizando o software Statistica® (versão 8.0). A taxa máxima de produção de biogás (H₂ e CH₄) foi obtida por ajuste sigmoidal não linear da função Gompertz modificada [44] indicada pela equação 1, onde: P é o potencial de produção de H₂ ou CH₄ (mmol L⁻¹ cultura), R_m é a taxa máxima de

produção de H₂ ou CH₄ (mmol L⁻¹ cultura h), λ é a duração do início de geração de H₂ ou CH₄ (h) de geração de H₂ ou CH₄ e e vale 2,718281828.

$$H = P \times \exp \left\{ - \exp \left[\frac{Rm \times e}{P} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (1)$$

3. RESULTADOS

Os resultados das análises realizadas ao longo dos ensaios nos 1° e 2° estágios estão representados nas Tabelas 1 e 2 e Figuras 2, 3 e 4, bem como os resultados da caracterização filogenética do consórcio anaeróbio produtor de CH₄ (Tabela 3).

Tabela 1: Monitoramento da operação dos reatores anaeróbios – 1° estágio (produção de H₂), a 37 °C.

ANÁLISES	ENSAIO 1	CONTROLE 1
Tempo de operação (h)	112,30	112,30
Consumo de glicerol (%)	93,19	98,01
Consumo de glicose (%)	74,00	-
DQO Inicial (g L ⁻¹)	22,12	9,87
DQO Final (g L ⁻¹)	21,19	9,60
pH Inicial	5,50	5,50
pH Final	5,55	5,74
Ácido acético (mg L ⁻¹)	418,00	166,00
Ácido butírico (mg L ⁻¹)	90,00	77,00
Ácido propiônico (mg L ⁻¹)	71,00	56,00
P (mmol H ₂ L ⁻¹)	4,48	-
Rm (mmol h ⁻¹)	0,78	-
λ (h)	13,43	-
R ²	0,99	-
mol H ₂ mol ⁻¹ glicerol _{consumido}	1,46	-
mmol H ₂ g ⁻¹ DQO _{consumido}	0,20	-

Tabela 2: Monitoramento da operação dos reatores anaeróbios – 2° estágio (produção de CH₄), a 37 °C.

ANÁLISES	ENSAIO 2	CONTROLE 2
Tempo de operação (h)	624,00	624,00
Consumo de glicerol remanescente (%)	88,36	64,18
Consumo de glicose remanescente (%)	83,13	-
Consumo de DQO (%)	87,34	88,85
pH Inicial	7,00	7,00
pH Final	8,30	8,03
Consumo metanol (%)	93,75	80,00
P (mmol CH ₄ L ⁻¹)	229,08	40,58
mmol CH ₄ g ⁻¹ DQO _{consumido}	11,79	2,09

Os gráficos ilustrados pela Figura 2 representam os ensaios realizados no 1° estágio, tanto para o Ensaio 1 quanto para o seu respectivo controle, em relação à concentração de H₂ produzido com os concomitantes consumos de glicerol e/ou carboidratos totais advindos da vinhaça citrícola. Assim, para o Ensaio 1, hou-

ve a geração de H₂ acompanhada da remoção de glicerol e carboidratos totais. Já o Controle 1, montado apenas na concentração de glicerol bruto, foi verificado o seu consumo, na ausência de H₂.

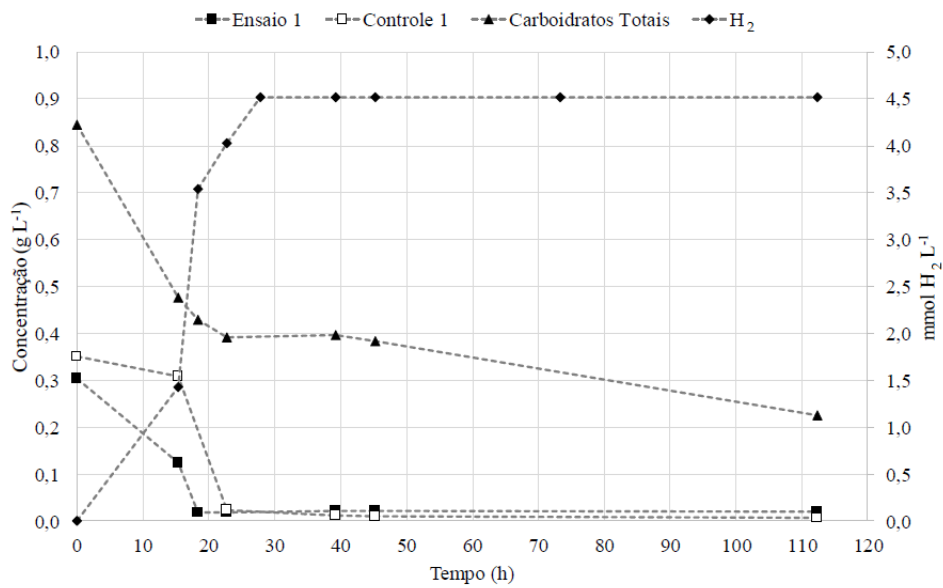


Figura 2: Consumos de carboidratos totais e glicerol com a consequente geração de H₂ para o Ensaio 1 e Controle 1 durante a operação dos reatores anaeróbios fermentativos no 1º estágio.

A Figura 3 ilustra o acompanhamento da geração de CH₄, 2º estágio, ao longo do Ensaio 2 bem como o do seu respectivo controle (Controle 2). Os valores das remoções de glicerol e carboidratos remanescentes do 1º estágio foram apenas iniciais e finais, assim, estão indicados na Tabela 2.

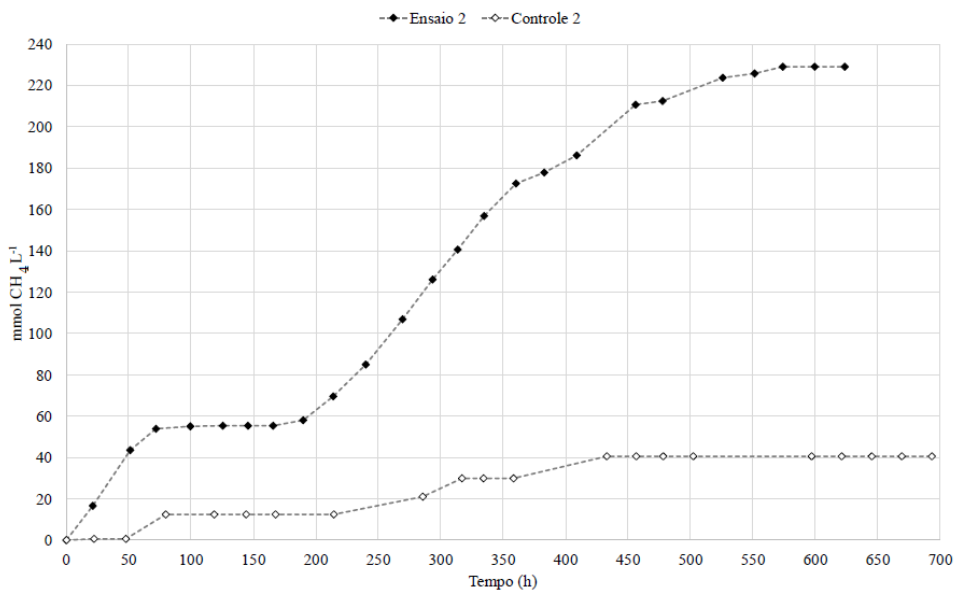


Figura 3: Geração de CH₄ no 2º estágio para o Ensaio 2 e seu respectivo Controle 2.

A concentração dos coprodutos produzidos ao final do Ensaio 1 está indicada na Figura 4, com a geração dos ácidos acético, propiônico, isobutírico, butírico, valérico e capríco. O metanol presente refere-se à

concentração deste álcool advinda do próprio glicerol bruto. Já para o Ensaio 2, houve o consumo destes ácidos e do metanol, onde é possível observar a redução significativa da concentração dos mesmos.

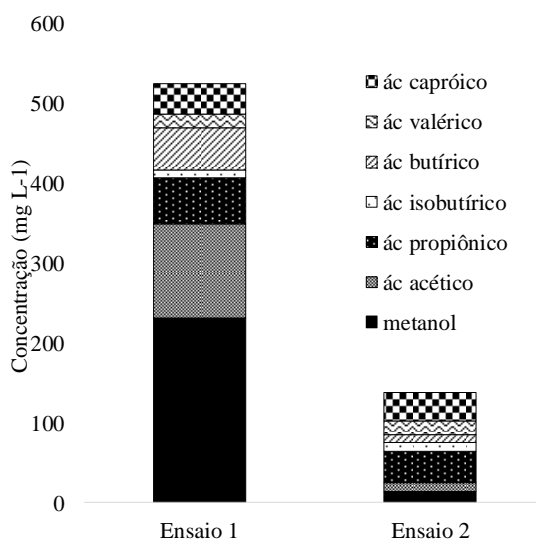


Figura 4: Co-produtos secundários quantificados ao final da operação nos reatores anaeróbios: fermentativos (Ensaio 1 – 1º estágio) e metanogênicos (Ensaio 2 – 2º estágio).

Na caracterização filogenética do consórcio metanogênico (Tabela 3) foi verificada abundância relativa dos Reinos *Bacteria* e *Archaea* de 92,20 % e 7,78 %, respectivamente. Em termos de bactérias presentes neste consórcio, os filos dominantes foram *Firmicutes* (35,40 %), *Proteobacteria* (15,25 %), *Bacteroidetes* (13,68 %) e *Synergistetes* (11,72 %). Entre as archaeas, o filo dominante foi *Euryarchaeota* (7,46 %). Foram encontradas as classes de bactérias *Clostridia* (33,14 %), *Synergistia* (11,72 %) e *Bacteroidia* (10,94 %). A classe de archaeas foi determinada pela *Methanomicrobia* (6,64 %). As ordens contidas no reino *Bacteria* foram *Clostridiales* (29,04 %), *Synergistales* (11,71 %), *Bacteroidales* (10,28 %) e *Pseudomonadales* (4,12 %). Em relação às archaeas foram encontradas as ordens *Methanosarcinales* (3,43 %) e *Methanomicrobiales* (3,21 %). As famílias *Synergistaceae* (11,71 %), *Porphyromonadaceae* (6,06 %), *Ruminococcaceae* (5,41 %), *Pseudomonadaceae* (3,97 %), *Clostridiaceae_1* (1,89 %) e *Peptostreptococcaceae* (1,86 %) estão contidas nas bactérias, enquanto que *Methanoregulaceae* (2,84 %), *Methanosaetaceae* (2,02 %) e *Methanosarcinaceae* (1,40 %) estão contidas nas archaeas. Os gêneros encontrados para as bactérias foram *Aminobacterium* (6,42 %), *Fastidiosipila* (3,38 %), *Pseudomonas* (2,12 %) e *Thiopseudomonas* (1,84 %), e para as archaeas foram *Methanolinea* (2,15 %), *Methanosaeta* (2,02 %) e *Methanosarcina* (1,37 %). Finalmente, as espécies com maiores abundâncias relativas foram *Methanosarcina_mazei* (1,37 %) para as archaeas e *Pseudomonas_sp._M-08* (1,84 %) e *Pseudomonas_caeni* (1,17 %) para as bactérias.

Tabela 3: Caracterização filogenética e abundância relativa do consórcio metanogênico no Ensaio 2.

DOMÍNIO	NOME	ABUNDÂNCIA RELATIVA (%)
Reino	<i>Archaea</i>	7,78
	<i>Bacteria</i>	92,20
Filo	<i>Firmicutes</i>	35,40
	<i>Proteobacteria</i>	15,25
	<i>Bacteroidetes</i>	13,68
	<i>Synergistetes</i>	11,72
	<i>Euryarchaeota</i>	7,46
	Classe	<i>Clostridia</i>
<i>Synergistia</i>		11,72
<i>Bacteroidia</i>		10,94
<i>Methanomicrobia</i>		6,64
Ordem	<i>Clostridiales</i>	29,04
	<i>Synergistales</i>	11,71
	<i>Bacteroidales</i>	10,28
	<i>Pseudomonadales</i>	4,12
	<i>Methanosarcinales</i>	3,43
	<i>Methanomicrobiales</i>	3,21
Família	<i>Synergistaceae</i>	11,71
	<i>Porphyromonadaceae</i>	6,06
	<i>Ruminococcaceae</i>	5,41
	<i>Pseudomonadaceae</i>	3,97
	<i>Methanoregulaceae</i>	2,84
	<i>Methanosaetaceae</i>	2,02
	<i>Clostridiaceae_1</i>	1,89
	<i>Peptostreptococcaceae</i>	1,86
	<i>Methanosarcinaceae</i>	1,40
Gênero	<i>Aminobacterium</i>	6,42
	<i>Fastidiosipila</i>	3,38
	<i>Methanolinea</i>	2,15
	<i>Pseudomonas</i>	2,12
	<i>Methanosaeta</i>	2,02
	<i>Thiopseudomonas</i>	1,84
Espécie	<i>Methanosarcina</i>	1,37
	<i>Pseudomonas_sp._M-08</i>	1,84
	<i>Methanosarcina_mazei</i>	1,37
	<i>Pseudomonas_caeni</i>	1,17

4. DISCUSSÃO

4.1 Ensaio 1° estágio – geração de H₂

Os valores de DQO foram mantidos, tanto para o Ensaio 1 como para seu respectivo controle (DQO inicial Ensaio 1 = 22,12 g L⁻¹; DQO final Ensaio 1 = 21,19 g L⁻¹; DQO inicial Controle 1 = 9,87 g L⁻¹; DQO final Controle 1 = 9,60 g L⁻¹) (Tabela 1), confirmando o metabolismo do glicerol na presença de bactérias fermentativas (*Clostridium* sp.). Essa evidência comprovou a transformação do substrato inicial em compostos or-

gânicos voláteis, como por exemplo os ácidos acético e butírico, que permaneceram na fase líquida causando a manutenção dos valores de DQO ao longo dos ensaios [19], conforme apresentado pelas equações 2 e 3, respectivamente [17].



A produção de H_2 no Ensaio 1 pode ser justificada pela concentração de ácido acético formada. Sendo assim, concentrações elevadas desse ácido apresentaram um rendimento maior da geração de biogás devido à estequiometria da reação apresentada pela Equação 2.

Estudos reportaram que os processos de codigestão do glicerol bruto com outros resíduos tais como esgoto sanitário e estrume de porco, por exemplo, foram usados como estratégia para o aumento da geração de biogás [28, 45]. Assim, o Ensaio 1 gerou 4,48 mmol $H_2 L^{-1}$ (Tabela 1 e Figura 2), diferentemente do seu controle onde não foi constatada a produção de H_2 sendo possível inferir que a codigestão favoreceu a geração deste biogás.

Para o Ensaio 1 envolvendo a codigestão, destacou-se o consumo elevado dos substratos glicerol e glicose (proveniente da vinhaça citrícola) (Tabela 1 e Figura 2). Observou-se que a concentração de glicerol consumido (93,19 %) foi superior ao consumo de glicose (74,00 %), já que, previamente aos ensaios, o inóculo foi reativado em meio de cultivo sintético contendo glicerina, condicionando assim os microrganismos ao substrato, facilitando o consumo da glicose proveniente da vinhaça.

4.2 Ensaios 2° estágio – geração de CH_4

Os efluentes gerados após o 1° estágio (fermentação) foram usados como substratos para os ensaios metanogênicos do 2° estágio. Além disso, os substratos remanescentes do 1° estágio (glicerol e glicose) foram ainda mais consumidos no Ensaio 2 pelos microrganismos presentes no consórcio metanogênico (88,36 % e 83,13 % de glicerol e glicose, respectivamente). Entretanto, o consumo do glicerol remanescente no Controle 2 foi menor (64,18 %), indicando novamente que a codigestão facilitou o consumo do glicerol quando comparados ao seu respectivo controle.

A montagem de reatores em fases sequenciais foi vantajosa quando comparada a um processo único, pois permitiu a geração de biogás, tanto H_2 quanto CH_4 , ao mesmo tempo em que produziu efluentes com valores de DQO reduzidos, levando a menores custos para processos de pós-tratamento [46]. Remoção significativa de DQO no Ensaio 2 (87,34 %) e Controle 2 (88,85 %) foi verificada (Tabela 2). Assim, no 1° estágio, a DQO foi mantida devido ao processo de fermentação com gerações de ácidos orgânicos e álcoois e, no 2° estágio, ocorreu o seu consumo, ou seja, a remoção da matéria orgânica na forma de carbono da fase líquida para a fase gasosa com a geração de CH_4 .

Embora a alimentação do Ensaio 2 contivesse predomínio de ácidos e álcoois ainda foi detectado glicerol, conforme descrito anteriormente. Provavelmente, bactérias anaeróbias presentes no inóculo *in natura* representadas pelos filos *Firmicutes*, *Bacteroidetes* e *Sinergistes* (Tabela 3) foram responsáveis pelos consumos de glicerol e parte dos ácidos orgânicos voláteis provenientes do Ensaio 1 (Figura 4). Além disso, provavelmente, ácidos orgânicos voláteis como ácido acético gerado no Ensaio 1 foi consumido como substrato no Ensaio 2 por consórcio entre bactérias anaeróbias e archaeas; principalmente por archaeas metanogênicas acetoclásticas. Segundo KURADE *et al.* [47], a metanogênese acetoclástica é considerada como a principal rota pelo qual o CH_4 é produzido. Somente dois gêneros de archaeas metanogênicas, *Methanosaeta* e o *Methanosarcina* são conhecidos por realizar a metanogênese acetoclástica. Além disso, tais microrganismos foram encontrados no consórcio metanogênico (Tabela 3) apresentando 26 % de abundância relativa de *Methanosaeta* dentro do filo das archaeas (o que representou 2,02 % da população microbiana total) e 18 % de abundância relativa de *Methanosarcina* (1,37 % da população microbiana total). Archaeas pertencentes ao gênero *Methanosaeta* são consumidoras obrigatórias de acetato; entretanto, as do gênero *Methanosarcina* são reconhecidas como sendo mais versáteis, pois podem converter diferentes substratos à CH_4 , tais como acetatos, metanol, H_2 e substâncias contendo grupos metil [47]. O gênero *Methanolinea* também foi encontrado, em abundância relativa de 28 % dentro das archaeas, representando 2,15 % comparado à população microbiana total (Tabela 3). Este gênero está contido na ordem *Methanomicrobiales* que corresponde aos microrganismos hidrogenotróficos, no qual há a preferência pelo consumo do H_2 para a formação de CH_4 .

O metanol representa umas das principais impurezas presentes no glicerol bruto, de difícil consumo pelos microrganismos, podendo ser tóxico para as atividades microbiológicas além de apresentar riscos ambientais quando descartado de forma inadequada [19]. Consumos elevados de metanol foram verificados tanto no Ensaio 2 (93,75 %) como no Controle 2 (80,00 %) (Tabela 2). Logo, a montagem de reatores em dois estágios permitiu o consumo do metanol do efluente dos reatores fermentativos (1º estágio), originando um efluente livre deste composto tóxico (2º Estágio).

A geração de CH_4 foi elevada para o Ensaio 2 (229,08 $\text{mmol CH}_4 \text{ L}^{-1}$) em relação ao seu respectivo controle (40,58 $\text{mmol CH}_4 \text{ L}^{-1}$) (Figura 3). Vale ressaltar que o processo de codigestão novamente melhorou a produção do biogás. De acordo com SILVA *et al.* [33], os processos anaeróbios em dois estágios são identificados portanto como métodos promissores, tendo em vista a redução da carga orgânica e aumentam a eficiência geral de conversão de energia pela geração de CH_4 , em elevadas concentrações.

NATHAO [48] reportou que a digestão anaeróbia usando somente o glicerol como única fonte de carbono proporcionou baixa produção acumulada de CH_4 de 72,90 mL (11,46 $\text{mmol CH}_4 \text{ L}^{-1}$) quando comparado com o ensaio de codigestão envolvendo glicerol e casca de banana, ocasionando um aumento significativo da produção de biogás para 467,10 mL (73,44 $\text{mmol CH}_4 \text{ L}^{-1}$). SAWASDEE *et al.* [49] analisou a produção de biogás envolvendo a codigestão do glicerol bruto e glicose comparada com um controle contendo somente glicerol. Os experimentos realizados em batelada mostraram que o controle gerou apenas 63,79 mL de CH_4 (10,03 $\text{mmol CH}_4 \text{ L}^{-1}$) enquanto a codigestão proporcionou uma elevada produção acumulada de CH_4 de 298,20 mL CH_4 (46,90 $\text{mmol CH}_4 \text{ L}^{-1}$). De acordo com os autores, a glicose impulsionou a produção de gás metano na codigestão de glicerol/glicose, servindo como substrato doador de hidrogênio para fornecer tanto equivalentes redutores como ATP para a célula microbiana, como é diretamente induzido na glicólise como glicose 6-fosfato e, finalmente, convertido em CH_4 .

O pH no final da operação dos reatores do Ensaio 2 e Controle 2 foram próximos de 8,00, quando comparados ao início dos ensaios (pH 7,00) (Tabela 2). Segundo BABA *et al.* [50], quando ácidos graxos voláteis são consumidos, ocorre o aumento do pH devido à baixa disponibilidade de íons H^+ , conforme verificado no presente estudo.

5. CONCLUSÕES

A codigestão no ensaio fermentativo favoreceu a geração de H_2 , diferentemente do que foi observado no ensaio Controle 1.

A produção de H_2 no Ensaio 1 (máximo de 4,48 $\text{mmol H}_2 \text{ L}^{-1}$) foi verificada na rota metabólica dos principais produtos secundários gerados em processos fermentativos de degradação de glicerol, como os ácidos acético e butírico.

A utilização do efluente fermentativo, rico em ácidos e álcoois, em reatores metanogênicos em sistemas integrados, permitiu um aproveitamento energético do glicerol bruto, reduzindo 87,34 % da DQO. Além disso, 93,75 % do metanol, principal contaminante contido no glicerol bruto, foi consumido de forma expressiva no biossistema integrado.

A reutilização do glicerol bruto codigerido em vinhaça citrícola por processos de digestão anaeróbia torna a produção de biodiesel sustentável, com geração de biocombustíveis tais como biogás H_2 e CH_4 .

6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processos FAPESP 2012 / 01318-01, 2017 / 11767-1 e 2017 / 25329-6), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) pela bolsa concedida, Projetos Universal (407298 / 2018-5 e 457144 / 2014-9) e ao CEMPEQC – Centro de Monitoramento e Pesquisa da Qualidade de Combustíveis, Biocombustíveis, Petróleo e Derivados (IQ/UNESP) por apoiar as análises cromatográficas.

7. BIBLIOGRAFIA

[1] GUABIROBA, R.C.S., SILVA, R.M., CÉSAR, A.S., *et al.*, "Value chain analysis of waste cooking oil for biodiesel production : Study case of one oil collection company in Rio de Janeiro - Brazil", *Journal of Cleaner Production*, v. 142, pp. 3928-3937, Jan. 2017.

[2] CÉSAR, A.S., CONEJERO, M.A., RIBEIRO, E.C.B., *et al.*, "Competitiveness analysis of "social soybeans" in biodiesel production in Brazil", *Renewable Energy*, v. 133, pp. 1147-1157, Abril 2019.

- [3] ANP, <http://www.anp.gov.br/biocombustiveis/biodiesel>, acessado em janeiro de 2020.
- [4] DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO, <http://www.in.gov.br/web/dou/-/despacho-n-621-de-6-de-agosto-de-2019-209274983>, acessado em janeiro de 2020.
- [5] QUAH, R.V., TAN, Y.H., MUBARAK, N.M., *et al.*, "An overview of biodiesel production using recyclable biomass and non- biomass derived magnetic catalysts", *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 7, n. 4, pp. 103219, Agosto 2019.
- [6] ANP, "Evolução da produção de biodiesel (B100) – 2008-2017", [http://www.anp.gov.br/publicacoes/anuario-estatistico/anuario-estatistico-2018#Seção 1](http://www.anp.gov.br/publicacoes/anuario-estatistico/anuario-estatistico-2018#Seção%201), acessado em fevereiro de 2010.
- [7] ABIOVE, "Abiove comemora aumento da mistura do biodiesel no diesel em 2020", <https://www.canalrural.com.br/noticias/abiove-mistura-biodiesel-2020/>, acessado em fevereiro de 2020.
- [8] SARMA, S.J., BRAR, S.K., SYDNEY, E.B., *et al.*, "Microbial hydrogen production by bioconversion of crude glycerol: A review", *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 37, n. 8, pp.6473-6490, Abril 2012.
- [9] GUPTA, A.R., YADAV, S.V., RATHOD, V.K., "Enhancement in biodiesel production using waste cooking oil and calcium diglyceroxide as a heterogeneous catalyst in presence of ultrasound", *Fuel*, v. 158, pp. 800-806, Out. 2015.
- [10] PROGRAMA DE RECICLAGEM DE ÓLEO DE FRITURA DA SABESP., http://site.sabesp.com.br/uploads/file/asabesp_doctos/programa_reciclagem_oleo_completo.pdf, acessado em janeiro de 2020.
- [11] CEMPRE - Compromisso Empresarial para Reciclagem. Preço dos Materiais Recicláveis, <http://cempre.org.br/cempre-informa/id/105/preco-dos-materiais-reciclaveis>, acessado em março de 2019.
- [12] ABIOVE- Arquivo com Estatística Mensal. Estatística Mensal do Complexo Soja, <http://www.abiove.org.br/site/index.php?page=estatistica&area=NC0yLTE=>, acessado em janeiro de 2019.
- [13] Alta do preço de óleo de soja gera impactos para empresas e empreendedores. G1 2020. <https://g1.globo.com/sp/mogi-das-cruzes-suzano/noticia/2020/09/15/alta-do-preco-de-oleo-de-soja-gera-impactos-para-empresas-e-empresendedores.ghtml>.
- [14] CÉSAR, A.S., WERDERITS, D.E., SARAIVA, G.L.O., *et al.*, "The potential of waste cooking oil as supply for the Brazilian biodiesel chain", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 72, pp. 246–253, Maio 2017.
- [15] ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ÓLEOS VEGETAIS, <http://www.abiove.org.br/site/index.php?page=estatistica&area=NC0yLTE=>, acessado em fevereiro de 2020.
- [16] ASSOCIAÇÃO DE PRODUTORES DE BIODIESEL DO BRASIL, <https://aprobio.com.br/2017/01/10/brasil-recicla-30-milhoes-de-litros-de-oleo-de-cozinha-na-producao-de-biodiesel/>, acessado em janeiro de 2020.
- [17] RODRIGUES, C.V., SANTANA, K.O., NESPECA, M.G., *et al.* "Crude glycerol by transesterification process from used cooking oils: Characterization and potentialities on hydrogen bioproduction", *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 41, pp. 14641–51, 2016.
- [18] RODRIGUES, C.V. "Produção biotecnológica de hidrogênio a partir do glicerol, bioproduto da produção do biodiesel" Dissertação de Mestrado, UNESP, Araraquara-SP, Brasil, 2016.
- [19] RODRIGUES, C.V., NESPECA, M.G., SAKAMOTO, I.K., *et al.*, "Bioconversion of crude glycerol from waste cooking oils into hydrogen by sub-tropical mixed and pure cultures", *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 44, n. 1, pp. 144-154, Jan. 2019.
- [20] HEJNA, A., KOSMELA, P., FORMELA, K., *et al.*, "Potential applications of crude glycerol in polymer technology – Current state and perspectives", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 66, pp. 449-475, Dez. 2016.
- [21] CHOL, C.G., DHABHAI, R., DALAI, A.K., *et al.* "Purification of crude glycerol derived from biodiesel production process: Experimental studies and techno-economic analyses", *Fuel Process Technology*, v. 178, pp. 78–87, 2018.
- [22] LUO, X., GE, X., CUI, S., *et al.* "Value-added processing of crude glycerol into chemicals and polymers", *Bioresource Technology*, v. 215, pp. 144–54, 2016.
- [23] SETA, K., SUZUKI, T., KIYOSHI, K., *et al.*, "Potential use of methane fermentation digested slurry as a low-cost, environmentally-friendly nutrient for bioethanol production from crude glycerol by *Klebsiella variicola* TB-83D", *New Biotechnology*, v. 44, pp. 1-5, Setem. 2018.
- [24] Rodrigues, C.V., ALCARAZ, F.A.R., NESPECA, M.G., *et al.* "Biohydrogen production in an integrated

- biosystem using crude glycerol from waste cooking oils", *Renewable Energy*, v. 162, pp. 701–11, 2020.
- [25] SILVA, F.M.S., OLIVEIRA, L.B., MAHLER, C.F., *et al.*, "Hydrogen production through anaerobic co-digestion of food waste and crude glycerol at mesophilic conditions", *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 42, n. 36, pp. 22720–22729, Setem. 2017.
- [26] MARAGKAKI, A.E., FOUNTOULAKIS, M., GYPAKIS, A., *et al.*, "Pilot-scale anaerobic co-digestion of sewage sludge with agro-industrial by-products for increased biogas production of existing digesters at wastewater treatment plants", *Waste Management*, v. 59, pp. 362–370, Jan. 2017.
- [27] KURAHASHI, K., KIMURA, C., FUJIMOTO, Y., *et al.*, "Value-adding conversion and volume reduction of sewage sludge by anaerobic co-digestion with crude glycerol", *Bioresource Technology*, v. 232, pp. 119–125, Maio 2017.
- [28] KANCHANASUTA, S., SILLAPARASSAMEE, O., "Enhancement of hydrogen and methane production from co-digestion of palm oil decanter cake and crude glycerol using two stage thermophilic and mesophilic fermentation", *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 42, n. 5, pp. 3440–3446, Fev. 2012.
- [29] RAZAVIARANI, V., BUCHANAN, I.D., "Bioresource Technology Anaerobic co-digestion of biodiesel waste glycerin with municipal wastewater sludge: Microbial community structure dynamics and reactor performance", *Bioresource Technology*, v. 182, pp. 8–17, Abril 2015.
- [30] RODRIGUES, C.V., SANTANA, K.O., NESPECA, M.G., *et al.* "Energy valorization of crude glycerol and sanitary sewage in hydrogen generation by biological processes", *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 45, pp. 11943–53, 2020.
- [31] SELEMBO, P.A., PEREZ, J.M., LLOYD, W.A., *et al.*, "Enhanced Hydrogen and 1,3-Propanediol Production From Glycerol by Fermentation Using Mixed Cultures", *Biotechnology and Bioengineering*, v. 104, n. 6, pp. 1098–106, Dez. 2009.
- [32] SARMA, S.J., BRAR, S.K., LE BIHAN, Y., *et al.*, "Bio-hydrogen production by biodiesel-derived crude glycerol bioconversion: a techno-economic evaluation", *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 36, pp. 1–10, 2013.
- [33] SILVA, F.M.S., MAHLER, C.F., OLIVEIRA, L.B., *et al.*, "Hydrogen and methane production in a two-stage anaerobic digestion system by co-digestion of food waste, sewage sludge and glycerol", *Waste Management*, v. 76, pp. 339–349, Jun. 2018.
- [34] PACHIEGA, R., RODRIGUES, M.F., RODRIGUES, C.V., *et al.*, "Hydrogen bioproduction with anaerobic bacteria consortium from brewery wastewater", *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 44, n. 1, pp. 155–163, Jan. 2019.
- [35] TORQUATO, L.D.M., PACHIEGA, R., CRESPI, M.S., *et al.*, "Potential of biohydrogen production from effluents of citrus processing industry using anaerobic bacteria from sewage sludge", *Waste Management*, v. 59, pp. 181–193, Jan. 2017.
- [36] AWAN, A.T., TSUKAMOTO, J., TASIC, L., "Orange waste as a biomass for 2G-ethanol production using low cost enzymes and co-culture fermentation", *RSC Advances*, v. 3, pp. 25071–25078, 2013.
- [37] GRIFFITHS, R.I., WHITELEY, A.S., O'DONNELL, A.G., *et al.*, "Rapid Method for Coextraction of DNA and RNA from Natural Environments for Analysis of Ribosomal DNA- and rRNA-Based Microbial Community Composition", *Applied Environmental Microbiology*, v. 66, n. 12, pp. 5488–5491, Dez. 2000.
- [38] SI, B., LI, J., LI, B., *et al.*, "The role of hydraulic retention time on controlling methanogenesis and homoacetogenesis in biohydrogen production using upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor and packed bed reactor (PBR)", *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 40, n. 35, pp. 11414–11421, Setem. 2015.
- [39] AQUINO, S.F., CHERNICHARO, C.A.L., FORESTI, E., *et al.*, "Metodologias para a Determinação da Atividade Metanogênica Específica (AME) em Lodos Anaeróbios", *Engenharia Sanitária Ambiental*, v. 12, n. 12, pp. 192–201, Abr./Jun. 2007.
- [40] NESPECA, M.G., RODRIGUES, C.V., SANTANA, K.O., *et al.*, "Determination of alcohols and volatile organic acids in anaerobic bioreactors for H₂ production by near infrared spectroscopy", *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 42, n. 32, pp. 20480–20493, Agosto 2017.
- [41] DUBOIS, M., GRILLES, K.A., HAMILTON, J.K., *et al.*, "Colorimetric method for determination of sugars and related substances", *Analytical Chemistry*, v. 28, pp. 350–356, 1956.
- [42] BONDIOLI, P., BELLA, L. D., "An alternative spectrophotometric method for the determination of free glycerol in biodiesel", *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 107, pp. 153–157, 2005.

- [43] APHA AWWA WEF, "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater: American Public Health Association", Water Environment Federation, 2005.
- [44] LAY, J.-J., LI, Y.-Y., NOIKE, T., "Developments of Bacterial Population and Methanogenic Activity in a Laboratory-Scale Landfill Bioreactor", *Water Research*, v. 32, n. 12, pp. 3673–3679, Mar. 1998.
- [45] RIVERO, M., SOLERA, R., PEREZ, M., "Anaerobic mesophilic co-digestion of sewage sludge with glycerol: Enhanced biohydrogen production", *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 39, n. 6, pp. 2481–2488, Fev. 2014.
- [46] TANGKATHITIPONG, P., INTANOO, P., BUTPAN, J., *et al.*, "Separate production of hydrogen and methane from biodiesel wastewater with added glycerin by two-stage anaerobic sequencing batch reactors (ASBR)", *Renewable Energy*, v. 113, pp. 1077–10785, Dez. 2017.
- [47] KURADE, M.B., SAHA, S., SALAMA, E.-S., *et al.*, "Acetoclastic methanogenesis led by Methanosarcina in anaerobic co-digestion of fats, oil and grease for enhanced production of methane", *Bioresource Technology*, v. 272, pp. 351–359, Jan. 2019.
- [48] NATHAO, C., "Biological hydrogen and methane production from food waste two stage", *King Mongkut's Univ Technol North Bangkok*, pp. 147, 2012.
- [49] SAWASDEE, V., HAOSAGUL, S., PISUTPAISAL, N., "Co-digestion of waste glycerol and glucose to enhance biogas production", *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 44, n. 56, pp. 29575-29582, Novem. 2019.
- [50] BABA, Y., TADA, C., WATANABE, R., *et al.*, "Anaerobic digestion of crude glycerol from biodiesel manufacturing using a large-scale pilot plant: Methane production and application of digested sludge as fertilizer", *Bioresource Technology*, v. 140, pp. 342–348, Jul. 2013.

ORCID

Caroline Varella Rodrigues	https://orcid.org/0000-0003-2012-6711
Luan Vieira Adames	https://orcid.org/0000-0002-3912-687X
Rodrigo Fernando Costa Marques	https://orcid.org/0000-0003-0195-3885
Ana Paula Jacobus	https://orcid.org/0000-0002-9092-931X
Lorena Oliveira Pires	https://orcid.org/0000-0002-1447-259X
Sandra Imaculada Maintinguer	https://orcid.org/0000-0002-4584-7649