

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ANÁLISE INSTRUMENTAL

THOMPSON RICARDO WEISER MEIER

**AVALIAÇÃO NO TEOR DE HIDROGÊNIO NO BIOGÁS PRODUZIDO A PARTIR DE  
MANIPUEIRA COM ADIÇÃO DE GLICEROL RESIDUAL POR BIODIGESTÃO  
ANAERÒBICA**

TOLEDO

2019

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ANÁLISE INSTRUMENTAL

Trabalho apresentado ao Programa de Pós Graduação em Análise Instrumental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Especialista.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Cintra Maniglia.

TOLEDO

2019

**TERMO DE APROVAÇÃO**

**MONOGRAFIA**

THOMPSON RICARDO WEISER MEIER

**AVALIAÇÃO NO TEOR DE HIDROGÊNIO NO BIOGÁS PRODUZIDO A PARTIR DE  
MANIPUEIRA COM ADIÇÃO DE GLICEROL RESIDUAL POR BIODIGESTÃO  
ANAERÒBICA**

Monografia apresentada como forma de avaliação para o curso de Análise Instrumental da UTFPR campus Toledo, e aprovado em 30 de maio de 2019 pela banca examinadora abaixo.

---

Dr. Thiago Cintra Maniglia

Orientador – UTFPR

---

Dr. Fabiano Bisinella Scheufele

UTFPR

---

Dr. Priscila Vaz de Arruda

UTFPR

Toledo, 10 de Junho de 2019

A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Programa de Pós Graduação em Análise Instrumental

## RESUMO

Nos últimos anos a produção de biocombustíveis líquidos e gasosos, dentre os quais o biogás, uma mistura de metano e hidrogênio, vêm aumentando significativamente em função do aumento da demanda energética, além da crescente necessidade de tratamento dos resíduos agroindustriais. O presente estudo teve como objetivo a avaliar produção e composição de biogás por cromatografia gasosa, realizar a caracterização dos substratos utilizados, manipueira e glicerol, por método espectrofotométrico UV-VIS, e caracterização microbiológica do inóculo, através do isolamento dos microorganismos, extração do DNA, PCR, eletroforese e sequenciamento genético. Foram encontrados quatro diferentes microorganismos anaeróbios no inóculo, três pertencentes ao Gênero *Bacillus* e uma ao Gênero *Brevundimonas*. A utilização do glicerol como aditivo a manipueira se mostrou viável, uma vez que nos tratamentos que continham esse substrato foram obtidos volumes de hidrogênio muito superiores em relação ao tratamento que continha apenas manipueira. Foi proposto um modelo de segundo grau para descrever a produção de hidrogênio pelo processo de biodigestão, o modelo descreveu de forma adequado os dados experimentais, apresentando valor de  $R^2$  de 0,98. A partir do modelo, foi estimado o volume máximo de Hidrogênio de 1063,4 mL, com a adição de 3,38% (v/v) de Glicerol. Desta forma, a adição de glicerol a manipueira para a processo de biodigestão anaeróbia se mostrou viável, uma vez que foram obtidos incrementos na produção de biogás da ordem de 4 vezes quando comparado ao tratamento sem este aditivo.

Palavras Chave: Biogás, hidrogênio, glicerol.

## ABSTRACT

In recent years the production of liquid and gaseous biofuels, biogas, a mixture of methane and hydrogen, have been increasing significantly as a function of increased energy demand, in addition to the growing need for treatment of waste agribusiness. The present study aimed to evaluate the production and composition of biogas by gas chromatography, perform characterization of substrates used, manipueira and glycerol, by UV-VIS Spectrophotometric method, and microbiological characterization of inoculum, through the isolation of microorganisms, DNA extraction, PCR, electrophoresis and genetic sequencing. Four different anaerobic microorganisms were found in the inoculum, three belonging to the Genus *Bacillus* and a one to the genus *Brevundimonas*. The use of glycerol as additive the manipueira proved to be feasible, since the treatments containing this substrate were obtained hydrogen volumes far superior compared to the treatment that contained only manipueira. A second model was proposed to describe the production of hydrogen by biodigestion process, the model described how suitable experimental data, showing value of R<sup>2</sup> of 0.98. From the model, it was estimated the maximum volume of hydrogen 1063.4 mL, with the addition of 3.38% (v/v) glycerol. In this way, the addition of glycerol to manipueira for the anaerobic biodigestion process proved to be viable, since they were obtained in increments biogas production to the tune of 4 times when compared to treatment without this additive.

Keywords: Biogas, hydrogen, glycerol.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Etapas do processo de biodigestão anaeróbia.....	13
Figura 2 - Esquema construtivo dos biodigestores e gasômetros.....	20
Figura 3 - Etapas para desenvolvimento do estudo de produção de biogás.....	23
Figura 4 - Biodigestor conectado ao gasômetro.....	23
Figura 5 - Curva de calibração espectrofotométrica UV-VIS para DQO.....	24
Figura 6 - Curva de calibração para o Hidrogênio.....	26
Figura 7 - Curva de calibração para o Nitrogênio.....	26
Figura 8 - Curva de Calibração para o Metano.....	26
Figura 9 - Curva de Calibração para o Dióxido de Carbono.....	27
Figura 10 - Cromatograma de Biogás.....	27
Figura 11 - Composição do biogás produzido na biodigestão anaeróbia.....	28
Figura 12 - Produção de Hidrogênio.....	29

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	7
2. OBJETIVOS .....	8
2.1. Objetivo geral .....	8
2.2. Objetivos específicos .....	8
3. JUSTIFICATIVA .....	9
4. REFERENCIAL TEÓRICO .....	10
4.1. Cenário energético .....	10
4.2. Biodigestão anaeróbia.....	10
4.3. Biodigestores .....	13
4.4. Biogás.....	13
4.5. Biohidrogênio.....	14
4.6. Manipueira.....	15
4.7. Glicerol .....	15
5. MATERIAIS E MÉTODOS .....	17
5.1. Substrato para biodigestão.....	17
5.2. Avaliação da carga orgânica dos substratos.....	17
5.3. Caracterização do inóculo .....	17
5.4. Biodigestores e gasômetros .....	19
5.5. Cromatografia gasosa para caracterização do biogás produzido.....	20
5.6. Delineamento experimental e análise estatística .....	20
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	22
6.1. Montagem dos biodigestores e gasômetros.....	22
6.2. Caracterização dos substratos e inóculo.....	23
6.3. Caracterização microbiológica do inóculo .....	24
6.4. Análise do biogás produzido .....	24
6.5. Caracterização do biogás .....	27
6.6. Otimização da produção de hidrogênio .....	28
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	30
8. REFERÊNCIAS .....	31

## 1. INTRODUÇÃO

A elevada dependência das fontes fósseis de energia, sobretudo do petróleo e seus derivados, tem gerado nas últimas décadas um grande interesse de pesquisadores do mundo todo no desenvolvimento de tecnologias que visam cada vez mais a utilização de fontes renováveis de energia, dentre as quais tem ganho cada vez mais destaque a biomassa moderna.

No Brasil, apesar da maior parte da demanda energética ser suprida por meio de energia hidrelétrica, que é caracterizada como uma fonte renovável de energia, o estudo de novas fontes energéticas tem crescido devido à preocupação com a constante baixa dos níveis dos reservatórios de água observados nos últimos anos.

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

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

Para a determinação das concentrações de metano e hidrogênio presente no biogás, podem ser utilizados métodos cromatográficos, que embora seja um método de separação e não quantificação, pode ser empregado para esta finalidade com a obtenção prévia de curvas de calibração.

Considerando esses aspectos, este trabalho propõe o estudo da produção de biogás utilizando manipueira e glicerol residual como substratos, e a utilização de cromatografia gasosa como método de caracterização do biogás obtido. Além disso, foi realizada a determinação da carga orgânica dos substratos utilizando métodos espectrofotométricos UV-VIS, e o estudo da aplicação de água residual de suinocultura (ARS) como inóculo, através do isolamento dos microorganismos, extração do DNA (ácido desoxirribonucleico), PCR (reação de polimerização em cadeia), eletroforese em gel de agarose e sequenciamento genético.



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

O presente trabalho teve como principal objetivo avaliar a produção de hidrogênio pelo processo de biodigestão anaeróbia empregando como substrato manipueira contendo adição de glicerol residual.

### **2.2. Objetivos específicos**

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

- Caracterização da carga orgânica dos substratos utilizados por método espectrofotométrico UV-VIS;
- Avaliação molecular da microbiota do inóculo utilizando métodos como PCR, eletroforese e sequenciamento genético;
- Produção de biogás por biodigestão anaeróbia;
- Quantificação do biogás produzido e sua caracterização utilizando cromatografia gasosa.

### 3. JUSTIFICATIVA

A manipueira, efluente líquido processado com amido de mandioca, é um resíduo rico em carboidratos e, portanto, é caracterizado como um substrato com alto potencial para a produção biológica de hidrogênio (TORRES ET AL. 2017, KUMMER ET AL. 2016). Além disso, a presença de vários nutrientes neste efluente, como o nitrogênio e fósforo podem causar problemas ambientais se não forem tratados antes de sua disposição (KUMMER ET AL. 2016, LUCAS ET AL. 2015), o que no entanto, reforça seu potencial como substrato em processos fermentativos, uma vez que não há, a princípio, necessidade de suplementação para o processo (KUMMER ET AL. 2016).

Buscando um maior rendimento energético, muitos pesquisadores têm adicionado aditivos ao substrato, como o glicerol residual da produção de biodiesel, que tem proporcionado incrementos consideráveis no volume de gás produzido (ARIMI ET AL. 2015, SERRANO ET AL. 2014, ATHANASOULIA ET AL. 2014, NARTKER ET AL. 2014).

Além disso, há uma busca crescente por inóculos mais eficientes, capazes de metabolizar o substrato resultando na produção de biohidrogênio, sendo o custo e sua disponibilidade para aplicação em larga escala fatores que devem ser considerados na sua escolha (ESTEVAM ET AL. 2018).

Nesta perspectiva, a água residual de suinocultura apresenta um grande potencial como inóculo, uma vez que pode conter um consórcio de microorganismos, tanto anaeróbios estritos como facultativos, além de ser gerada em grande quantidade no Brasil, especialmente na região Oeste do Paraná (COIMBRA ET AL. 2014).

Assim, o presente estudo propõe a utilização de cromatografia gasosa para possibilitar o estudo de produção de biogás e hidrogênio pelo processo de biodigestão anaeróbia. Será realizada também a determinação da carga orgânica dos substratos por método espectrofotométrico UV-VIS, e caracterização microbiológica por eletroforese e sequenciamento genético.

## **4. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **4.1. Cenário energético**

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

Isto ocorre devido aos fortes investimentos realizados partir da década de 50 nas fundamentações das decisões da política energética nacional, que tem se voltado cada vez mais na valorização dos recursos naturais presentes no país (PIQUET E MIRANDA, 2009).

Neste sentido, a biomassa tem ganhado destaque pela sua possibilidade de conversão em uma variedade de formas de energia como calor, eletricidade, hidrogênio, metanol, etanol e biogás (CHYNOWETH ET AL., 2001).

Biomassa é o termo utilizado para toda matéria orgânica derivada de plantas e animais, sendo que os recursos da biomassa incluem a madeira, resíduos agrícolas, resíduos sólidos urbanos, resíduos animais, plantas aquáticas, dentre outros. (KERSTEN ET AL., 2005).

O biogás obtido a partir da biomassa, principalmente através da biodigestão anaeróbia, é um biocombustível importante no controle e coleta de resíduos orgânicos e produção de biofertilizantes para uso na agricultura, isto aliado ao fato de sua produção ser de baixa sofisticação, não sendo necessário o emprego de alta tecnologia, tem feito com que sua participação na matriz energética brasileira aumentasse nas últimas décadas (CHYNOWETH ET AL., 2001; TALEGHANI E KIA, 2005).

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

### **4.2. Biodigestão anaeróbia**

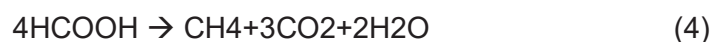
A biodigestão anaeróbia é um sistema de tratamento de resíduos líquidos onde a partir da degradação da matéria orgânica são gerados como produto final um gás constituído principalmente de metano (CH<sub>4</sub>) e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), um efluente líquido de baixa carga orgânica, e o lodo que pode ser utilizado como biofertilizante (DEMIRER E CHEN, 2005).

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

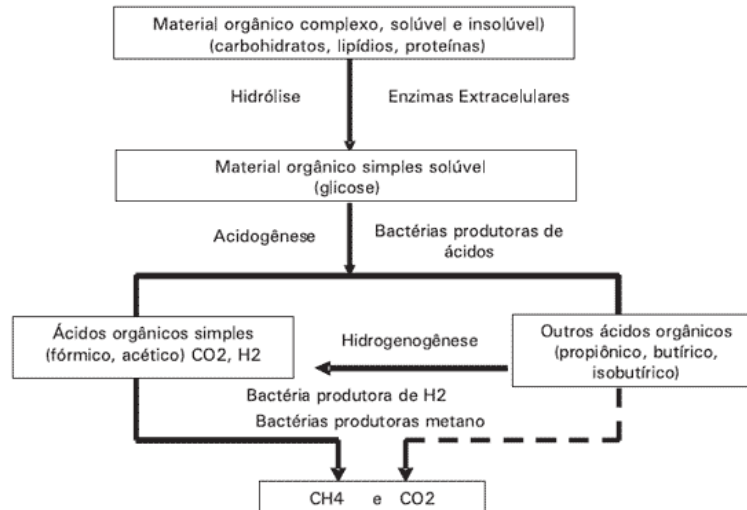
De acordo com Karagiannidis (2012), as etapas envolvidas no processo de biodigestão são: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese. Na etapa de hidrólise o material particulado é transformado em compostos de menor peso molecular facilitando absorção pelas células. Na acidogênese, estes compostos reduzidos são absorvidos pelas células das bactérias fermentativas, e excretados como forma de ácidos graxos voláteis, alcoóis e ácido láctico, além de outras substâncias orgânicas simples. Na etapa de acetogênese, esses produtos oriundos da acidogênese formam os substratos para produção do metano, sendo eles o acetato, hidrogênio e dióxido de carbono, as principais reações que envolvem esta etapa estão apresentadas abaixo.



Finalmente ocorre o processo de metanogênese, onde o metano é produzido por bactérias acetotróficas, com a redução do ácido acético, ou pelas bactérias hidrogenotróficas com a utilização do CO<sub>2</sub>, neste caso, com o consumo do hidrogênio produzido na etapa anterior, conforme consta nas reações abaixo.



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



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

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

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

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

De maneira geral, em temperaturas medianas, a velocidade das reações biológicas é maior, resultando numa operação mais eficiente e um menor Tempo de Retenção Hidráulica (TRH). Desta forma, a temperatura ideal no processo de biodigestão visando produção de biogás se encontra na faixa mesofílica (entre 20 e 40 °C), entretanto, temperaturas na faixa termofílica propiciam a produção de

biohidrogênio por desfavorecer a etapa metanogênica do processo de biodigestão (BOND E TEMPLETON, 2011).

### **4.3. Biodigestores**

A composição do biogás gerado no processo de degradação anaeróbia varia conforme as características do resíduo e das condições de operação do biodigestor, que é uma câmara fechada que tem como objetivo manter o meio anaeróbio, onde ocorre o processo de biodigestão.

As características do substrato a ser utilizado deve ser levado em conta para a escolha dos parâmetros operacionais do biodigestor, dentre estas características, o teor de sólidos é um dos mais relevantes. Segundo Li et al. (2011), para alcançar a produção máxima de biogás por volume de biodigestor e unidade de tempo, a concentração de sólidos totais (ST) máxima deve ser inferior a 15 % para reatores sem agitação. Yang et al. (2015) afirmam que a concentração ideal de ST neste tipo de reatores é de 5 %.

Já os reatores com agitação, apresentam a vantagem de poder operar com cargas de ST mais elevadas, superiores a 20%, isso porque a agitação impede a formação de crosta, uma camada de sólidos floculados que dificulta a saída do biogás produzido da massa orgânica. Além disso, para um mesmo resíduo, o Tempo de Retenção Hidráulica é consideravelmente menor quando empregado este tipo de reator (GOMES E CAPPI, 2011).

### **4.4. Biogás**

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

Conforme Alves (2013), a composição média do biogás varia de 55 % a 70 % de metano (v/v), 30 % a 45 % de dióxido de carbono (v/v), além de outros gases em menores proporções, como sulfetos, nitrogênio, monóxido de carbono e hidrogênio.

Assim, o poder calorífico do biogás também varia conforme sua composição, sendo aproximadamente de 22.500 a 25.000 kJ m<sup>-3</sup>.

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

#### 4.5. Biohidrogênio

O hidrogênio é o elemento químico mais leve conhecido, possuindo um único próton, um elétron e nenhum nêutron em sua forma estável mais comum (CRUZ, 2010). Geralmente apresenta-se em sua forma molecular, formando o gás diatômico (H<sub>2</sub>).

O H<sub>2</sub> possui grande poder calorífico, detendo a maior quantidade de energia por unidade de massa que qualquer outra substância conhecida (121.000 kJ/kg). Além disso durante sua queima ou conversão em energia elétrica não são gerados gases causadores do efeito estufa como é o caso dos combustíveis fósseis e até mesmo do biogás.

A expectativa é que dentro de poucos anos, o hidrogênio possa gerar energia para residências, comércios, indústrias e transporte. As suas principais vantagens são: apresentar uma densidade mássica superior a muitos outros combustíveis, não ser tóxico, produzir uma quantidade significativamente menor de poluentes atmosféricos que os combustíveis fósseis, e ser obtido por uma fonte renovável podendo ser produzido “*on site*” (GONZALEZ, 2008).

Além disso, o H<sub>2</sub> possui papel importante na indústria, sendo aplicado em diversos segmentos como insumo químico. A Tabela 1 contém as aplicações mais comuns do hidrogênio.

Tabela 1. Aplicações do Hidrogênio

<b>Segmento Industrial</b>	<b>Aplicação</b>
Petróleo	Dessulfurização e hidrocraqueamento
Farmacêutica	Fabricação de Sorbitol, utilizado em cosméticos, vitaminas, surfactantes
Alimentícia	Hidrogenação de óleos e saturação de gorduras

Energia	Fonte de energia térmica em queimadores ou como insumo de células a combustível
---------	---

Fonte: Adaptado de Cruz (2010).

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

#### 4.6. Manipueira

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

Para cada tonelada de raiz processada de mandioca, são gerados entre 250 e 420 litros de manipueira (DEL BIANCHI, 1998), cuja composição pode variar de acordo com a tecnologia utilizada no processamento da mandioca.

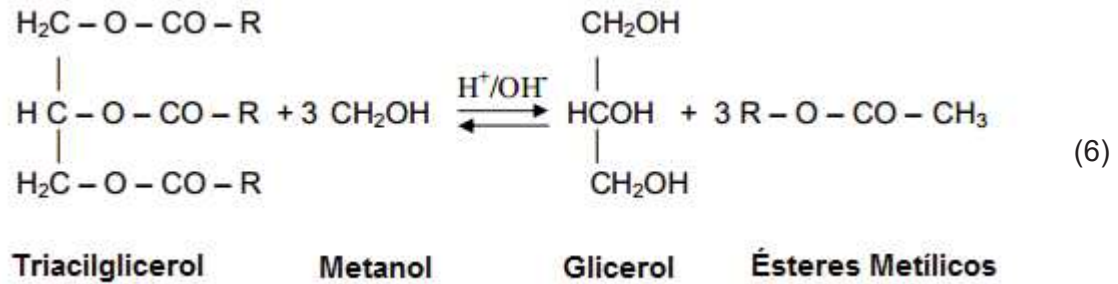
O estado do Paraná é o principal produtor de mandioca da região sul e o segundo maior do país, perdendo apenas para o Pará. Nos últimos anos, a produção se manteve acima das 300 mil toneladas/ano (SEAB, 2012). Desta forma, um volume considerável de manipueira, tornando essencial o tratamento deste resíduo.

#### 4.7. Glicerol

O biodiesel é um biocombustível líquido que visa complementar a matriz energética brasileira através da sua mistura com o diesel petroquímico (OAKI E BATALHA, 2011; CANDEIA ET AL., 2009).

No processo de produção de biodiesel reagem-se óleos ou gorduras provenientes tanto de fontes vegetais quanto animais com um álcool de cadeia curta (usualmente metanol ou etanol), tendo como produtos da reação ésteres de ácidos graxos (biodiesel) e glicerol (CARMO ET AL., 2014), conforme apresentado na Reação 1.





Fonte: adaptado de Felizardo et al., 2006.

Buscando tecnologias que utilizem o glicerol residual sem a necessidade de refino, vários pesquisadores têm utilizado este produto como aditivo em processos de biodigestão anaeróbia, relatando incrementos significativos na produção de biogás (SERRANO ET AL., 2014; ATHANASOULIA ET AL., 2014; MARTÍN ET AL., 2013; ASTALS ET AL., 2013; RIVERO ET AL., 2014, NARTKER ET AL., 2014), visto que o glicerol é uma molécula de alto poder energético, com grande disponibilidade de carbono e hidrogênio que apresenta vantagens por ser altamente digerível e facilmente armazenável durante longos períodos de tempo.

## **5. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **5.1. Substrato para biodigestão**

Para a realização dos experimentos foram utilizados como substratos: glicerol residual e manipueira. O glicerol empregado foi proveniente da produção de biodiesel com óleo residual da cocção de alimentos por catálise homogênea básica com hidróxido de sódio e metanol. Já a manipueira é proveniente de uma indústria de processamento de mandioca localizada na cidade de Terra Roxa – PR. O inóculo utilizado nos reatores foi obtido em biodigestor modelo canadense operado com resíduos líquidos de suinocultura de um matizeiro de suínos com capacidade para 900 animais.

### **5.2. Avaliação da carga orgânica dos substratos**

A DQO (demanda química de oxigênio) é utilizada como parâmetro de estabilização da matéria orgânica. É um dos principais parâmetros utilizados na determinação da concentração de matéria orgânica em amostras de efluentes líquidos, e basicamente corresponde a quantidade de oxigênio necessário para oxidar totalmente esse resíduo.

Uma das metodologias que tem sido empregadas para sua determinação envolve métodos espectrométricos UV-VIS, esta metodologia faz uso da digestão ácida da amostra em meio com dicromato de potássio, e posterior leitura colorimétrica no comprimento de onda de 540 nm (CORTEZ ET AL. 2008).

Neste método, é necessário a comparação da absorbância da amostra após a digestão com a obtida por um padrão. Para isso, foi obtida uma curva de calibração utilizando soluções padrões de KHP (biftalato de potássio) com concentração variando entre 0 e 1000 mg.L<sup>-1</sup>.

### **5.3. Caracterização do inóculo**

O isolamento de microrganismos foi direcionado para aqueles que são anaeróbios e mesofílicos. Assim, foram inoculados 200 µL do inóculo em tubo de ensaio contendo 10 ml de meio LB (Luria Bertani) líquido e incubado em jarra de

anaerobiose por 48 horas à 35 °C em estufa BOD para enriquecimento da amostra e seleção de microrganismos tolerantes a anaerobiose. A partir desse cultivo, foram inoculados 100 µl em placas de petri contendo meio LB ágar. As placas foram novamente incubadas em jarra de anaerobiose por 48 horas à 35 °C. Após o cultivo as colônias isoladas foram purificadas pela técnica de esgotamento em novas placas em meio LB ágar por 48 horas à 35 °C. A partir das colônias isoladas, as bactérias foram crescidas em meio LB líquido, novamente por 24 horas a 35 °C para crescimento bacteriano suficiente para a extração de DNA.

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

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

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

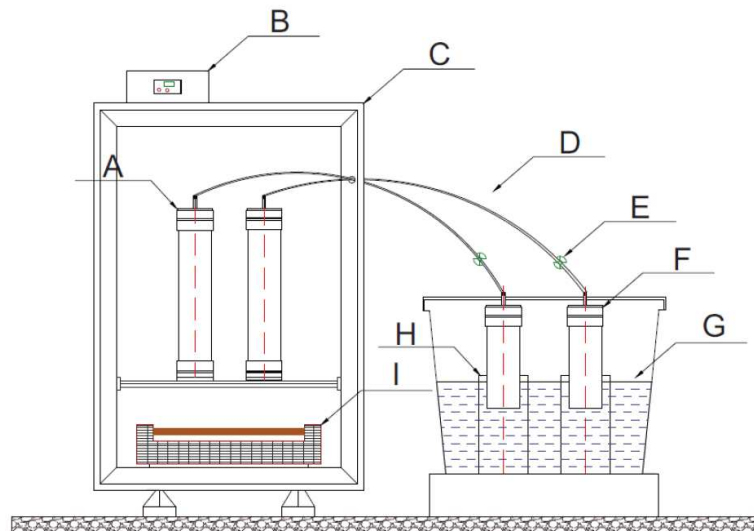
As quantidades dos reagentes utilizados na PCR foram as recomendadas pelo fabricante da enzima Taq DNA polimerase e está representada a seguir: 3 µL de tampão 10X 1 µL de solução de dNTP (10 mM cada base), 0,5 µL de MgCl<sup>2+</sup> (25 mM), 1 µL de cada um dos dois primers (10mM), 0,5 µL de Taq DNA Polimerase (5U/µL), 3 µL de DNA (10 ng/µL) e H<sub>2</sub>O ultrapura para completar o volume final. A confirmação da amplificação do gene ocorreu através da presença de uma banda de 1500 pb no gel de agarose 1% preparado com TBE 1X.

O produto do PCR foi purificado utilizando-se metodologia com PEG 8000 e preparado para envio para empresa de sequenciamento, utilizando-se o *primer* direto (F). As sequências foram analisadas com o algoritmo *nucleotide BLAST* (Basic Local Alignment Search Tool) no sítio do NCBI ([National Center for Biotechnology Information](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)) para encontrar sequências similares. As sequências selecionadas no BLAST foram utilizadas para o alinhamento e edição das bases sequenciadas

incorretamente. Após a edição, as sequências foram analisadas novamente no BLAST para identificação molecular das espécies isoladas.

#### 5.4. Biodigestores e gasômetros

O sistema de biodigestores e gasômetros onde será produzido o biogás foram construídos conforme proposto por Cremonez (2015), e está ilustrado na Figura 2.



**Figura 2.** Esquema construtivo dos biodigestores e gasômetros, onde: A) reatores em PVC; B) Termostato para controle de temperatura; C) Estufa; D) Mangueira de silicone; E) Conexão para amostragem de gás; F) Gasômetro em PVC; G) Selo de solução salina ácida; H) Guia dos gasômetros; I) Aquecedor.

Foram empregados reatores com operação em batelada construídos em PVC (polivinilcloreto), com volume total de aproximadamente 4,0 L (100 mm de diâmetro e 500 mm de altura). Definiu-se como volume útil de trabalho do reator 3,2 L. A alimentação dos substratos previamente homogeneizados foi realizada através da seção superior dos biodigestores, e na sequência os mesmos foram vedados.

Os reatores foram dispostos em estufa e a temperatura mantida em 37 °C ( $\pm 1,0$  °C) durante todo o processo, empregando sistema contendo aquecedor e termostato digital marca FullGauge®, modelo TIC-17RGTi. Segundo Bond e Templeton (2011) a temperatura ideal no processo de biodigestão visando a produção de biogás se encontra na faixa mesofílica (entre 20 e 40 °C).

Todo o sistema de captação do efluente digerido e coleta do gás foi construído externamente às estufas. Os gasômetros foram construídos em PVC com dimensões de 100 mm de diâmetro e 300 mm de altura. Os mesmos ficarão parcialmente

submersos em tanques contendo solução 25 % (v/v) de cloreto de sódio e 3 % (v/v) de ácido sulfúrico, de forma a impedir a difusão do biogás e a dissolução do dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) presente no biogás (Larsen, 2013). O volume de biogás produzido será determinado através do deslocamento vertical dos gasômetros e posterior corrigido para condições normais de temperatura e pressão (CNTP), empregando a Equação 1 (Aquino et al., 2007; Cremonez, 2015).

$$P_1 \cdot V_1 / T_1 = P_2 \cdot V_2 / T_2$$

Equação 1

Onde: P1 – Pressão CNTP (mmHg); V1 – Volume CNTP (L); T1 – Temperatura CNTP (K); P2 – Pressão Local (Palotina-PR) V2 – Volume medido em amostragem (L); T2 – Temperatura medida no momento da amostragem (K).

### 5.5. Cromatografia gasosa para caracterização do biogás produzido

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

Para a quantificação dos componentes do biogás, foram obtidas curvas de calibração para os gases Hidrogênio, Nitrogênio, Metano e Dióxido de carbono com volumes de injeção variando entre 50 e 600 µL.

Uma vez plotados os gráficos de número de mols injetados na coluna (calculado em função do volume de gás injetado) e a área do pico para cada um destes gases, foi possível a obtenção de equações que posteriormente foram utilizadas para o cálculo das concentrações destes gases no biogás.

Durante a obtenção destas curvas foi obtido também o tempo de retenção para cada um destes gases, tornando possível identificar os picos correspondentes a cada um destes gases quando em mistura no biogás.

### 5.6. Delineamento experimental e análise estatística

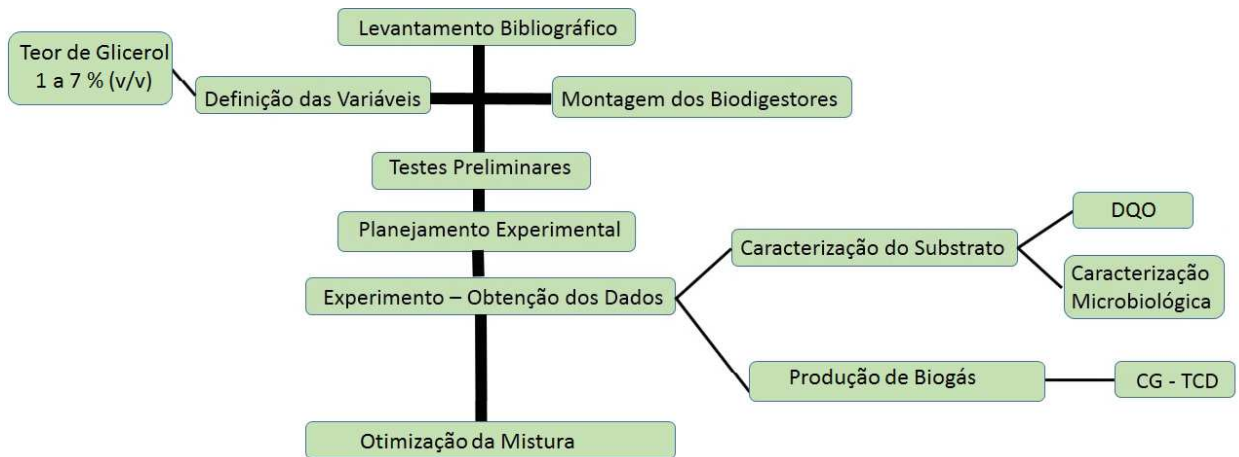
Para o estudo do efeito da adição de glicerol na composição dos biogás produzido, foram realizados experimentos contendo 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 % (v/v) de

glicerol. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Com os resultados obtidos foi plotado o gráfico de volume de hidrogênio produzido em função da concentração de glicerol residual com a finalidade de se obter a concentração destes substratos que resulte em uma maior produção de hidrogênio.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo foi desenvolvido seguindo as etapas contidas no fluxograma contido na Figura 3.



**Figura 3.** Etapas para desenvolvimento do estudo de produção de biogás

### 6.1. Montagem dos biodigestores e gasômetros

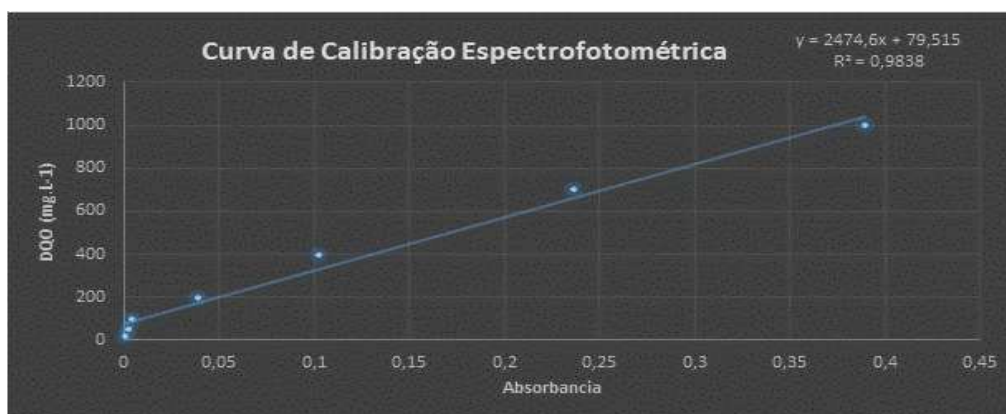
Os biodigestores foram construídos em PVC, e após o carregamento com substratos e inóculo foram vedados e dispostos em estufa. Já os gasômetros ficaram parcialmente submersos em solução salina ácida, para evitar a dissolução de hidrogênio e dióxido de carbono na água. A Figura 4 contém uma ilustração dos biodigestores (esquerda) e gasômetros (direita) já vedados e conectados entre si.



**Figura 4.** Biodigestor conectado ao gasômetro.

## 6.2. Caracterização dos substratos e inóculo

Para a análise de DQO utilizando o método de espectroscopia UV-VIS, foi construída a curva de calibração para a obtenção da equação da reta através de regressão linear, que está contida na Figura 5.



**Figura 5.** Curva de calibração espectrofotométrica UV-VIS para DQO.

A equação obtida apresentou um bom ajuste aos resultados experimentais, com valor de  $R^2$  de 0,9838. A partir da aplicação do método espectrométrico foi possível a obtenção dos valores de DQO, utilizando para os cálculos a equação da reta obtida anteriormente, para todos substratos utilizados nos experimentos e também do inóculo, os resultados obtidos estão contidos na Tabela 2.

Tabela 2. Teor de DQO dos substratos e inóculo.

Parâmetro	Manipueira	Glicerol	Inóculo
DQO (g.L <sup>-1</sup> )	5,2 ± 0,4	876,0 ± 1,2	0,3 ± 0,1

Os valores obtidos estão dentro do esperado, o Glicerol apresentou valor bem superior aos demais, isso ocorre devido ao elevado teor de carbono presente neste substrato. A manipueira, apesar de ter apresentado uma baixa DQO em relação ao glicerol, também pode ser interessante para utilização como inóculo, uma vez que contém diversos micronutrientes. Já o Inóculo foi o que apresentou menor DQO, o que era esperado, uma vez que foi utilizado ARS de um biodigestor, ou seja, ele já havia sido submetido a um processo de biodigestão anaeróbia visando reduzir sua carga



orgânica.

### 6.3. Caracterização microbiológica do inóculo

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

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

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

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

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

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

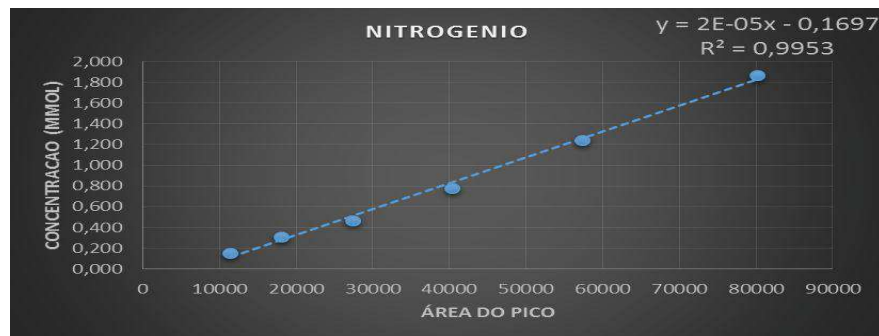
### 6.4. Análise do biogás produzido

Para a determinação da composição do biogás produzido, foi necessário a

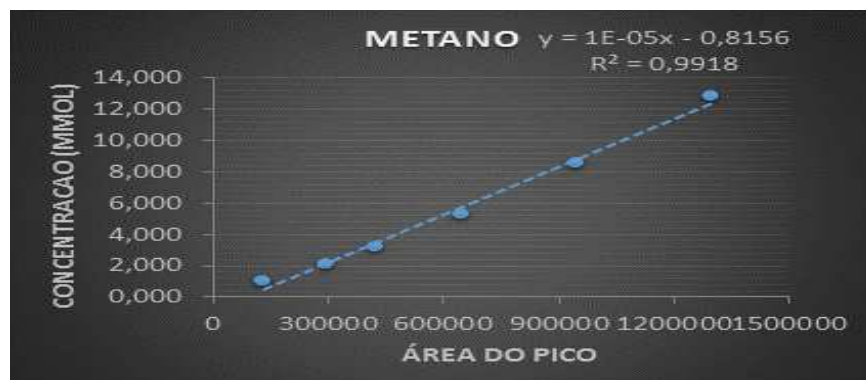
obtenção de curvas de calibração que relacionassem a área do pico com a concentração de cada um dos componentes do biogás. As Figuras 6, 7, 8 e 9 contêm as curvas de calibração para o Hidrogênio, Nitrogênio, Metano e Dióxido de Carbono.



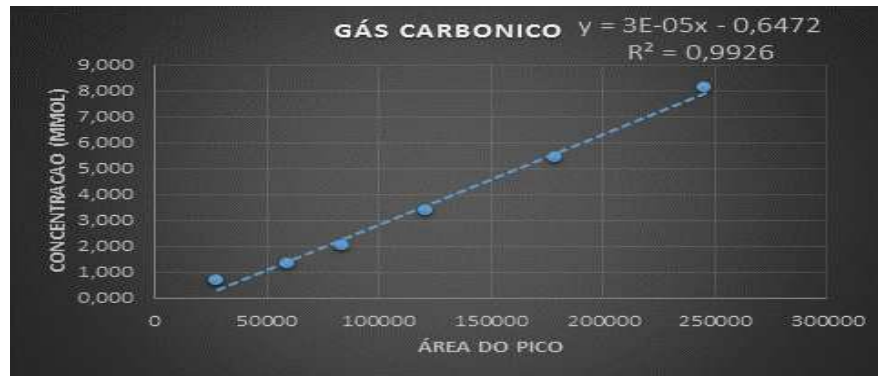
**Figura 6.** Curva de calibração para o Hidrogênio.



**Figura 7.** Curva de calibração para o Nitrogênio.



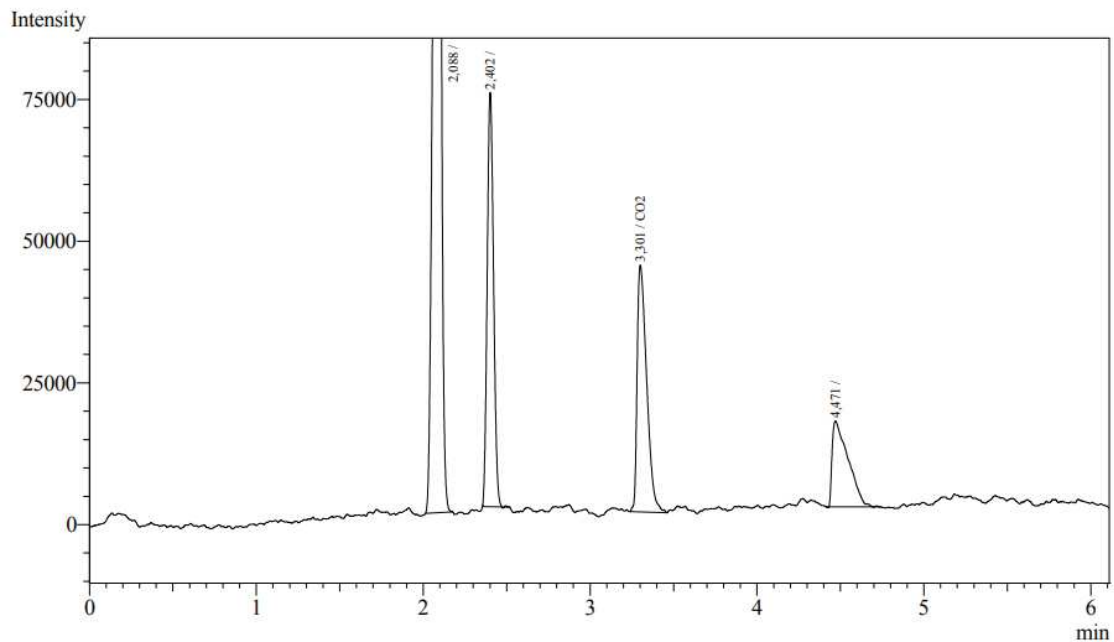
**Figura 8.** Curva de Calibração para o Metano.



**Figura 9.** Curva de Calibração para o Dióxido de Carbono

As equações obtidas das curvas de calibração representaram adequadamente os dados experimentais, o menor ajuste foi obtido para o Hidrogênio, mas ainda assim com  $R^2$  superior a 0,98. Para os demais gases, o valor de  $R^2$  foi superior a 0,99.

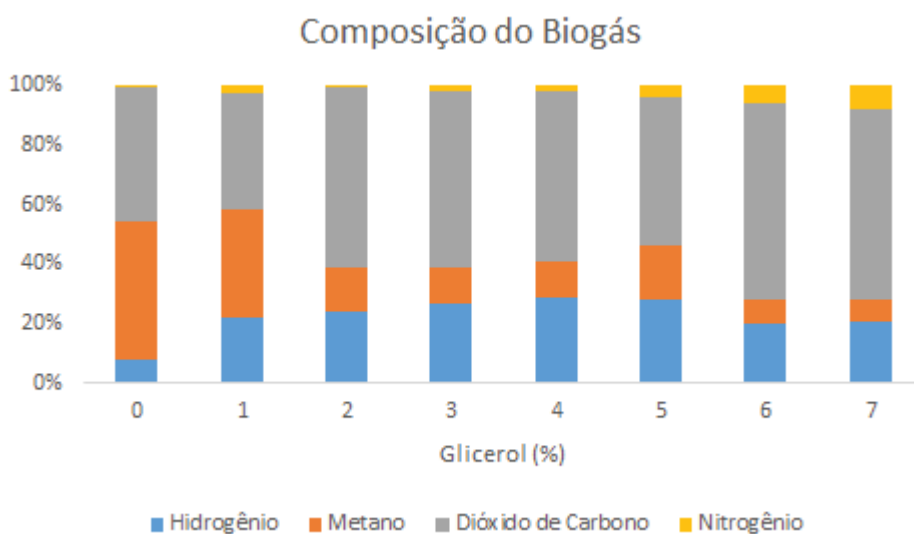
Além das equações das curvas, foi obtido também o tempo de retenção de cada um destes gases, que foi crescendo à medida em que se aumentava o peso molecular do componente. Na Figura 10, que contém o cromatograma de uma amostra de biogás contendo todos os gases avaliados, pode-se observar os picos para estes gases sendo o de 2,0 min para o Hidrogênio, 2,5 min para o Nitrogênio, 3,5 min para o Metano e 4,5 min para o Dióxido de Carbono.



**Figura 10.** Cromatograma de Biogás.

## 6.5. Caracterização do biogás

O planejamento utilizado neste trabalho resultou em 8 tratamentos de diferentes composições, sendo que todos foram realizados em triplicata. Os resultados obtidos para a composição do biogás produzido estão contidos na Figura 11.



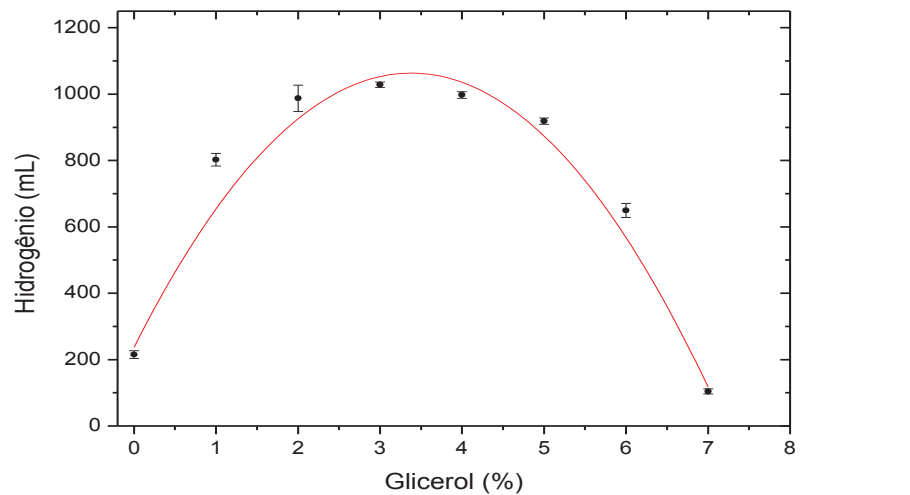
**Figura 11.** Composição do biogás produzido na biodigestão anaeróbia

Todos os tratamentos que continham a adição de glicerol obtiveram maiores concentrações de hidrogênio em sua composição quando comparados ao tratamento que continha manipueira pura. A concentração deste componente foi crescente até o tratamento contendo 4% de glicerol. Como já foi relatado por alguns autores, a adição de glicerol em concentrações maiores que 5% provocam um efeito negativo no processo de biodigestão (NARTKER ET. AL, 2014; MARTIN ET. AL, 2013), o que foi corroborado neste estudo.

Isto pode estar associado a elevada biodegradabilidade do glicerol, que por acelerar a fase acidogênica do processo de biodigestão faz com que ocorra um acúmulo de ácidos orgânicos, conforme demonstrado nas Reações 1 e 2, provocando o colapso do processo devido aos valores de pH ficarem em uma faixa inadequada a ação dos microorganismos.

## 6.6. Otimização da produção de hidrogênio

A partir do substratos utilizados, foi possível a produção de hidrogênio por biodigestão anaeróbia. A adição de glicerol na manipueira claramente proporcionou um aumento significativo no volume produzido, que foi crescente até a adição de 3%, conforme pode ser observado na Figura 12.



**Figura 12.** Produção de Hidrogênio.

Adições de até 6% de glicerol residual na manipueira proporcionaram incrementos na produção de Hidrogênio quando comparados ao tratamento se a adição de glicerol.

Foi proposto um modelo de segundo grau para descrever os dados experimentais, que está expressa na Equação 2, q qual obteve um bom ajuste aos dados, com  $R^2$  de 0,98. A curva descrita pela equação possui ponto de inflexão, que representa o volume máximo de Hidrogênio produzido em mL de 1063,4, quando a concentração de Glicerol em % é de 3,38%, representando o teor ideal deste componente a ser adicionada à manipueira.

$$Y = -72,26.X^2 + 488,67.X + 237,22$$

Equação 2

No que se refere a concentração de glicerol ideal obtida através do modelo proposto (3,38%), seu valor está próximo ao descrito na literatura quando utilizado este aditivo em outros substratos, uma vez que valores altos deste composto afetam

negativamente a produção de hidrogênio. Chaurady (2010) afirma em pesquisa utilizando como micro-organismo *Escherichia coli* e concentrações de 10, 2,5 e 5,0 % de glicerol, que concentrações muito elevadas deste composto afetam o processo e diminuem seu rendimento. O mesmo foi comprovado por Chookaew et al. 2014, testando concentrações de 1-3% de glicerol em reator UASB.

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

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Utilizando método espectrofotométrico foi determinado a carga orgânica dos substratos, enquanto que a aplicação da técnica de eletroforese e sequenciamento genético tornou possível a caracterização microbiológica do inóculo. A análise do sequenciamento revelou que das quatro bactérias isoladas, três pertencem ao Gênero *Bacillus* e uma ao Gênero *Brevundimonas*.

O método de cromatografia gasosa tornou possível a avaliação da produção de hidrogênio. A adição de glicerol na manipueira proporcionou aumentos significativos no volume de hidrogênio produzido, entretanto houve uma diminuição na produção deste gás quando este substrato apresenta concentrações acima de 4%, chegando a ser inferior ao tratamento sem a adição de glicerol quando sua concentração é de 7%.

Desta forma, é possível afirmar que a adição do glicerol à manipueira é uma alternativa bastante promissora, principalmente quando se deseja a produção de hidrogênio. Contudo, ainda são necessários mais estudos acerca de parâmetros do processo, como por exemplo pH, temperatura e agitação, para sua aplicação em escala industrial.

No que se refere aos métodos instrumentais utilizados neste trabalho, tanto os métodos para a determinação dos constituintes do biogás produzido quanto os aplicados para caracterização dos substratos e inóculo se mostraram adequados.

## 8. REFERÊNCIAS

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

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

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

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

BAO, M.D., SU, H.J., TAN, T.W. Dark fermentative bio-hydrogen production: effects of substrate pre-treatment and addition of metal ions or L-cysteine. *Fuel*, 112 (2013), pp. 38-44.

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

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

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

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

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

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



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

CHOOKAEW, T., PRASERTSAN, P., REN, Z.J., 2014. Two-stage conversion of crude glycerol to energy using dark fermentation linked with microbial fuel cell or microbial electrolysis cell. *N. Biotechnol.* 31 (2), 179e184.

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

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

COIMBRA-ARAÚJO, CARLOS H.; MARIANE, LEIDIANE ; JÚNIOR, CICERO BLEY ; FRIGO, ELISANDRO PIRES ; FRIGO, MICHELLE SATO ; ARAÚJO, IZABELA REGINA COSTA ; ALVES, HELTON JOSÉ . Brazilian case study for biogas energy: Production of electric power, heat and automotive energy in condominiums of agroenergy. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, v. 40, p. 826-839, 2014.

CORTEZ, L. A.B; LORA, E.E.S.; GOMEZ, E.O. (Org). *Biomassa para energia*. Campinas: Editora da UNICAMP, 2008.

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

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

ESTEVAM, ANDRESSA ; ARANTES, MABEL KARINA ; ANDRIGHETO, CRISTIANO ; FIORINI, ADRIANA ; DA SILVA, EDSON ANTÔNIO ; ALVES, HELTON JOSÉ . Production of biohydrogen from brewery wastewater using *klebsiella pneumoniae* isolated from the environment. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 43, p. 4276-4283, 2018.

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

FELIZARDO, P. CORREIA, M. J. N, RAPOSO, I. MENDES, J. F. BERKEMEIR, R. BORDADO, J.M. Production of biodiesel from waste frying oils. *Waste Management*, v.26, p.487-494. 2006.

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

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

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

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

KUMAR, L. ; NAT AACUTESSIA, JERSAK COSMANN ; GLAUCIA, MARIA PASTORE ; ANA, PAULA RESENDE SIMIQUELI ; VANDER, DE FREITAS MELO ; SIMONE, DAMASCENO GOMES . Adsorption of copper, zinc and lead on biosurfactant produced from cassava wastewater. *African journal of biotechnology*, v. 15, p. 110-117, 2016.

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

LI, L., KONG, X., YANG, F., LI, D., YUAN, Z., SUN, Y. Biogas production potential and kinetics of microwave and conventional thermal pretreatment of grass. *Applied Biochemical Biotechnology*. 166, 1183-1191, 2011.

LUCAS, S. D. M.; PEIXOTO, G.; MOCKAITIS, G.; ZAIAT, M.; GOMES, S. D. Energy recovery from agro-industrial through biohydrogen production: kinetic evaluation and technological feasibility. *Renewable Energy, Oxford*, v.75, p.496–504, 2015.

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

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

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

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

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

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

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

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

PIQUET, R.; MIRANDA, E. A indústria de gás no Brasil: incertezas, implicações territoriais e perspectivas. *Novos Cadernos NAEA*, v.12, n.1, p.51-66. 2009.

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

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

SEAB (Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento). ANÁLISE DA CONJUNTURA AGROPECUÁRIA MANDIOCA - SAFRA 2015/16. Disponível em: [http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/2016/mandioca\\_2015\\_16.pdf](http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/2016/mandioca_2015_16.pdf) . Acesso em 02 de outubro 2018

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

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

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

Torres, Douglas G. B. ; Lucas, Shaiane Dal' Maso ; Andreani, Cristiane I. ; Carvalho, Karina Q. De ; C.; Gomes, Simone D. . Hydrogen production and performance of anaerobic fixed-bed reactors using three support arrangements from cassava starch wastewater. *Engenharia agrícola*, v. 37, p. 160-172, 2017.

SILVA, M. O. S. A. Análises físico-químicas para controle das estações de tratamento de esgotos. São Paulo: Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental – CETESB, 1977.

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

WILLIAM G. WEISBURG, SUSAN M. BARNES, DALE A. PELLETIER, AND DAVID J. LANE. 1991. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*. p. 697-703 Vol. 173, No. 2