



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA CIVIL E AMBIENTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL

DICLA CESÁRIO PEREIRA DE OLIVEIRA

**INFLUÊNCIA DAS MUDANÇAS DO TEMPO DE DETENÇÃO HIDRÁULICA E DA
CARGA ORGÂNICA VOLUMÉTRICA NA COFERMENTAÇÃO DE MICROALGA
COM VINHAÇA E COM GLICEROL**

Recife

2024

DICLA CESÁRIO PEREIRA DE OLIVEIRA

**INFLUÊNCIA DAS MUDANÇAS DO TEMPO DE DETENÇÃO HIDRÁULICA E DA
CARGA ORGÂNICA VOLUMÉTRICA NA COFERMENTAÇÃO DE MICROALGA
COM VINHAÇA E COM GLICEROL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Civil, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Civil.

Área de Concentração: Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos.

Orientador: Prof. Dr. Wanderli Rogério Moreira Leite.

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Maria de Lourdes Florencio dos Santos.

Recife

2024

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Oliveira, Dicla Cesario Pereira de.

Influência das mudanças do tempo de detenção hidráulica e da carga orgânica volumétrica na cofermentação de microalga com vinhaça e com glicerol / Dicla Cesario Pereira de Oliveira. - Recife, 2024.

89f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, Programa de Pós-graduação em Engenharia Civil, 2024.

Orientação: Wanderli Rogério Moreira Leite.

Coorientação: Maria de Lourdes Florencio dos Santos.

1. engenharia civil; 2. tecnologia ambiental; 3. esgoto; 4. lodo; 5. resíduo; 6. tratamento. I. Leite, Wanderli Rogério Moreira. II. Santos, Maria de Lourdes Florencio dos. III. Título.

UFPE-Biblioteca Central

DICLA CESÁRIO PEREIRA DE OLIVEIRA

**INFLUÊNCIA DAS MUDANÇAS DO TEMPO DE DETENÇÃO HIDRÁULICA E DA
CARGA ORGÂNICA VOLUMÉTRICA NA COFERMENTAÇÃO DE MICROALGA
COM VINHAÇA E COM GLICEROL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Civil, da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Civil. Área de Concentração: Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos.

Aprovada em: 25/07/2024.

Orientador: Prof. Dr. Wanderli Rogério Moreira Leite – UFPE

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Maria de Lourdes Florencio dos Santos – UFPE

BANCA EXAMINADORA

participação por videoconferência

Profa. Dra. Leidjane Maria Maciel de Oliveira (examinadora interna)

Universidade Federal de Pernambuco

participação por videoconferência

Prof. Dr. Devson Paulo Palma Gomes (examinador externo)

Instituto Federal de Pernambuco

participação por videoconferência

Prof. Dr. Tales Abreu Tavares de Sousa (examinador externo)

Universidade Estadual da Paraíba

“Porque d’Ele e por Ele, e para Ele, são todas
as coisas; glória, pois, a Ele eternamente, Amém”.

Romanos 11.36

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à Trindade (Pai, Filho e Espírito Santo), por ser minha fortaleza e salvação, nos momentos bons e, também, nos desafiadores, por me proporcionar saúde, forças, abrir minha mente, conduzir minha caminhada.

Agradeço aos meus pais, Goretti e Celso, caminhantes expostos às intempéries da vida, para que eu jornadeasse na sombra. Como sou grata a Deus pela vida de vocês! A jornada é muito melhor com vocês! Obrigada por todo amor, compreensão e investimento! Agradeço ao meu irmão, Dyêgo, e a sua esposa, Beth, por todo carinho de sempre e pelas boas e engraçadas histórias, que trouxeram sorrisos à estrada!

Aos meus tios, *in memoriam*, Bernadete e Jairo, que, por tantas vezes, dedicarem seus tempos a me ensinarem português, inglês, matemática, física, química, música e os diversos cálculos... Aos melhores primos que alguém poderia ter: Mirtys, Lizandro, Nelsinho, Miguel e Érica, que sempre me apoiaram. À minha tia Lourdes, que através dela, pude estudar numa das melhores escolas de Olinda, particular, como bolsista. Aos queridos primos Quésia e Carlos, amo vocês! Aos tios queridos, Marcelo e Dilza Christine, que sempre me apoiaram e me incentivaram a estudar, muito obrigada! Tia Gil e tio Humberto, Karine, Sávio e Karol, pelo ombro amigo e pelos excelentes conselhos. Ao Pr. José Luís, engenheiro, *in memoriam*, que me incentivou a seguir a engenharia.

Aos meus queridos amigos, que me incentivaram a fazer o mestrado e me deram total apoio: prof. Dr. Lizandro Nunes e Dr^a. Mirtys, prof. Dr. Ivaldir Jr., Pr. Alessandro Naninne, Analiza Leite, Adson Régis, Nathália Bomfim e Cíntia Rafaela, muito obrigada!

Agradeço ao meu orientador, prof. Dr. Wanderli Leite e a sua esposa, prof^a. Dr^a. Bruna Magnus, que me acolheram, investiram, oportunizaram o desenvolvimento da pesquisa e foram pacientes, indo além das funções corriqueiras de um orientador. Obrigada! Agradeço à minha co-orientadora, prof^a Lourdinha Florêncio, sempre disponível e visionária. Externo minha gratidão pelos seus conselhos, oportunidades, investimento e companhia, desfrutadas com tanta alegria e conhecimento. A senhora é demais! Ao seu esposo, nosso prof. Dr. Mário Kato, por tantas orientações, oportunidades, sorrisos e muito conhecimento, sempre aberto a boas ideias e a uma boa prosa. Ao prof. Dr. Federico Battista, da *Università di Verona*, Itália, pela parceria e cooperação nos trabalhos desenvolvidos.

Agradeço aos queridos professores: Sávia, Fabrício, Bruna Fernandes, Sylvana, Anderson, Maria do Carmo, Osmar, Antônio Nunes (espero não ter esquecido de nenhum). Vocês foram fundamentais para meu desenvolvimento profissional e pessoal. Muito obrigada!

Aos componentes da banca, professores Dr^a. Leidjane de Oliveira, Dr. Devson Gomes e Dr. Tales Souza, pelas disponibilidades e colaborações, com seus valiosos comentários, sugestões e contribuições, que potencializaram meu trabalho e pela aprovação deste.

Aos queridos amigos, prof. Dr. William Teixeira, Dr. Victor Paraiso, prof. Dr. Lizandro Nunes, prof^a. M.Sc. Nathália Bandeira, prof^a. M.Sc. Daniela Gomes, Eng. Edilberto Silva, os quais, apesar das muitas responsabilidades e ocupações, contribuíram para melhorar ainda mais meu trabalho. À minha rede de apoio pessoal, Pr. Ozéias e Pr^a. Lílian Santos, Pr. Emerson e Pr^a. Margareth Paraíso, Martha Aciza, minha psicóloga maravilhosa Dr^a. Zeza Maciel, aos meus amigos Taynan e Eduardo (sempre me socorrendo, no conserto do meu computador rsrs), Gêssica, Geovanna e Karine, o trio mais animado que já conheci rsrs Naiana Agra, prof^a. Dennise, Jokebede, M.Sc. Duda Carvalho, Marina, Elizângela, Agatha, Albérica, Flavinha. Vocês são um presente na minha vida.

Aos amigos que fiz durante o mestrado, especialmente, Paulo Henrique, Jéssica, Alessandro, Clélia, Haylla, Daniela, Jadde, Tatiane, Ruan, Thamires, Manoella, Edilberto, Marcus, Elissandra, Alfredo, Mislane, Fabrício, Joelithon, Talita, Bárbara, Marília, Alynne, Vitória, Felipe, Rafaela, Luiz, por todo auxílio que me deram durante o experimento.

Agradeço ao querido grupo de Digestão Anaeróbia, que me deu suporte, desde o início, e durante a caminhada: Francielle, Gabriel Tibérius, Acson, Agnes, Gisella. Agradeço aos técnicos do Laboratório de Saneamento Ambiental, Ronaldo, Danúbia e Iago, pelas orientações e ajuda, durante o desenvolvimento do trabalho. Estendo meus agradecimentos a Luiz Galdino, Júlia, Micherlane e Ryan.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, a qual estendo meus agradecimentos, pelo suporte financeiro, no pagamento da minha bolsa. Ao Laboratório de Saneamento Ambiental, por proporcionar o desenvolvimento da pesquisa, com os melhores recursos materiais, seja por meio de equipamentos de excelência, assim como com oportunidades de intercâmbios, trazendo professores visitantes, com os quais pudemos aprender e trocar experiências. A todos que contribuíram direta e indiretamente, meu muito obrigada!

"Either human intelligence ultimately owes its origin to mindless matter; or there is a
Creator".

John Lennox, Professor de Matemática, na Universidade de Oxford.

RESUMO

A gestão integrada de resíduos da indústria de biodiesel (glicerol), etanol (vinhaça) e tratamento de efluentes (biomassa de microalgas) representa uma alternativa tecnológica para transformar resíduos em matéria-prima valiosa, que pode ser aproveitada nos setores energético e industrial. A fermentação desses resíduos tem alto potencial de geração de ácidos graxos voláteis (AGV) de forma mais ecoeficiente. Dessa forma, o presente estudo buscou elucidar os efeitos de estratégias operacionais, tempo de detenção hidráulico (TDH) e carga orgânica volumétrica (COV), no desempenho de fermentador de misturas binárias dos resíduos supracitados. O experimento ocorreu com a mistura biomassa de microalgas pré-tratada e vinhaça (BMPT+VIN) (fases I-A, I-B, I-C e I-D) e biomassa de microalgas pré-tratadas e glicerol (BMPT+GLI) (fases II-A e II-B). O desempenho da fermentação acidogênica foi superior com TDH de 3 dias devido à alta cinética de hidrólise e conversão em AGV. A operação com TDH superior a 3 dias deu suporte a reações metanogênicas. A concentração de glicerol no afluente do reator impediu a análise da relação entre TDH e a fermentação do glicerol. O aumento da COV resultou em efeito positivo na fermentação acidogênica, elevando a concentração de AGV para 13,86 g AGV_{DQO}.L⁻¹ e o rendimento de conversão para aproximadamente 40%. O manejo da COV foi importante pois altas cargas orgânicas favoreceram a formação de AGV, inibindo a metanogênese. A máxima concentração de AGV (34,1 g AGV_{DQO}.L⁻¹) foi alcançada na fase I-D, com ORP de -310 mV. Nas outras estratégias, a fermentação ocorreu com valor de ORP entre -200 e -330 mV, o que proporcionou abundância HAc, HProp e HBut. A fermentação do glicerol ocorreu entre rotas metabólicas oxidativas e redutivas e maior equilíbrio do ORP (valores próximos a zero). A rota oxidativa foi favorecida pela presença da microalga pré-tratada, enquanto o glicerol suportou o metabolismo redutivo de microrganismos. O glicerol (GLI) foi consumido em cerca de 22%, aumentando a rota oxidativa em 12%, produzindo principalmente ácido acético (HAc), etanol, ácido succínico (HSuc) e ácido butírico (HBut). Na rota redutiva, a concentração de 1,3-propanodiol (1,3-PPD) aumentou em 10%. Verificou-se, portanto, que o processo de cofermentação controlada por TDH e COV tem um benefício estratégico na produção de AGV. A mistura com glicerol resultou em condições limitantes do desempenho do processo, porém observações importantes sobre as rotas metabólicas e o efeito da biomassa de microalga foram inferidos. A combinação mais eficiente para a produção de ácidos graxos voláteis (AGV), foi entre BMPT e VIN, no TDH de 3 dias, e COV 11,25 gDQO.L⁻¹.d⁻¹.

Palavras-chave: engenharia civil; tecnologia ambiental; lodo; esgoto; resíduo; tratamento; glicerina; vinhaça da cana-de-açúcar.

ABSTRACT

The integrated management of waste from the biodiesel (glycerol), ethanol (vinasse) and wastewater treatment (microalgae biomass) industries represents a technological alternative for converting waste into valuable raw materials that can be used in the energy and industrial sectors. Fermentation of these wastes has a high potential to produce volatile fatty acids (VFAs) in a more eco-efficient manner. This study aimed to elucidate the effects of operating strategies, hydraulic retention time (HRT) and organic load rate (OLR) on the performance of a fermenter with binary mixtures of the aforementioned wastes. The experiment was carried out with a mixture of pretreated microalgal biomass and vinasse (BMPT+VIN) (phases I-A, I-B, I-C and I-D) and pretreated microalgal biomass and glycerol (BMPT+GLI) (phases II-A and II-B). The performance of the acidogenic fermentation was superior with a HRT of 3 days due to the high kinetics of hydrolysis and conversion to VFA. Operation with a HRT of more than 3 days favoured methanogenic reactions. The concentration of glycerol in the reactor effluent prevented analysis of the relationship between HRT and glycerol fermentation. Increasing the OLR had a positive effect on acidogenic fermentation, increasing the VFA concentration to $13.86 \text{ g VFACOD}\cdot\text{L}^{-1}$ and the conversion yield to about 40%. OLR management was important because high organic loads favoured the formation of VFA and inhibited methanogenesis. The maximum VFA concentration ($34.1 \text{ g VFACOD}\cdot\text{L}^{-1}$) was reached in phase I-D with an ORP of -310 mV. In the other strategies, fermentation took place at ORP values between -200 and -330 mV, resulting in an abundance of HAc, HProp and HBut. Glycerol fermentation took place between the oxidative and reductive metabolic pathways, with a greater ORP balance (values close to zero). The oxidative pathway was favoured by the presence of pre-treated microalgae, while glycerol supported the reductive metabolism of the microorganisms. Glycerol (GLI) was consumed by about 22%, increasing the oxidative pathway by 12%, producing mainly acetic acid (HAc), ethanol, succinic acid (HSuc) and butyric acid (HBut). In the reductive pathway, the concentration of 1,3-propanediol (1,3-PPD) increased by 10%. It was therefore found that the co-fermentation process controlled by HRT and OLR has a strategic advantage in the production of VFA. Blending with glycerol resulted in limiting conditions for process performance, but important observations on metabolic pathways and the effect of microalgal biomass were inferred. The most efficient combination for the production of volatile fatty acids (VFA) was between BMPT and VIN, with a HRT of 3 days and OLR $11.25 \text{ gCOD}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$.

Keywords: civil engineering ; environmental technology ; sludge ; sewage ; wastewater ; treatment ; glycerin; sugarcane vinasse.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da parede celular das espécies <i>Chlorella</i> e <i>Scenedesmus</i>	20
Figura 2 - Representação esquemática de enfraquecimento da parede celular e desintegração celular.....	27
Figura 3- Rotas metabólicas e grupos microbianos envolvidos na digestão anaeróbia.....	29
Figura 4- Rotas metabólicas da fermentação do glicerol.	35
Figura 5 - Rotas de produção de ácidos graxos voláteis a partir da fermentação do lactato.	38
Figura 6 – Fluxograma dos materiais e métodos desta pesquisa.	50
Figura 7 - Localização da ETE Mangueira, Recife, Brasil, e da LAT.	51
Figura 8 - Representação esquemática da ETE Mangueira.	51
Figura 9 - Representação esquemática da Lagoa de Alta Taxa, elaborada no software Civil3D®: a) LAT, em perspectiva e vazia; b) LAT, em perspectiva e cheia; c) Corte e planta baixa da LAT vazia e cheia.	52
Figura 10 - Coleta da biomassa microalgal: concentração da biomassa microalgal, com peneira de abertura 0,250 mm.....	53
Figura 11 - Pré-tratamento hidrotérmico aplicado à biomassa microalgal: a) metodologia; (b) biomassa microalgal pré-tratada.	53
Figura 12 - Coleta da vinhaça: (a) usina sucroalcooleira; (b) vinhaça de cana-de-açúcar.	54
Figura 13 – a) Localização do Departamento de Energia Nuclear (DEN), da UFPE, e a Usina Piloto de Biodiesel; b) glicerina bruta.....	54
Figura 14 - Pré-tratamento químico, com HCl P.A. aplicado à glicerina residual: a) metodologia; b) separação de fases, no funil de separação; c) glicerina purificada.....	55
Figura 15 - Representação esquemática dos reatores e suas dimensões, feitas no AutoCAD®. Medidas em centímetros. Fermentador RA1, à esquerda, e controle, RA2, à direita.	56
Figura 16 - Representação esquemática da alimentação sob regime de sifonamento, elaborada no AutoCAD®.	58
Figura 17- Representação esquemática da alimentação sob pressão atmosférica, elaborada no AutoCAD®.	58
Figura 18 – Identificação do filo, classe, gênero e as imagens das microscopias realizadas em cada coleta.....	64
Figura 19 - Variação temporal do AGV total e individuais e variação do valor do pH do meio reacional ao longo das fases experimentais.	70

Figura 20 -Composição de AGV individual nas diferentes fases experimentais. Os ácidos são: HAc (acético), HProp (propiónico), HBut (soma do butanoico e do isobutanoico), HPent (soma do pentanóico e do isopentanoico), HCap (caproico).	72
Figura 21 - Dinâmica da concentração de AGV total e ORP ao longo das fases operacionais.	74
Figura 22 - Vias metabólicas do glicerol (a) e composição de produtos metabólicos das rotas oxidativas e fermentativas, destacando-se os compostos considerados (b). A rota oxidativa inclui os ácidos HAc, iso-HBut, HBut, HSuc, HLat, etanol e piruvato. A rota redutora inclui o 1,3-propanodiol.	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Faixas relatadas na literatura de pH e de ORP para as fases da DA	28
Tabela 2 – Reações de hidrólise.	30
Tabela 3 – Reações da acidogênese.....	31
Tabela 4 - Nomenclatura de ácidos formados na fermentação anaeróbia, fórmulas molecular e estrutural, massa molar e emprego.....	32
Tabela 5- Reações da acetogênese.....	33
Tabela 6 - Reações da metanogênese.	34
Tabela 7- Comparação de resultados encontrados na literatura, utilizando substratos orgânicos na DA e CoDA, para recuperação de AGV (continua).....	46
Tabela 8 - Configurações operacionais testadas nas 6 fases experimentais.	57
Tabela 9 - Parâmetros e respectivos métodos analíticos utilizados na caracterização dos substratos, cossustratos e fermentados.....	60
Tabela 10 - Caracterização dos substratos coletados (média \pm desvio padrão).....	63
Tabela 11- Principais características de alimentação do substrato usado para alimentar o RA1 durante as fases (média \pm desvio padrão).	66
Tabela 12 - Média e desvio padrão dos dados de fermentação ao longo do tempo	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ΔG°	Energia livre de Gibbs
1,3 PPD	1,3 Propanodiol
AGV	Ácidos Graxos Voláteis
AGV_{DQO}	Concentração de AGV convertida em DQO
ATP	Adenosina Trifosfato
BERSO	Biorrefinaria Experimental de Resíduos Sólidos Orgânicos
BMPT	Biomassa microalgal pré-tratada
C/N	Relação Carbono / Nitrogênio
CNTP	Condições Normal de Temperatura e Pressão
CoDA	Codigestão Anaeróbia
COV	Carga Orgânica Volumétrica
DA	Digestão Anaeróbia
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
FAMEs	Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos
GLI	Glicerina
HAc	Ácido Acético
HBut	Ácido Butírico
HCap	Ácido Caproico
HCl	Ácido Clorídrico
HLát	Ácido Lático
HPent	Ácido Pentanoico
HProp	Ácido Propiônico
HSuc	Ácido Succínico
isoHBut	Ácido Isobutírico
isoHPent	Ácido Isopentanoico
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LAT	Lagoa de Alta Taxa
NTK	Nitrogênio Total Kjeldahl
ODS	Objetivos de Desenvolvimento Sustentável
ORP	Potencial de oxirredução
PFOR	Piruvato ferredoxina oxidoreductase
PHA	Polihidroxialcanoato

RA1	Reator Acidogênico
RA2	Reator Acidogênico Controle
SD	Grau de solubilização
TDH	Tempo de Detenção Hidráulico
UASB	Reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo
VIN	Vinhaça
Y_{AGV}	Rendimento de AGV

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	OBJETIVOS	24
2.1	Objetivo geral	24
2.2	Objetivos específicos	24
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
3.1	Digestão anaeróbia	25
3.1.1	Etapas da digestão anaeróbia	28
3.2	Rotas fermentativas e subprodutos metabólicos de valor agregado	34
3.2.1	Glicerol.....	34
3.2.2	Microalgas.....	35
3.2.3	Vinhaça	37
3.3	Fatores ambientais relevantes de controle da fermentação	39
3.3.1	Inóculo.....	39
3.3.2	pH.....	40
3.3.3	Potencial de oxidação e redução (ORP).....	40
3.3.4	Temperatura	41
3.3.5	Relação C/N do substrato.....	42
3.3.6	Carga orgânica volumétrica e tempo de detenção hidráulico	42
3.4	Fermentação de biomassa de microalgas e outros resíduos orgânicos	43
4	MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1	SUBSTRATOS	51
4.1.1	Biomassa microalgal pré-tratada hidrotermicamente (BMPT).....	51
4.1.2	Vinhaça da cana-de-açúcar	53
4.1.3	Glicerol residual.....	54
4.2	Configuração experimental	56
4.3	Regimes de alimentação e descarga	57
4.4	Métodos analíticos	59
4.5	Metabólitos da degradação do glicerol (Fase II-B)	62
5	RESULTADOS	63
5.1	Caracterização dos substratos	63
5.1.1	Microalga e microalga pré-tratada	63
5.1.2	Vinhaça	65

5.1.3 Glicerol residual	65
5.2 Caracterização dos cossustrato.....	66
5.3 Efeitos da COV e do TDH no desempenho da fermentação	67
5.3.1 Misturas BMPT-VIN (fases I-A, I-B, I-C e I-D)	68
5.3.2 Misturas BMPT-GLI (fases II-A e II-B).....	70
5.4 Efeito do TDH e da COV na dinâmica dos AGV individuais	71
5.5 Influência do ORP na produção de AGV	73
5.5.1 Misturas BMPT-VIN	73
5.5.2 Mistura BMPT-GLI.	75
5.6 Produtos de fermentação da fase II-B e inferência de rotas metabólicas de degradação	76
6 CONCLUSÃO	78
REFERÊNCIAS.....	80

1 INTRODUÇÃO

O elevado crescimento populacional, combinado com uma economia linear tradicional (extração de matérias-primas, fabricação de produtos e descarte dos resíduos gerados), ainda forte em muitos países, leva ao aumento da geração de resíduos e à exaustão dos recursos naturais. O Banco Mundial estima que 3,4 bilhões de toneladas de resíduos serão gerados globalmente até 2050. A transição para uma bioeconomia circular está sendo implementada como uma ferramenta de gestão de resíduos, pois promove a reutilização, reprocessamento e recuperação de produtos de valor agregado, tratamento de resíduos, redução da poluição e da dependência de recursos não renováveis (Dahiya *et al.*, 2023; Lü *et al.*, 2021; Talan *et al.*, 2022). Nesse contexto, a digestão anaeróbia (DA) é uma estratégia biotecnológica amplamente utilizada, que trata resíduos orgânicos enquanto recupera produtos, como energia, na forma de biogás (CH₄, CO₂) e intermediários, como os ácidos graxos voláteis (AGV) (Llamas *et al.*, 2022; Lü *et al.*, 2021; Solé-Bundó *et al.*, 2019).

A produção de AGV a partir da DA de resíduos orgânicos está ganhando particular interesse devido à crescente demanda de mercado, sustentabilidade e atributos ecológicos, que são usados nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética, na biossíntese de polihidroxialcanoato (PHA), bioplásticos e biohidrogênio (Agnihotri *et al.*, 2022; Lee *et al.*, 2014; Llamas *et al.*, 2022; Szacherska *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2020). Além disso, esta é uma estratégia alternativa à síntese de AGV, a partir de compostos petroquímicos.

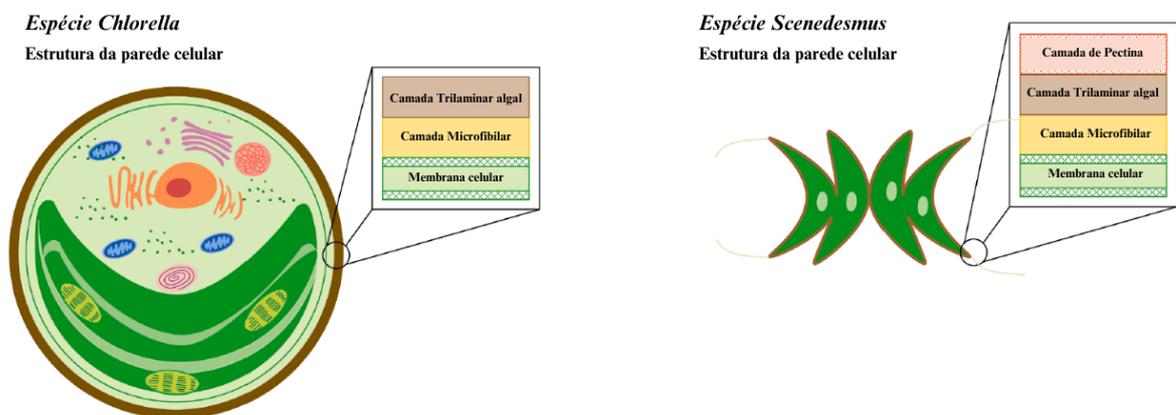
A codigestão anaeróbia é relatada na literatura como uma estratégia para aprimorar a DA, pois permite o tratamento combinado de mais de um resíduo orgânico, promovendo benefícios como: diluição de compostos tóxicos, regulação de nutrientes (relação C/N), sinergia entre os diferentes microrganismos e aumento dos rendimentos de seus produtos-alvo (Rabii *et al.*, 2019). Nesse sentido, o uso de resíduos como microalgas, vinhaça e glicerol tem sido amplamente estudado, devido a essas vantagens, concomitante ao tratamento de resíduos orgânicos expostos no meio ambiente.

Nas estações de tratamento de esgotos (ETEs), como a atividade fundamental do processo de tratamento dos efluentes em lagoas de estabilização facultativas e lagoas de maturação e/ou polimento, a biomassa microalgal é produzida, para o suprimento de oxigênio às comunidades bacterianas aeróbias e precisa ser manejada sistematicamente. Normalmente, a produção de 1 kg de biomassa de microalgas requer 1,83 kg de CO₂ (Chisti, 2007) e os custos associados a esse resíduo pode alcançar entre 20 e 30% dos custos da ETE. Lagoas de alta taxa (LAT) são caracterizadas por possuir alta geração de biomassa, a qual se tornará um subproduto

do processo, pois tem alto potencial de reduzir a qualidade das águas naturais. A biomassa de microalgas, nas lagoas de alta taxa, assimilam os nutrientes necessários para seu crescimento. Uma vez que a fonte de nutrientes é o esgoto sanitário, as LAT permitem que haja o controle da poluição dos recursos hídricos contribuindo com a sustentabilidade da tecnologia em escala industrial (Sátiro, 2021).

De acordo com Sialve *et al.* (2009), a composição celular da biomassa de microalgas varia conforme a espécie, mas é fortemente afetada pelas condições ambientais. Espécies como *Chlorophyceae*, *Volvocales* (*Chlorella sp.*, *Botryococcus braunii*, *Dunaliella salina*) possuem uma composição bioquímica típica de 30-50% de proteínas, 20-40% de carboidratos e 8-15% de lipídios. Sob condições de estresse, essas espécies podem acumular até 80% de ácidos graxos, 80% de hidrocarbonetos e 40% de glicerol. Quanto à composição elementar, as células são constituídas por 50% de carbono, 1-10% de nitrogênio e menos de 1% de fósforo. No entanto, a baixa relação C/N e a composição de sua parede celular (Figura 1) - consistindo em proteínas, celulose, hemicelulose e carboidratos - promovem sua recalcitrância, dificultando o ataque de enzimas na DA e reduzindo o potencial de produção de AGV, biogás e de outros produtos de valor agregado. Com o intuito de transpor essas barreiras, são utilizados pré-tratamentos para acelerar a etapa limitante da DA, denominada de hidrólise, promovendo compostos solúveis disponíveis ao meio e à codigestão com outros resíduos orgânicos, ricos em carbono (Silva *et al.*, 2024; Solé-Bundó *et al.*, 2019; Yukesh Kannah *et al.*, 2021). A Figura 1 ilustra duas espécies comuns de microalgas, *Chlorella* e *Scenedesmus*, enfatizando as camadas de suas paredes celulares.

Figura 1 - Estrutura da parede celular das espécies *Chlorella* e *Scenedesmus*



Fonte: Adaptado de Yukesh Kannah *et al.* (2021).

As microalgas são cultivadas em águas salobra, salina, doce e em tratamento de águas residuárias. Nessas últimas, vêm sendo estudadas desde 1970, aplicadas em Lagoas de Alta Taxa (LAT), para remoção de nutrientes, como nitrogênio e fósforo. Diversos gêneros vêm sendo utilizados e estudados, como *Chlorella*, *Cyclotella*, *Desmodesmus* e *Cosmarium* (Pinheiro, 2023; Silva, 2022; Wang *et al.*, 2016). A codigestão da microalga com outros resíduos orgânicos vem sendo estudada, como com a vinhaça da cana-de-açúcar.

Atualmente, o Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e açúcar (ETENE, 2023) e ocupa a segunda posição na produção de etanol, tendo produzido 27,37 bilhões de litros, na safra 2022/2023 (CONAB, 2023), contribuindo com cerca de 26,8% da produção global (RFA, 2023). A vinhaça, ou vinhoto, é o principal efluente gerado na produção de etanol, especificamente na etapa de destilação. Para cada litro de etanol produzido, são gerados entre 8 e 15 litros de vinhaça (Cardoso Ribeiro *et al.*, 2022), com uma produção de 369 bilhões de litros em 2022 (ANP Agência Nacional de Petróleo Gás Natural e Biocombustíveis, 2023b). Sua composição inclui ácidos, açúcares, álcoois, aldeídos, cetonas e ésteres (Parsae *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2024). Este resíduo é caracterizado por uma cor marrom-escura e um teor orgânico elevado, de 50 a 150 g.L⁻¹ (Wongarmat *et al.*, 2022), comparado com o encontrado em esgotos domésticos, 0,25 a 0,8 g.L⁻¹ (Metcalf, Eddy, 2016). Além disso, a vinhaça é ácida e corrosiva, contendo concentrações significativas de potássio, sulfato e outros macro e micronutrientes (Fuess & Garcia, 2014). Durante a fermentação no processo de produção de etanol, utiliza-se ácido sulfúrico para ajustar o pH e prevenir a floculação das leveduras, resultando em um efluente constantemente ácido, com pH variando entre 3,5 e 5,0, e elevadas concentrações de sulfato (Moraes, Zaiat & Bonomi, 2015).

No mundo, o principal uso da vinhaça é como fertilizante, por meio da irrigação de cultivos agrícolas. Os riscos da fertilização estão principalmente associados ao acúmulo de nutrientes no solo, incluindo a salinização do solo e a fertilização excessiva, levando à lixiviação de sal para as águas subterrâneas, aumentando a instabilidade do solo ou à eutrofização dos corpos d'água. Outros impactos no solo incluem a contaminação com metais tóxicos, como zinco, cobre ou bário, entre outros metais, acidificação permanente do solo e dos recursos hídricos, interferência no processo de fotossíntese - devido à alta cor e turbidez da vinhaça ou entupimento dos poros do solo pela sobrecarga orgânica - diminuindo, assim, a transferência de oxigênio e a atividade microbiana, bem como estimulando a geração de odores desagradáveis, devido à degradação anaeróbia de cargas orgânicas (Fuess e Garcia, 2014).

No entanto, considerando que não há produção de vinhaça durante a entressafra da cana-de-açúcar, a busca por outro substrato para substituí-la é de interesse.

Simultaneamente, o Brasil ocupa a quarta posição mundial na produção de biodiesel (OECD, 2021). A cada 10 kg de biodiesel é produzido 1 kg de glicerol, como resíduo (Sunarno *et al.*, 2020). A indústria de biodiesel é responsável por 66% da produção mundial de glicerol bruto, que totaliza cerca de 41,9 bilhões de litros anuais (Kaur *et al.*, 2020). De acordo com a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (2023a), foram produzidas 552.000 toneladas de glicerol bruto, em 2022, no Brasil. O glicerol bruto é um subproduto de três processos primários, a saber: transesterificação, saponificação e hidrólise de lipídios, para produzir biodiesel, sabão e ácidos graxos, respectivamente. Sua composição normalmente inclui glicerol, água e substâncias orgânicas sem glicerol, como metanol e ácidos graxos, além de cinzas. É um álcool viscoso, de baixo valor comercial e, em forma purificada, é utilizado como matéria-prima nas indústrias alimentícia, química e farmacêutica, sendo relatado como uma fonte de carbono interessante para fermentação em condições anaeróbias, na rota de produção de etanol (Chilakamarry *et al.*, 2021). O glicerol tem sido empregado como substrato para várias aplicações biotecnológicas usando digestão anaeróbia, como na produção de hidrogênio e AGV (Silva *et al.*, 2020), fermentação de etanol (Sunarno *et al.*, 2020) e produção de metano na codigestão com microalgas e vinhaça (Silva *et al.*, 2024).

No entanto, esse glicerol bruto contém várias impurezas que podem limitar o seu reaproveitamento. De acordo com Zhao *et al.* (2023), o setor de biodiesel está experimentando um rápido crescimento, levando a um aumento significativo nas exportações de glicerol residual no mercado. Desde 1995, essas exportações aumentaram 10% ao ano. O excesso da disponibilidade, porém, resultou na diminuição do seu preço, que chegou a menos de 100 dólares por tonelada (Sun *et al.*, 2022).

A gestão integrada de resíduos da recuperação de águas residuais (biomassa de microalgas) indústria de etanol (vinhaça) e de biodiesel (glicerol) apoia o alcance dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), a transição energética e a geração de produtos de valor agregado. Transformar esses resíduos em ácidos graxos voláteis (AGV), metano e outros produtos, via digestão anaeróbia, alinha-se com os ODS 7 (Energia Limpa) e 13 (Ação Climática), reduzindo a poluição e promovendo uma economia circular. Além disso, os AGV podem ser usados na produção de bioplásticos e biohidrogênio, impulsionando a inovação industrial e contribuindo para os ODS 9 (Inovação) e 12 (Produção Sustentável).

Nos últimos anos, pesquisas desenvolvidas no Laboratório de Saneamento Ambiental da UFPE têm-se dedicado ao uso de lagoas de alta taxa como estratégia de pós-tratamento de esgotos sanitários (Sátiro, 2021; Marinho, 2022). A valorização do excedente de biomassa de microalgas já foi estudada para a produção de lipídios (Sá *et al.*, 2020; Santos Neto, 2023) e

biogás (Cabral e Silva, 2020), testando-se diferentes pré-tratamentos (Melo Filho, 2017; Martins, 2019), e misturas de substratos (Silva *et al.*, 2024; Pinheiro *et al.*, 2024). Alta produção de AGV em reator fermentador de biomassa de microalgas misturado à vinhaça foi observado por Pinheiro *et al.* (2024), porém os autores não elucidaram as condições operacionais que otimizassem o processo.

Neste contexto, surge, pois, uma questão-chave: como as combinações do tempo de detenção hidráulica (TDH) e da carga orgânica volumétrica (COV) aplicadas ao processo podem ser manipuladas para alcançar altos rendimentos de AGV? Além disso, como a produção de AGV responde quando o tipo de substrato é alterado? A abordagem dessas incertezas tem implicações significativas para melhorar a eficiência do processo e avançar na tecnologia de tratamento mais eficiente e sustentável.

O presente trabalho tem como objetivo testar combinações binárias, de codigestão anaeróbia, entre os resíduos biomassa microalgal pré-tratada termicamente com vinhaça (BMPT+VIN) e biomassa microalgal pré-tratada termicamente com glicerol (BMPT+GLI), com diferentes condições operacionais de carga orgânica volumétrica e de Tempo de Detenção Hidráulica.

2 OBJETIVOS

Nesta seção serão abordados os objetivos, geral e específicos.

2.1 Objetivo geral

Analisar os efeitos das mudanças do tempo de retenção hidráulica e da carga orgânica volumétrica na cofermentação de microalga, vinhaça e glicerol.

2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar o efeito de baixos valores de TDH na produção e dinâmica de ácidos graxos voláteis totais e individuais;
- b) Realizar o manejo da COV como estratégia de aumento da produção de ácidos e manutenção do desempenho do processo;
- c) Realizar o manejo da forma de alimentação (por sifonamento e sob pressão atmosférica);
- d) Analisar a relação do potencial redox, com os rendimentos do reator fermentador;
- e) Inferir rotas metabólicas existentes no processo de cofermentação com o glicerol.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta seção será abordada a revisão bibliográfica deste trabalho.

3.1 Digestão anaeróbia

A digestão anaeróbia (DA) é um processo bioquímico natural, na qual ocorre a degradação da matéria orgânica (um substrato), na ausência de oxigênio. Recuperam-se, também, produtos intermediários, como os ácidos graxos voláteis (AGV), etanol e biogás, na forma de metano (CH_4), dióxido de carbono (CO_2), entre outros produtos, além de produzir o digestato, que é rico em nutrientes, como nitrogênio, fósforo e potássio, que pode ser usado como fertilizante (Harsha & Singh, 2021; Llamas *et al.*, 2022; Lü *et al.*, 2021).

No metabolismo dos microrganismos, o catabolismo é responsável pela liberação e conservação de energia, na forma de ATP. Na maioria dos casos, essa energia é obtida através da oxidação da matéria orgânica. Essas reações são do tipo oxidação-redução, isto é, um composto doa elétrons ao passo que outro recebe. Na DA, a matéria orgânica é oxidada, formando produtos reduzidos. Na natureza, ocorre em pântanos e é comumente aplicada em estações de tratamento de esgoto, no tratamento de afluentes e na estabilização do lodo (Madigan *et al.*, 2016; Metcalf, Eddy, 2016).

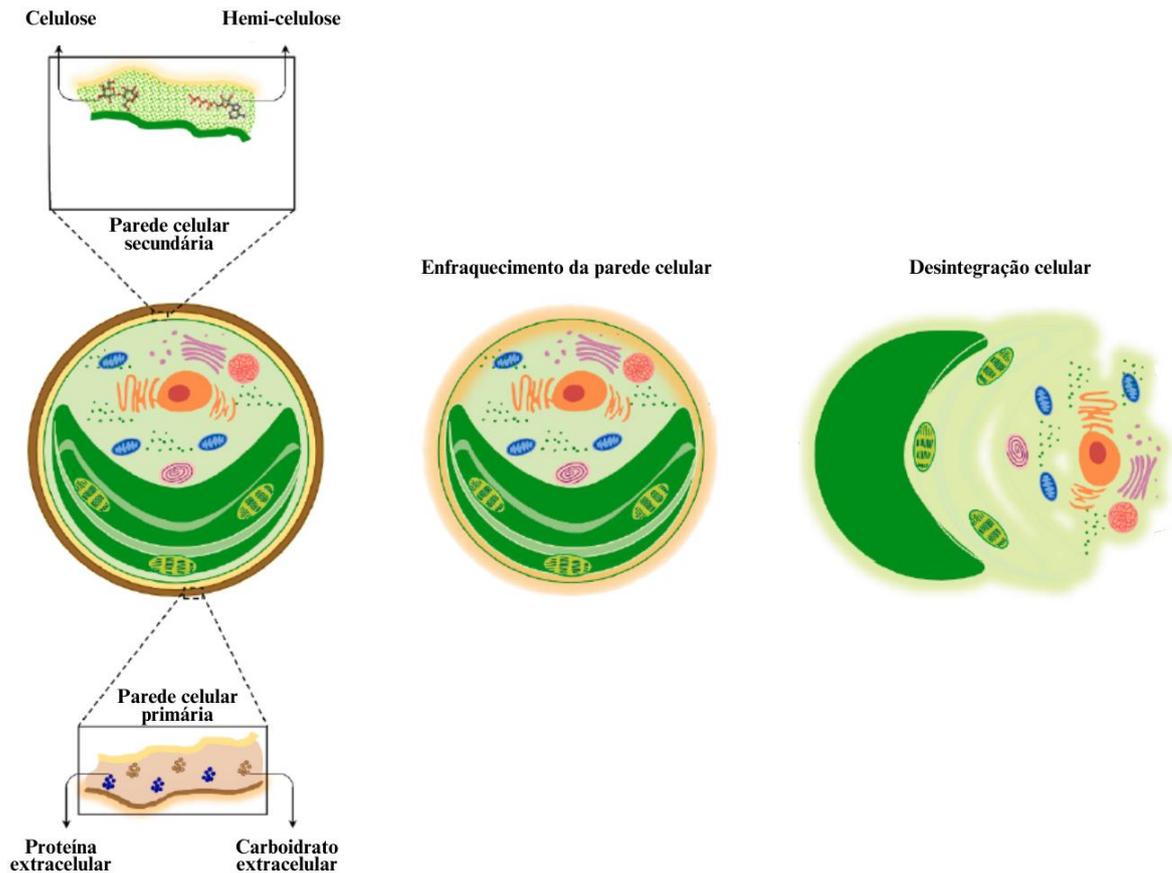
Diversos estudos apontam que a DA pode apresentar limitações, seja devido a déficits nutricionais, por exemplo, ou à dificuldade na etapa da hidrólise, ambos ligados ao tipo de substrato a que é submetido à digestão (Tabela 1). Para potencializar a eficiência da DA, a mistura de dois ou mais substratos, com características complementares, e que promova um balanceamento nutricional, tem sido amplamente estudada. Essa combinação é conhecida como codigestão anaeróbia (CoDA).

Pinheiro (2023) avaliou a codigestão anaeróbia entre microalga e vinhaça da cana-de-açúcar, para a produção de AGV e CH_4 . Silva *et al.* (2024) avaliaram o efeito sinérgico da codigestão de microalga, vinhaça e glicerol, para produção de CH_4 . Silva (2020) investigou a codigestão de biomassa algal e resíduos de alimentos, de lodos ativados com resíduos de alimentos, de biomassa algal e conteúdo ruminal, para a produção de CH_4 . Silva *et al.* (2020) avaliaram a cofermentação de glicerol bruto e biomassa suspensa para produção de bioH_2 e de AGV. Strazzera *et al.* (2021a), empregaram várias frações de resíduos alimentares domésticos, para recuperação de AGV.

A codigestão anaeróbia apresenta benefícios como: econômicos, ao tratar, ao mesmo tempo, mais de um resíduo e, caso apresentem efeito sinérgico, têm a capacidade de produzir maiores rendimentos de CH₄, que podem ser usados na própria ETE, e de AGV, podendo apresentar retorno econômico; técnicos e ambientais, na gestão dos resíduos de ETEs e indústrias, por exemplo, e na diminuição de resíduos expostos contribuindo, conseqüentemente, para a diminuição da poluição ambiental, do solo, do ar, e na diminuição da emissão dos gases que contribuem para o efeito estufa (Metcalf, Eddy, 2016).

Para aumentar o rendimento de produtos intermediários e finais na DA (ou CoDA), pré-tratamentos vêm sendo aplicados a substratos orgânicos que possuem limitações quanto à sua biodegradabilidade, durante a etapa da hidrólise, considerada a limitante do processo. De acordo com Yukesh Kannah *et al.* (2021), os pré-tratamentos promovem o enfraquecimento da parede celular (lise) ou sua completa desintegração, tornando disponíveis ao meio compostos intracelulares (Figura 2). Segundo eles, há dois tipos de pré-tratamentos: os de energia eficiente e energia intensiva. No de energia eficiente, uma quantidade mínima de eletricidade é empregada, como nos tratamentos biológicos, enzimáticos, químicos (alcalinos ou ácidos) ou combinados; no de energia intensiva, alto aporte elétrico é necessário para que haja a lise ou completa desintegração, como nos tratamentos térmicos convencionais.

Figura 2 - Representação esquemática de enfraquecimento da parede celular e desintegração celular.



Fonte: modificado de Yukesh Kannah et al. (2021).

Yin *et al.* (2016) usaram um pré-tratamento hidrotérmico, em resíduos alimentares sintético, e exploraram faixas de ORP para aprimorarem a produção de AGV; sua DQO_s passou de 87,8 g.L⁻¹ para 197,5 g.L⁻¹, depois de pré-tratado, alcançando 29,4 g.L⁻¹ de AGV total. Vassalle *et al.* (2022) aplicaram tratamento solar em microalgas, oriundas de lagoa de alta taxa, para codigestão com esgoto doméstico, e obtiveram 32% a mais de solubilização, em função da DQO_s, e um incremento em 45% no rendimento de CH₄. Em outros estudos, pesquisadores aplicaram pré-tratamentos, para recuperação de AGV, como Damtie *et al.* (2021), com pré-tratamento térmico de microalga, Llamas *et al.* (2022), com pré-tratamento enzimático proteolítico, e estratégias diferentes de redução do TDH, a partir de microalgas.

Diversos estudos apontam que parâmetros ambientais, como temperatura, pH, tipo de substrato, relação C/N, presença de compostos tóxicos, e parâmetros operacionais, como tempo de detenção hidráulico (TDH), carga orgânica volumétrica (COV), faixa de ORP, influenciam na DA / CoDA, e nos produtos intermediários, como nos AGV (Tabela 7). Esses requisitos estão abordados no item 3.4.

3.1.1 Etapas da digestão anaeróbia

A DA ocorre, simplificadamente, em quatro etapas, a saber: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese (Leite, 2015; Llamas *et al.*, 2022; Lü *et al.*, 2021), em um estágio. No entanto, como os grupos microbianos apresentam faixas ótimas diferentes para desenvolverem-se (Tabela 1), tem-se aplicado a estratégia de dois estágios (Kabir *et al.*, 2022), que consiste na separação entre as fases hidrolítica e acidogênica da acetogênica e metanogênese (An *et al.*, 2024). Fisicamente, dois reatores são operados em condições ambientais e operacionais diferentes, que favoreçam os grupos de microrganismos específicos destas fases.

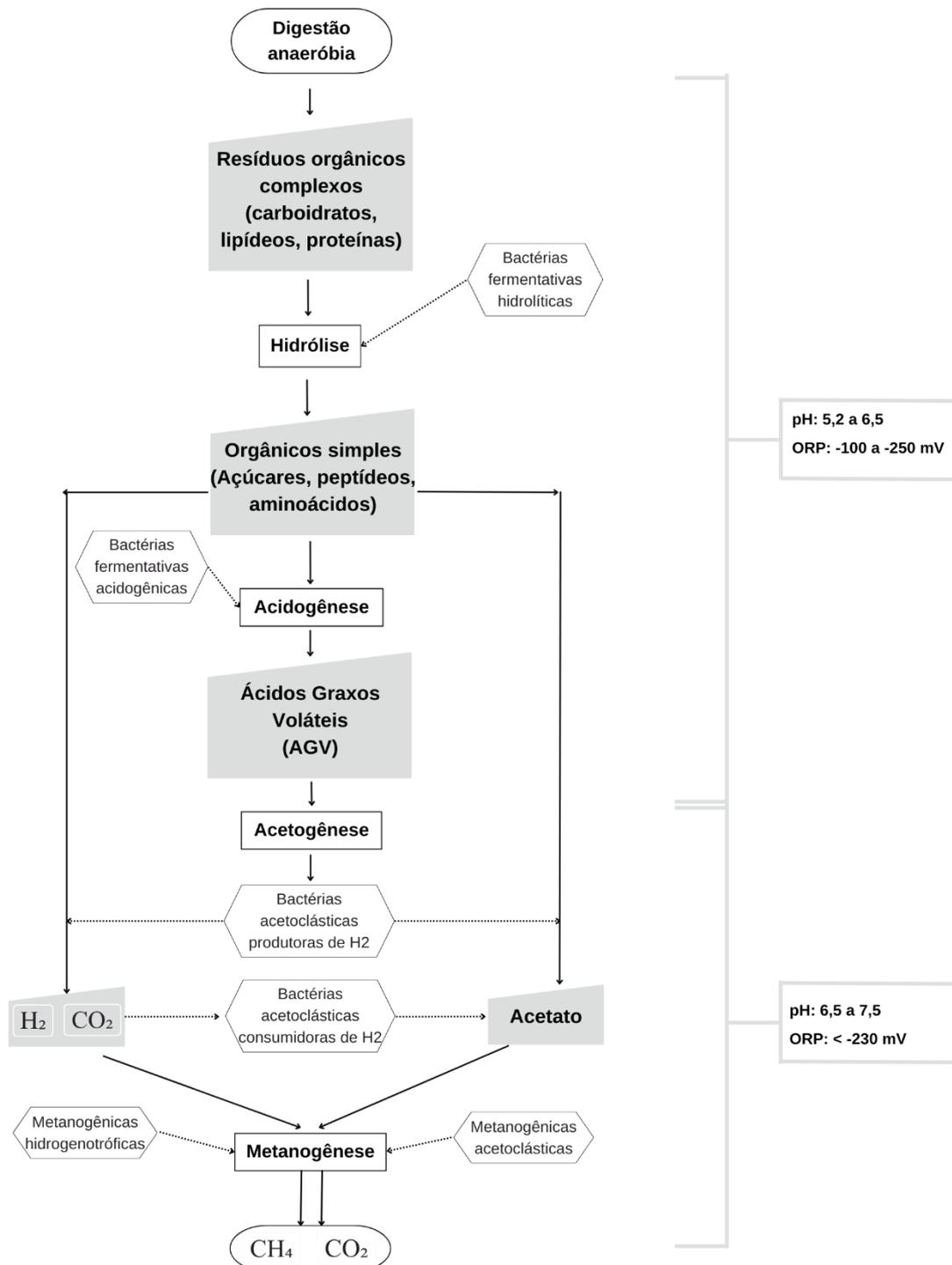
Tabela 1- Faixas relatadas na literatura de pH e de ORP para as fases da DA

Fase	Faixa de pH	Faixa de ORP (mV)	Referência
Hidrólise – acidogênese	5,2 a 6,5	-100 a -250	(Dahiya <i>et al.</i> , 2015; Lee <i>et al.</i> , 2014; Xu <i>et al.</i> , 2014)
Acetogênese - metanogênese	6,5 a 7,5	< -230	(An <i>et al.</i> , 2024; Henze <i>et al.</i> , 2008)

Fonte: A Autora (2024).

A Figura 3 ilustra as rotas metabólicas e grupos microbianos envolvidos na digestão anaeróbia.

Figura 3- Rotas metabólicas e grupos microbianos envolvidos na digestão anaeróbia.



Fonte: A Autora (2024).

Nota: Adaptado de Chernicharo (2016), An *et al.* (2024), Henze *et al.* (2008), Dahiya *et al.* (2015), Lee *et al.* (2014), Xu *et al.* (2014).

a) Hidrólise

A hidrólise é a primeira fase da DA. Consiste na colonização das macromoléculas por microrganismos, que liberam enzimas nas superfícies daquelas, degradando-as e contribuindo

para a formação dos monômeros, isto é, as bactérias atuam na desintegração e solubilização de compostos orgânicos complexos, como carboidratos, lipídeos e proteínas, transformando-os em açúcares (Tabela 2, Equação 1), ácidos graxos de cadeia longa e glicerol (Tabela 2, Equação 3) e em aminoácidos (Tabela 2, Equação 4), respectivamente (Dahiya *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2020). Por ser considerada a etapa limitante no processo da DA, substratos orgânicos que possuem características recalcitrantes necessitam de pré-tratamentos, a fim de ultrapassar essa barreira e promover maior disponibilidade de matéria orgânica solúvel para as bactérias hidrolíticas, antes da formação dos AGV (Dahiya *et al.*, 2023; Leite, 2015; Magdalena *et al.*, 2019).

A Tabela 2 apresenta algumas reações envolvidas nesta primeira etapa da DA, a hidrólise.

Tabela 2 – Reações de hidrólise.

Estequiometria das reações envolvidas	Referência	Eq.
$(C_6H_{10}O_5)_n + n H_2O \rightarrow n C_6H_{12}O_6 + n H_2$	Anukam <i>et al.</i> , (2019)	(1)
$(C_6H_{10}O_5)_{is} \rightarrow Y_C(C_6H_{10}O_5)_S + (1 - Y_C) (C_6H_{10}O_5)_{in}$	Manchala <i>et al.</i> , (2017)	(2)
$C_{57}H_{104}O_6 + 3 H_2O \rightarrow C_3H_8O_3 + 3C_{18}H_{34}O_2$	Manchala <i>et al.</i> , (2017)	(3)
$(Proteína)_{is} \rightarrow Y_p (Aminoácidos)_S + (1 - Y_p) (Proteína)_{in}$	Manchala <i>et al.</i> , (2017)	(4)

Fonte: adaptado de Dahiya *et al.* (2023).

Nota: $C_{57}H_{104}O_6$ significa lípidos (trioleato de glicerol); $(C_6H_{10}O_5)_n$ significa celulose; $(C_6H_{10}O_5)_{is}$ significa carboidratos complexos (insolúveis), incluindo carboidratos biodegradáveis e inertes; $(C_6H_{10}O_5)_S$ e $(C_6H_{10}O_5)_{in}$ significam carboidratos solúveis e inertes, respectivamente; Y_C significa a fração de carboidratos que é biodegradável; $C_3H_8O_3$ significa trioleato de glicerol; $C_{18}H_{34}O_2$ significa ácidos graxos voláteis de cadeia longa; $(Proteína)_{is}$ significa proteína complexa; $(Proteína)_{in}$ significa proteína inerte; Y_p significa a fração de proteína biodegradável; $C_5H_{10}O_2$ é valerato; $C_3H_8O_3$ é glicerol; As equações 2–4 foram usadas para modelar a digestão anaeróbica por Manchala *et al.*, (2017) e a equação foi desenhada de acordo com os padrões.

b) Acidogênese

Os principais meios para obtenção de energia celular são a respiração anaeróbia a fermentação. Na respiração anaeróbia - sob ausência de O_2 – outros elementos inorgânicos fazem o papel desse, como o nitrato (NO_3^-), sulfato (SO_4^{2-}), ferro férrico (Fe^{3+}), carbonato (CO_3^{2-}), oxidando os compostos doadores de elétrons e formando produtos mais reduzidos, como nitrito (NO_2^-) ou nitrogênio (N_2), sulfeto de hidrogênio (H_2S), Fe^{2+} e metano (CH_4), respectivamente (Madigan *et al.*, 2016; Metcalf, Eddy, 2016).

Na acidogênese, fermentação ou *dark fermentation*, o composto orgânico tanto doa como recebe elétrons. Nesta fase, os produtos formados durante a hidrólise são convertidos a

ácidos graxos voláteis, como os ácidos acético (Tabela 3, Equações 7 e 8), propiônico (Tabela 3, Equação 5) e butírico (Tabela 3, Equações 6 e 8), a álcoois, como etanol (Tabela 3, Equação 9), a H₂ (Tabela 3 - Equações 6, 7, 8, 10) e a CO₂ (Tabela 3, Equações 6, 7, 8, 9). As reações são classificadas de acordo com o substrato ou produto formados, como por exemplo, na Tabela 3, equação 9, o produto da glicose é o etanol, sendo classificada como fermentação do tipo alcoólica, realizada por organismos, como a levedura e *Zymomonas*, fermentação butírica, realizada por organismos, como *Clostridium butyricum* (Tabela 3, Equação 6 e 8) (Madigan *et al.*, 2016; Metcalf, Eddy, 2016; Wang *et al.*, 2020).

A Tabela 3 apresenta algumas reações envolvidas na acidogênese e a energia livre de Gibbs, indicando a espontaneidade das reações (quanto mais negativo o ΔG° , mais espontânea a reação acontece).

Tabela 3 – Reações da acidogênese.

Estequiometria das reações envolvidas	ΔG° (kJ/reação)	Referência	Eq.
$C_6H_{12}O_6 + 2 H_2 \rightarrow 2 CH_3CH_2COO^- + 2 H_2O + 2H^+$	-358	Aquino Chernicharo, (2005)	e (5)
$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3(CH_2)_2COO^- + 2 CO_2 + H^+ + 2 H_2$	-255	Aquino Chernicharo, (2005)	e (6)
$C_6H_{12}O_6 + 2 H_2O \rightarrow 2 CH_3COO^- + 2 CO_2 + 2 H^+ + 4 H_2$	-206	Aquino Chernicharo, (2005)	e (7)
$4 C_6H_{12}O_6 \rightarrow 3 CH_3(CH_2)_2COOH + 2CH_3COOH + 8 CO_2 + 8 H_2$	-	(Wang <i>et al.</i> , 2020)	(8)
$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2 CH_3CH_2OH + 2 CO_2$	-	(Wang <i>et al.</i> , 2020)	(9)
$C_6H_{12}O_6 + H_2O \rightarrow 2 CH_3COO^- + 2HCOO^- + 4H^+ + 2H_2$	-	(Xia <i>et al.</i> , 2016)	(10)

Fonte: A Autora (2024).

Bactérias desta fase e da seguinte (acidogênica e acetogênica) pertencem a espécies capazes de sobreviver em condições anaeróbias e aeróbias, pois pertencem a grupos estritamente anaeróbios e facultativos (Anukam *et al.*, 2019).

Os ácidos graxos voláteis são ácidos carboxílicos, de baixo peso molecular, que possuem de 2 a 6 átomos de carbono em sua composição (Agnihotri *et al.*, 2022). A Tabela 4 apresenta alguns ácidos, formados na fermentação anaeróbia, suas nomenclaturas na *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) e a usual, fórmulas molecular e estrutural, fator de conversão de mgAGV.L⁻¹ para mg DQO_{AGV}.L⁻¹ e emprego.

Tabela 4 - Nomenclatura de ácidos formados na fermentação anaeróbia, fórmulas molecular e estrutural, massa molar e emprego.

Nomenclatura IUPAC	Nomenclatura usual	Fórmula molecular	Fórmula estrutural	AGVequiv. ¹ (g DQO/L)	Emprego
Etanoico	Acético	C ₂ H ₄ O ₂	CH ₃ COOH	1,07	Produção de vinagre, conservantes, reguladores de acidez e aromatizante. Produção de ácido tereftálico (TPA), de fibras para embalagens de tereftalato de polietileno (PÉT), roupas, garrafas plásticas e filmes. Anidro acético, na fabricação de perfumes, antibióticos, corantes, explosivos. Herbicidas, EDTA, suplemento de ração animal, antisséptico, bioenergia, bioplásticos, P(3HB) (Agnihotri <i>et al.</i> , 2022; Dahiya <i>et al.</i> , 2023; Dionisi <i>et al.</i> , 2004; Oliveira <i>et al.</i> , 2023; Szacherska <i>et al.</i> , 2021).
Propanoico	Propanoico	C ₃ H ₆ O ₂	CH ₃ CH ₂ COOH	1,51	Blocos de construção para indústria farmacêutica, herbicidas, plásticos, bioplásticos, 3HV e P(3HB-co-3HV), cosméticos, perfumes (Dahiya <i>et al.</i> , 2023; Dionisi <i>et al.</i> , 2004; Oliveira <i>et al.</i> , 2023; Szacherska <i>et al.</i> , 2021).
2-metilpropanoico	Iso-Butanoico	C ₄ H ₈ O ₂	CH ₃ CH ₂ CHCOOH	1,82	Usado para a síntese de isobutirato de isoamila, um aromatizante importante nas indústrias de cosméticos, farmacêutica, de bebidas e alimentícia (Agnihotri <i>et al.</i> , 2022).
Butanoico	Butanoico	C ₄ H ₈ O ₂	CH ₃ (CH ₂) ₂ COOH	1,82	Indústria polimérica, síntese de termoplásticos, bioplásticos, P(3HB) aromatizante, indústria farmacêutica (Agnihotri <i>et al.</i> , 2022; Dionisi <i>et al.</i> , 2004; Feng <i>et al.</i> , 2022; Oliveira <i>et al.</i> , 2023; Szacherska <i>et al.</i> , 2021)
3-metilbutanoico	Iso-Pentanoico ou Iso-Valérico	C ₅ H ₁₀ O ₂	CH ₃ CH ₂ CHCH ₂ COOH	2,04	Indústria alimentícia, em queijos, saborizantes, condimentos; indústria farmacêutica, em medicamentos, para síntese de ácido β-hidroxiisovalérico, um indicador de deficiência de biotina, e na síntese de bromo isovaleril ureia, um sedativo e hipnótico (Agnihotri <i>et al.</i> , 2022).
Pentanoico	Valérico	C ₅ H ₁₀ O ₂	CH ₃ (CH ₂) ₃ COOH	2,04	Indústrias farmacêutica e biofarmacêutica, indústria de cosméticos, bioplásticos, 3HV e P(3HB-co-3HV) (Agnihotri <i>et al.</i> , 2022; Dionisi <i>et al.</i> , 2004; Oliveira <i>et al.</i> , 2023; Szacherska <i>et al.</i> , 2021).
Hexanoico	Caproico	C ₆ H ₁₂ O ₂	CH ₃ (CH ₂) ₄ COOH	2,2	Precursor de biocombustíveis, aromatizante, ração animal (Leitão <i>et al.</i> , 2017; Gomes, 2023).
Butanodioico	Succínico	C ₄ H ₆ O ₄	COOH(CH ₂) ₂ COOH	-	Indústria farmacêutica, aromatizante de bebidas e de alimentos, bioplástico, polímeros, resinas, tintas, cosméticos (Delatin, 2021).

Fonte: A Autora (2024).

Nota: ¹ Fator de conversão dos AGV individuais, cuja unidade é mg AGV/L para mg DQO_{AGV}/L.

c) Acetogênese

Nesta fase, os AGV são oxidados pelas bactérias sintróficas acetogênicas, produzindo acetato (Tabela 5), hidrogênio (Tabela 5, Equações 12, 13, 14, 16) e dióxido de carbono (Aquino & Chernicharo, 2005). Observa-se, porém, na Tabela 5, que a maioria das reações envolvidas operam com o ΔG° próximo ou acima de zero. Isso significa que as reações estão próximas ao equilíbrio ou não são espontâneas nas condições padrão, o que pode levar ao acúmulo de ácidos orgânicos, como os ácidos propiônico e butírico. Adicionalmente, o acúmulo de hidrogênio e de acetato no meio pode inibir o processo, tornando o gradiente de energia de conversão dos substratos insuficiente ou alterar o equilíbrio termodinâmico, precisando estar em baixas concentrações, para ocorrerem as reações. A presença de organismos consumidores de hidrogênio e de acetato, como as acetoclásticas consumidoras de H_2 , metanogênicas hidrogenotróficas e as redutoras de sulfato é responsável por esse consumo, produzindo substratos para a metanogênese (Aquino & Chernicharo, 2005).

Tabela 5- Reações da acetogênese.

Estequiometria das reações envolvidas	ΔG° (kJ/reação)	Eq.
$2 HCO_3^- + 4 H_2 + H^+ \rightarrow CH_3COO^- + 4 H_2O$	-104,6	(11)
$CH_3CHOHCOO^- + 2 H_2O \rightarrow CH_3COO^- + HCO_3^- + H^+ + 2 H_2$	-4,2	(12)
$CH_3CH_2OH + H_2O \rightarrow CH_3COO^- + H^+ + 2 H_2$	+9,6	(13)
$CH_3CH_2CH_2COO^- + 2 H_2O \rightarrow 2 CH_3COO^- + H^+ + 2 H_2$	+48,1	(14)
$CH_3CH_2COO^- + 2 HCO_3^- \rightarrow CH_3COO^- + H^+ + 3 HCOO^-$	+72,2	(15)
$CH_3CH_2COO^- + 3 H_2O \rightarrow CH_3COO^- + HCO_3^- + H^+ + 3 H_2$	+76,1	(16)

Fonte: adaptado de Chernicharo, 2016.

d) Metanogênese

Esta fase, a última da DA, possui condições ambientais e operacionais específicas, conforme tratado no item 3.2.1 e na Tabela 1. Microrganismos estritamente anaeróbios, denominados metanogênicas, pertencentes ao domínio *Archaea*. As arqueas metanogênicas acetoclásticas convertem acetato em metano e dióxido de carbono e as arqueas metanogênicas hidrogenotróficas, hidrogênio e dióxido de carbono em metano (Tabela 6). Esta etapa da DA pode ser considerada respiração anaeróbia. No ambiente anóxico, outros elementos inorgânicos

como o carbonato e sulfato oxidam os compostos doadores de elétrons e formam produtos mais reduzidos, como metano (CH₄) e sulfeto de hidrogênio (H₂S), respectivamente (Tabela 6, Equações 18 e 21) (Chernicharo, 2016).

Tabela 6 - Reações da metanogênese.

Estequiometria das reações envolvidas	ΔG°' (kJ/reação)	Eq.
CH ₃ COO ⁻ + H ₂ O → CH ₄ + HCO ₃ ⁻	-31,0	(17)
H ₂ + 1/4 HCO ₃ ⁻ + 1/4 H ⁺ → 1/4 CH ₄ + 3/4 H ₂ O	-33,9	(18)
HCOO ⁻ + 1/4 H ₂ O + 1/4 H ⁺ → 1/4 CH ₄ + 3/4 HCO ₃ ⁻	-32,6	(19)
HCO ₃ ⁻ + 4 H ₂ + H ⁺ → CH ₄ + H ₂ O	-135,6	(20)
SO ₄ ²⁻ + 4 H ₂ + H ⁺ → HS ⁻ + 4 H ₂ O	-151,9	(21)
CH ₃ CH ₂ COO ⁻ + 3 H ₂ O → CH ₃ COO ⁻ + HCO ₃ ⁻ + H ⁺ + 3 H ₂	+76,1	(22)
3 H ₂ + 0,75 HCO ₃ ⁻ + 0,75 H ⁺ → 0,75 CH ₄ + 2,25 H ₂ O	-101,7	(23)
CH ₃ CH ₂ COO ⁻ + 1,75 H ₂ O → 1,75 CH ₄ + 1,25 HCO ₃ ⁻ + 0,25 H ⁺	-56,6	(24)

Fonte: adaptado de Chernicharo, 2016.

3.2 Rotas fermentativas e subprodutos metabólicos de valor agregado

Nesta seção serão abordadas as rotas fermentativas e os subprodutos metabólicos do glicerol, microalgas e da vinhaça da cana-de-açúcar.

3.2.1 Glicerol

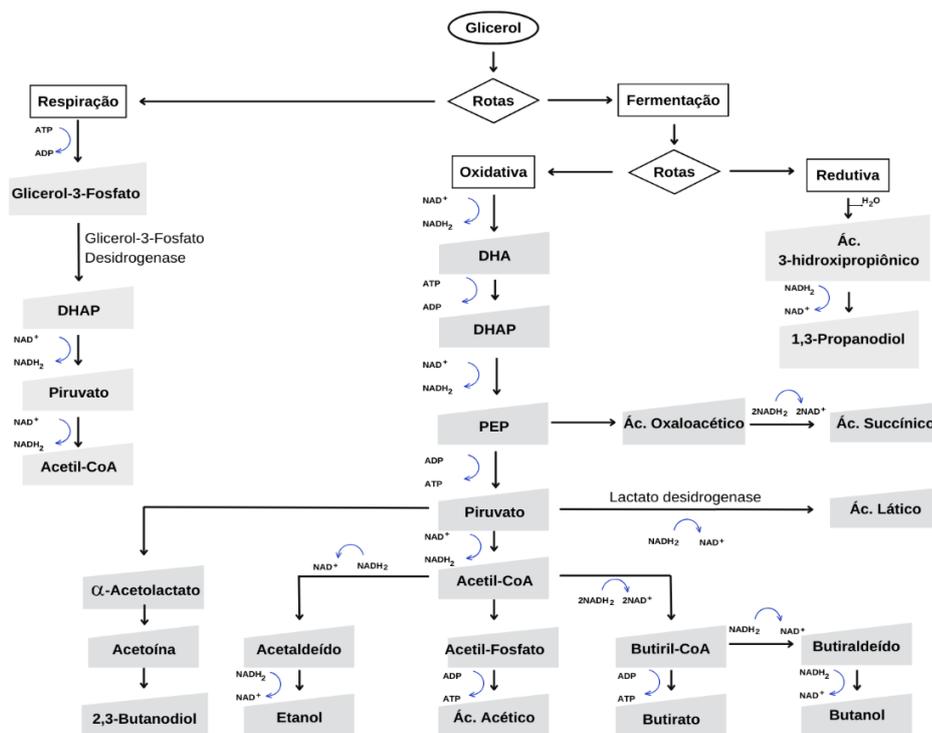
O glicerol é de natureza reduzida, o que proporciona um rendimento maior de produtos químicos reduzidos do que os produtos químicos obtidos de açúcares. O metabolismo do glicerol ocorre por duas vias: a oxidativa e a redutiva (Figura 4). A via redutiva produz compostos reduzidos como o 1,3-propanodiol, entre outros. A via oxidativa gera vários ácidos orgânicos, como ácido acético, ácido láctico e ácido butírico, entre outros (Figura 4). O glicerol (k = 4,67) [onde k representa o grau de redução por carbono, que é uma estimativa do número de elétrons disponíveis por unidade de carbono (Clomburg e Gonzalez, 2013) tem um grau de redução maior que a glicose (k = 4), o que é vantajoso para obter maior rendimento de produtos

químicos reduzidos, como 1,3-propanodiol, succinato, hidrogênio, etanol, etc. O glicerol pode ser usado diretamente como única fonte de carbono por alguns microrganismos como *Citrobacter*, *Clostridia*, *Klebsiella pneumoniae*, *Saccharomyces cerevisiae*, etc., para produzir produtos de valor agregado (Konstantinović *et al.*, 2016).

Alguns microrganismos conseguem resistir às impurezas presentes no glicerol bruto e utilizá-lo para gerar produtos de valor agregado (Vivek *et al.*, 2017). O *Clostridium sp.* é considerado o microrganismo mais adequado para a utilização do glicerol, que gera vários produtos valiosos, como o 1,3-propanodiol, 2,3-butanodiol, n-butanol, etanol e diferentes ácidos orgânicos, como ácido acético, butírico, succínico e láctico (Samul *et al.*, 2014).

O uso de *Escherichia coli* recombinante para produzir 1,3-propanodiol a partir do glicerol economiza 40% de energia, em comparação com o método convencional (Nda-Umar *et al.*, 2018). Da mesma forma, o etanol também pode ser produzido por métodos químicos, mas a produção biológica de etanol por fermentação continua sendo o método mais comum (Chilakamarry *et al.*, 2021). A bioconversão é mais fácil, mais segura e mais econômica do que outros processos químicos.

Figura 4- Rotas metabólicas da fermentação do glicerol.



Fonte: adaptado de Asopa *et al.*, (2022).

Nota: abreviações: DHA - diidroxicetona; DHAP - diidroxiacetona fosfato; PEP – fosfoenolpiruvato.

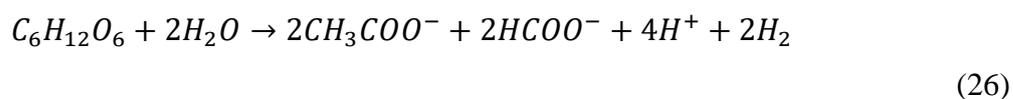
3.2.2 Microalgas

A produção de ácidos graxos voláteis a partir da biomassa de microalgas é conhecida pelo método da *dark fermentation* (fermentação escura), a qual segue o mesmo padrão da digestão anaeróbia clássica (hidrólise, acidogênese, acetogênese), com a diferença de que a etapa final de metanogênese é inibida por diversos métodos, incluindo condições e configurações operacionais, como o uso de reator fermentador separado do reator metanogênico, como já comentado (Buitron *et al.*, 2017).

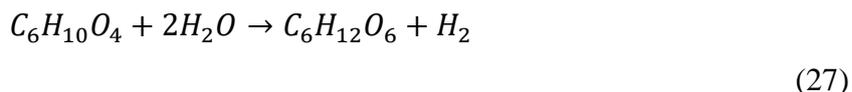
Segundo Shobana *et al.* (2017), a conversão hidrolítica fermentativa mais promissora de carboidratos de microalgas em AGV e H₂ envolve uma grande variedade de bactérias fermentativas anaeróbias, tanto mesofílicas (*Clostridium*, *Citrobacter*, *Klebsiella* e *Enterobacter*) quanto termofílicas (*Clostridium*, *Caloramator*, *Thermoanaerobacter*, *Thermoanaerobacterium*, *Caldicellulosiruptor* e *Thermotoga*), além de bactérias facultativas (*Escherichia coli*, *Enterobacter* e *Citrobacter*) e estritamente anaeróbias. A biodegradação de carboidratos simples resulta na formação de piruvato juntamente com duas moléculas de ATP e NADH. Na rota metabólica do “piruvato ferredoxina oxidorreductase (PFOR)”, por exemplo, o piruvato sofre conversão catalítica em acetil-CoA e CO₂ pela enzima PFOR, presente em algumas bactérias anaeróbias produtoras de hidrogênio, como o gênero *Clostridium*. Essa via também gera uma forma reduzida de molécula de ferredoxina (Fd(red)), que é reoxidada na produção de H₂. O caminho PFOR baseia-se na oxidação da Fd(red) por meio de uma hidrogenase dependente de ferredoxina (Fd-[FeFe]) (Equação 25).



De acordo com Xia *et al.* (2016) e Shobana *et al.* (2017), as reações hidrolíticas, acidogênicas e acetogênicas no processo anaeróbio fermentam os compostos orgânicos poliméricos complexos em acetato/formiato/íons H⁺, CO₂ e H₂. As reações podem ser descritas pelas Equações 2, da Tabela 3, e 26.



Os carboidratos complexos das microalgas são inicialmente hidrolisados em monômeros solúveis mais simples, seguidos pela formação de hidrogênio molecular por meio de enzimas bacterianas extracelulares. A cinética da reação depende do tamanho dos substratos, pH, tipo de enzimas e da difusão e absorção das enzimas nos substratos. A hidrólise de carboidratos pode ser descrita pelas reações da Tabela 2 e pela Equação 27.



Através da acidogênese, os principais intermediários formados são ácido fórmico (HCOOH), ácido acético (CH₃COOH), ácido propiônico e láctico (CH₃CH₂COOH e CH₃CHOHCOOH), e ácido butírico (CH₃(CH₂)₂COOH), metanol (CH₃OH) e etanol (CH₃CH₂OH) (Tabela 3). A acidogênese depende da transferência interespecífica de hidrogênio, do pH, do TDH e da aclimação prévia da cultura anaeróbia. Durante a acetogênese, os produtos acidogênicos como ácido propiônico (CH₃CH₂COOH) e ácido butírico (CH₃(CH₂)₂COOH), bem como os álcoois, são transformados em H₂, CO₂ e ácido acético (CH₃COOH), os quais serão posteriormente utilizados (em outro reator) pelos microrganismos metanogênicos.

A fermentação escura de microalgas utiliza esses mecanismos para transformar carboidratos em H₂ de forma eficiente. As bactérias mencionadas desempenham um papel importante neste processo devido à sua capacidade de degradar carboidratos e gerar ácidos e H₂ através de vias bioquímicas específicas que envolvem a conversão de piruvato em acetil-CoA e a subsequente reoxidação da ferredoxina. Isso resulta não apenas na produção de H₂, mas também na geração de outros subprodutos valiosos, otimizando a eficiência da conversão fermentativa (Buitrón *et al.*, 2017).

3.2.3 Vinhaça

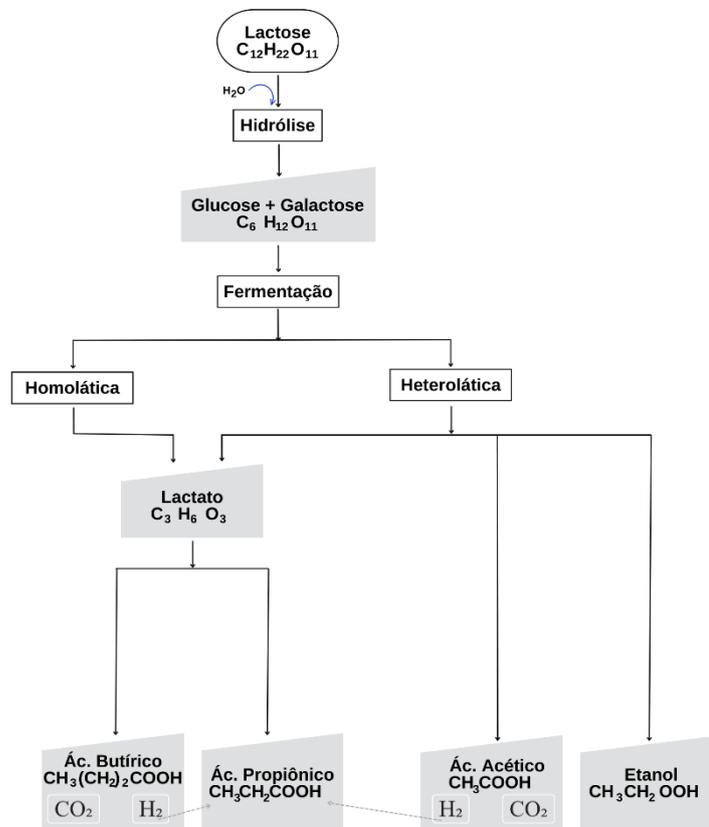
Similar à microalga e ao glicerol, a fermentação de carboidratos, proteínas e lipídeos existentes nas células da vinhaça ocorre pela fermentação escura (*dark fermentation*). Embora a vasta composição orgânica da vinhaça, sobretudo em glicerol, ácido láctico, etanol e ácido acético, as rotas metabólicas acidogênicas podem se resumir às rotas de degradação dos monômeros hidrolisados (visto no item 3.2.1) e à rota de degradação do ácido láctico.

De acordo com Krupp e Widmann (2009), muitos microrganismos têm potencial para a fermentação de hidrogênio, mas os microrganismos do gênero *Clostridium* são os mais promissores, devido ao seu alto rendimento de hidrogênio, metabolismo rápido e formação de esporos. A produção de hidrogênio ocorre em duas das quatro etapas da degradação anaeróbia (hidrólise e acetogênese). Na ausência de arqueas metanogênicas, a produção de hidrogênio pode ser alcançada pela degradação da matéria orgânica em ácidos graxos voláteis, como

compostos líquidos, e CO_2 e H_2 , como compostos gasosos. Os processos de fermentação de acetato são bem compreendidos, com um rendimento máximo de 4 mol H_2 /mol de glicose, e os processos de fermentação de butirato têm um rendimento de 2 mol H_2 /mol de glicose.

A rota do ácido láctico (Figura 5) tem sido bastante estudada, pois ele é um composto versátil utilizado em muitos processos industriais, como agente acidificante e aromatizante, amaciante para couro, antimicrobiano, conservante e precursor de polímeros de ácido polilático na indústria farmacêutica e de plásticos, devido à sua biodegradabilidade, biocompatibilidade e elasticidade (Hoarau *et al.*, 2018). A ocorrência de bactérias produtoras de lactato é uma das causas mais comuns de inibição da produção de hidrogênio. No entanto, recentes estudos já observaram a coexistência das duas vias metabólicas, especialmente quando ocorrem interações positivas entre bactérias produtoras de lactato e bactérias produtoras de hidrogênio (Rogeri *et al.*, 2024; Menezes *et al.*, 2024).

Figura 5 - Rotas de produção de ácidos graxos voláteis a partir da fermentação do lactato.



Fonte: Adaptado de Asunis *et al.* (2020).

3.3 Fatores ambientais relevantes de controle da fermentação

Há vários fatores que afetam o processo de fermentação anaeróbia e eles variam de processo para processo, dependendo do tipo de substrato e dos microrganismos usados, e também da escala do processo. Os fatores podem ser amplamente divididos em fatores biológicos, físico-químicos e fatores ambientais. Um fator pode estar independentemente relacionado a um processo biológico, mas dependente quando está relacionado a um processo físico-químico e vice-versa.

3.3.1 Inóculo

O inóculo é um fator importante que afeta a evolução das vias fermentativas. Um rendimento de produtos ácidos relativamente alto pode ser biossintetizado usando culturas microbianas axênicas (pura, microbioma fechado), como *Lactobacillus* e *Lactococcus*, quando os substratos são açúcares refinados e amido (Wakai *et al.*, 2014) ou mesmo substratos complexos, como a matéria-prima lignocelulósica, resíduos de alimentos e biomassa vegetal (Wang *et al.*, 2014). Para Tang *et al.* (2017), embora critérios específicos como nutrientes, temperatura, pH, densidade de células microbianas e condições assépticas necessitem ser mantidos para manter uma produtividade de fermentação razoável, porém com potencial de elevar o custo do processo. Culturas microbianas mistas (microbioma aberto), como lodo ativado ou lodo anaeróbio, também podem ser alternativas, pois podem ser amplamente obtidas com baixo custo, suportar condições ambientais estressantes haja vista a grande diversidade microbiana e ter grande adaptação e alta capacidade de crescimento (Liang *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2014).

De acordo com Jodhani *et al.* (2024), durante a fermentação acidogênica utilizando cultura mista, os microrganismos competem pelos nutrientes disponíveis, o que leva à formação de subprodutos indesejáveis e ao consumo dos produtos finais do processo. Por exemplo, os microrganismos podem consumir os AGV para produzir metabólitos como metano e hidrogênio, o que leva a um menor rendimento de ácidos. Portanto, para melhorar os rendimentos de AGV, é fundamental evitar a conversão de AGV para metano durante a fermentação utilizando culturas mistas. Vários métodos, como pré-tratamento térmico, ajuste de pH, ajuste em condições operacionais (tempo de detenção hidráulico, carga orgânica volumétrica) e inibidores químicos podem ser empregados para evitar essa perda (Wang *et al.*, 2014).

3.3.2 pH

De acordo com An *et al.* (2024) e Lee *et al.* (2014), o valor de pH para a produção de AGV em reatores fermentadores varia entre 5,25 e 6,5 e é função do tipo de substrato usado. Os autores afirmam, ainda, que a síntese de cada ácido apresenta um valor de pH ideal diferente.

Como um parâmetro importante, o pH mostra uma influência significativa na hidrólise e acidogênese, nas comunidades microbianas e nos produtos de fermentação (Tang *et al.*, 2017).

Wang *et al.* (2020) explicam que pH baixos podem provocar danos às bactérias, por permitir que compostos não iônicos penetrem facilmente nas células e um pH muito baixo ou alto, conduzir à inatividade enzimática.

O aumento do pH de 4 para 5 pode aumentar o rendimento da hidrólise usando resíduos alimentares como substrato para a produção de AGV (Wu *et al.*, 2015), porém Wang *et al.* (2014) digeriram resíduos de alimentos em reator inoculado com lodo anaeróbio e descobriram que as condições ácidas ($\text{pH} < 4$) poderiam melhorar a hidrólise. As diferenças resultaram principalmente das diferentes comunidades microbianas e dos substratos utilizados. Além disso, os pesquisadores observaram que o ajuste do pH de 4 a 5 aumentaria efetivamente os processos de hidrólise e acidificação, melhorando amplamente o rendimento de ácido láctico (Wu *et al.*, 2015).

3.3.3 Potencial de oxidação e redução (ORP)

A concentração de oxigênio dissolvido influencia a capacidade de oxidação e redução de um reator biológico e pode ser indicado com precisão pelo potencial redox (ORP). Segundo Yin *et al.* (2016), o ORP é um indicador do balanço de elétrons transferidos nas reações de equilíbrio. Eles avaliaram a produção de AGV em faixas de -100 a -200 mV, com aeração limitada, e entre -200 e -300 mV, e concluíram que a melhor faixa é -100 e -200 mV, por essa combinação favorecer as bactérias facultativas e não apenas as estritamente anaeróbias. Os valores de ORP variam entre -200 e -300 mV em condições totalmente anaeróbicas enquanto a faixa ideal de ORP para a metanogênese é abaixo de -230 mV (Henze *et al.*, 2008). Para Xu *et al.* (2014), a faixa ideal de ORP para a fermentação acidogênica de resíduos orgânicos está entre -100 mV e -250 mV. No entanto, os autores não apresentaram informações detalhadas sobre a função do ORP no processo hidrolítico-acidogênico.

Assim como para Yin *et al.* (2016), Lim *et al.* (2014) constataram que uma microaeração pode levar a um efeito positivo sobre o rendimento e diversidade de microrganismos

acidogênicos facultativos (filo *Firmicutes*, *Proteobacteria*, etc.), além de altas quantidades de enzimas extracelulares. No entanto, a intensidade ideal de microaeração para beneficiar reações acidogênicas permanece desconhecida.

3.3.4 Temperatura

A temperatura é outro parâmetro operacional importante, pois influencia as taxas metabólicas, as atividades enzimáticas e as taxas de crescimento e decomposição dos microrganismos. A temperatura ideal para aumentar a produção de AGV depende da composição do consórcio microbiano e da composição orgânica do resíduo. Vários estudos realizaram experimentos sobre a produção de AGV usando diferentes substratos em diferentes faixas de temperatura, a saber, condições psicrófilas (4-20 °C), mesofílicas (20-50 °C), termofílicas (50-60 °C) e hipertermofílicas (60-80 °C) (Zhuo *et al.*, 2012; Fernández-Domínguez *et al.*, 2020).

A maioria dos autores concorda que a faixa mesofílica é a mais favorável em termos de rendimento de produção de AGV em comparação com as condições psicrófilas. Fernández-Domínguez *et al.* (2020), por exemplo, descobriram que as condições mesofílicas ao usarem fração orgânica de resíduos sólidos urbanos (OFMSW) como substrato levaram a maiores rendimentos de AGV em comparação com as temperaturas psicrófilas. Da mesma forma, se o substrato for lodo biológico excedente, o aumento da temperatura de faixas psicrófilas para mesófilas aumenta a taxa de hidrólise, tornando os carboidratos e as proteínas mais disponíveis e aumentando a atividade das enzimas formadoras de ácido, aumentando, portanto, o rendimento da produção de AGV.

A eficiência da produção de ácidos graxos voláteis (AGVs) a partir de resíduos sólidos ou pastosos varia conforme a temperatura e a composição orgânica do resíduo. Estudos mostram que condições mesofílicas (temperaturas moderadas) são mais favoráveis para a fermentação acidogênica de substratos ricos em carboidratos, como resíduos alimentares, e esterco bovino misturado com silagem de milho. Por outro lado, substratos ricos em proteínas, como lodo biológico excedente e farinha de carne e ossos, geram maiores rendimentos de AGV sob condições termofílicas do que sob condições mesofílicas (Yu & Fang, 2003). A razão dessa diferença está no processo de hidrólise: o aumento da temperatura de mesofílica para termofílica eleva as atividades das principais hidrolases, facilitando a decomposição dos substratos. No entanto, enzimas formadoras de ácido têm atividades mais altas em condições mesofílicas. Proteínas, devido à sua estrutura complexa, apresentam baixa biodegradabilidade,

fazendo da hidrólise a etapa limitante na síntese de AGV. Portanto, substratos sólidos ricos em carboidratos, que requerem menos hidrólise que os proteicos, têm maior rendimento de AGV em condições mesofílicas.

De acordo com Garcia-Aguirre (2017), a maioria dos estudos sobre a síntese de AGV a partir de substratos líquidos é realizada na faixa mesofílica. No entanto, as condições termofílicas são mais ideais em termos de produção de AGV a partir de vários substratos, como águas residuais ricas em gelatina (substrato rico em proteínas), águas residuais de abatedouros (substrato rico em proteínas), águas residuais de fábricas de papel (substrato rico em carboidratos) e águas residuais de vinícolas (substrato rico em carboidratos). Por outro lado, as temperaturas mesofílicas são mais convenientes quando se emprega glicerol como substrato (substrato rico em lipídios).

3.3.5 Relação C/N do substrato

As concentrações de carbono e nitrogênio são essenciais à digestão anaeróbia, atuando como fatores limitantes. O carbono serve como fonte de energia para os microrganismos, enquanto o nitrogênio sustenta o crescimento bacteriano (Vázquez-Fernández *et al.*, 2022). O nitrogênio e o fósforo são componentes principais das células bacterianas e podem promover positivamente a produção de metano a partir de matéria orgânica rica em carbono.

Um parâmetro que pode ser usado para estudar o impacto da composição do substrato no rendimento da produção de AGV é a relação carbono/nitrogênio (C/N). Carboidratos e lipídios contribuem para aumentar a relação C/N de um substrato, pois têm um teor mais alto de carbono do que de nitrogênio, enquanto as proteínas tendem a diminuir a relação C/N devido ao seu alto teor de nitrogênio. Uma relação C/N ideal é necessária em qualquer processo de digestão anaeróbia para garantir que os nutrientes sejam equilibrados para a manutenção e o crescimento das bactérias. Além disso, uma relação C/N baixa pode estar relacionada à liberação de amônia ou amônio livre, o que causa a inibição da acidogênese. A faixa ideal da relação C/N para a digestão anaeróbica é de 20 a 30 (Harsha & Singh, 2021; Nghiem *et al.*, 2017; Vázquez-Fernández *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2014).

3.3.6 Carga orgânica volumétrica e tempo de detenção hidráulico

A carga orgânica volumétrica (COV), normalmente expressa em unidades de massa por unidades de volume do reator ao longo do tempo, influencia o rendimento da produção de AGV

indicando a quantidade de substrato disponível por volume de reator por dia para a conversão em AGV.

O aumento da COV geralmente aumenta a produção de AGV, visto o maior fornecimento de substrato para os microrganismos. Como os metanogênicos crescem mais lentamente do que os acidogênicos, o aumento da COV também pode ajudar a remover os metanogênicos do reator. No entanto, se a COV for muito alta, a estabilidade do reator pode ser comprometida devido a uma queda significativa do pH decorrente da produção excessiva de AGV, o que pode inibir a atividade acidogênica (Ferguson *et al.*, 2016). De acordo com Sukphun *et al.* (2021), a COV ideal depende mais da complexidade dos componentes dos resíduos do que das proporções de carboidratos, proteínas e lipídios. Substratos complexos, como lodo biológico excedente ou carboidratos complexos, como resíduos de alimentos, exigem um TDH de fermentação mais longo porque a hidrólise é a etapa limitadora da taxa. Assim, ao lidar com proteínas ou carboidratos complexos, a COV deve ser mantida baixa para evitar o aumento da viscosidade do caldo devido ao acúmulo de componentes não hidrolisados, o que pode limitar a transferência de massa e reduzir a produção de AGV.

Jankowska *et al.* (2017) compararam os rendimentos de AGV de diferentes TDH e níveis de pH usando vários substratos, inclusive substratos complexos/simples ricos em carboidratos (silagem de milho/glicose) e substratos complexos/simples ricos em proteínas (biomassa de microalgas/soro de leite). Eles descobriram que o rendimento de AGV depende muito da complexidade do componente dos resíduos e que o pH alcalino aumenta a produção de AGV mais do que o aumento do TDH. Além disso, vários métodos de pré-tratamento na literatura permitem maior COV, melhorando a eficiência da hidrólise. Os autores ressaltam ainda que embora a COV elevada possa ajudar a remover microrganismos metanogênicos, ela também pode eliminar alguns microrganismos acidogênicos, afetando todas as comunidades microbianas no reator e, conseqüentemente, a distribuição da composição de AGV.

3.4 Fermentação de biomassa de microalgas e outros resíduos orgânicos

Conforme verificado anteriormente, a acidogênese é uma etapa da conversão anaeróbia microbiana de carboidratos orgânicos simples ou moléculas de glicerol em ácidos orgânicos de cadeia curta, dióxido de carbono e moléculas de hidrogênio. As microalgas representam uma matéria-prima interessante para produção de hidrogênio e outros produtos bioquímicos. Enquanto biomassas lignocelulósicas liberam durante a lise celular substâncias como furanos-aldeídos e compostos fenólicos normalmente inibidores dos processos fermentativos e

metanogênicos, as microalgas possuem celulose e hemicelulose (Figura 2) em suas paredes celulares e dessa forma são comparativamente mais aplicáveis para recuperação de subprodutos. Estes microrganismos têm um alto rendimento total e, portanto, uma menor pegada de uso da terra, além da possibilidade de utilização de áreas consideradas inadequadas para produção de alimentos. Adicionalmente, a produção de microalgas tem o potencial de absorver as emissões de CO₂ (Ward; Lewis; Green, 2014).

Bactérias fermentativas anaeróbias são capazes de fermentar cerca de 95% da fração de carboidratos provenientes da biomassa de macro e microalgas pré-tratada por aquecimento a vapor ácido em hidrogênio, etanol e ácidos graxos voláteis (AGV), especialmente ácido acético e ácido butírico. A produção específica de hidrogênio de 85,0 mL por grama de sólidos voláteis foi obtida em uma relação C/N da microalga de 26,2 e concentração de 20 g SV/L (Xia *et al.*, 2016).

A relação C/N do substrato é um indicador importante para a produção fermentativa de hidrogênio (Lay *et al.*, 2013). O excesso de relação carbono/nitrogênio inibe o crescimento e o metabolismo das bactérias fermentadoras, levando à utilização insuficiente do substrato e à baixa produção de hidrogênio. No entanto, uma baixa relação C/N sugere que o substrato contém excesso de nitrogênio (proteínas), o que não é vantajoso para a fermentação do hidrogênio e pode levar à inibição da amônia (Xia *et al.*, 2016). Diversos autores testaram o equilíbrio da relação C/N através da otimização da disponibilidade de carbono via o uso de pré-tratamentos, entretanto a disponibilidade de um carbono externo para melhorar a atividade enzimática via mistura com outros substratos como a vinhaça e o glicerol são ainda escassos na literatura.

Devido ao fato de que a maioria das espécies de microalgas apresentam uma relação C/N considerada baixa, a adição de um cossustrato rico em carbono pode facilitar o processo acidogênico e metanogênico (Kwietniewska; Tys, 2014). Microalgas e resíduos de microalgas têm sido sugeridos com uma grande variedade de cossustratos, como lodo de esgoto, esterco animal, resíduos de alimentos, glicerol, culturas energéticas, resíduos de papel e óleos, graxas e gorduras (Solé-Bundó *et al.*, 2019).

A presente revisão bibliográfica foi fundamental para compreensão das principais rotas fermentativas e subprodutos metabólicos de valor agregado do glicerol, das microalgas e da vinhaça, dos fatores ambientais que influenciam a DA, como o inóculo, pH, potencial e oxirredução (ORP), temperatura, relação C/N, carga orgânica volumétrica e tempo de detenção hidráulica. Como citado ao longo do texto, os ácidos graxos voláteis apresentam uma ampla variedade de aplicações, sendo utilizada por diversas indústrias. A Tabela 7 resume condições

experimentais e rendimentos de AGV para alguns estudos que avaliaram a DA e a CoDA de biomassa microalgal com diferentes substratos orgânicos. Destaca-se a grande variabilidade dos resultados obtidos pelos estudos, dependendo da espécie de microalga, do cossustrato utilizado e das condições operacionais dos reatores.

A partir da análise desses estudos, observa-se a necessidade de aprimoramento das condições operacionais aplicadas, a fim de otimizá-las e de alcançar, assim, maiores rendimentos dos produtos de interesse. Entre os principais obstáculos para a cofermentação, destacam-se: (i) complexidade do substrato; (ii) vias metabólicas competitivas; (iii) cargas orgânicas desbalanceadas; (iv) incompatibilidade entre substratos.

Tabela 7- Comparação de resultados encontrados na literatura, utilizando substratos orgânicos na DA e CoDA, para recuperação de AGV (continua)

Condições operacionais							Desempenho			
Substrato	Reator, Volú	Pré-trat.	Faixa	Faixa	Faixa de ORP	Faixa de TDH	Faixa de COV	Y _{AGV}	[AGV] _{máx}	Referência
			temp.	de pH						
			Temp. ó.	pH ó.	ORP ó.	TDH ó.	COV ó.			
<i>Digestão</i>										
Biomassa microalgal <i>Chlorella vulgaris</i>	CSTR (2,8 L)	Térmico	55 85°C 55 °C	-	-	1d-3d 1d	-	-	~14,0 g/L	(Damtie <i>et al.</i> , 2021)
	CSTR (1,0 L)	Enzimático	25 °C	6,5 ± 0,2	-	10d→8d→6d→4d→2d 10d	1,5 g DQO/L.d	33,9±0,9% gAGV _{bqo} /gDQO _{in}	5,2±0,2gDQO/L	(Llamas <i>et al.</i> , 2022)
Vinhaça da cana-de- açúcar	AnSTBR (2,0 L)	-	30 °C	7,4±0,1	-	18,1 ± 0,6h	54,8 ± 4,8 kgDQO/m ³ d	-	~12,0 ^a g/L	(Fuess <i>et al.</i> , 2023)
	AnSTBR (2,0 L)	-	55 °C	7,2±0,1	-	12,0 ± 0,4h	83,6 ± 5,1 kgDQO/m ³ d	-	~10,5 ^a g/L	
	CSTR (1,8 L)	-	30 ± 2°C	5,2 ± 0,2	-	4d	5,62 kgDQO/m ³ d	-	7,8 g/L	(Pinheiro, 2023)
<i>Codigestão</i>										

Glicerol biomassa	bruto suspensa	e Semi- contínuo (5L)	-	$35 \pm 2^\circ\text{C}$	5,5 – 6	-	1d	10 50gDQO/L.d 10gDQO/L.d	45% gAGV _{DQO} /gDQO _{in}	-	(Silva <i>et al.</i> , 2020)
Resíduo sintético	alimentar	CSTR (0,5 L)	Hidrotérmico	$30 \pm 2^\circ\text{C}$	6	-100 a -300 mV -100 a -200 mV	-	-	0,79 gDQO/gSV	29,4 g/L	(Yin <i>et al.</i> , 2016)
		CSTR (4,2 L)	Mecânico	$55 \pm 1^\circ\text{C}$	7	-	6d	11 gSV/Ld	0,38 gAGV/gSVT	23,5 g/L	(Strazzera <i>et al.</i> , 2021)
Resíduo sintético	alimentar rico em proteínas	Batelada (0,5 L)	Mecânico	$37 \pm 2^\circ\text{C}$	SC 5,5 7 7	-	-	-	81,74% gAGV _{DQO} /gDQO _{in}	12,77 gDQO/L	(Strazzera <i>et al.</i> , 2021a)
Resíduo sintético	alimentar rico em fibras e açúcares	Batelada (0,5 L)	Mecânico	$37 \pm 2^\circ\text{C}$	SC 5,5 7 7	-	-	-	53,42% gAGV _{DQO} /gDQO _{in}	9 gDQO/L	
Resíduo sintético	alimentar rico em lipídios	Batelada (0,5 L)	Mecânico	$37 \pm 2^\circ\text{C}$	SC 5,5 7	-	-	-	8,9% gAGV _{DQO} /gDQO _{in}	~1 g/L	
Biomassa vinhaça	microalgal da cana-de- açúcar	CSTR (1,8 L)	-	$30 \pm 2^\circ\text{C}$	$5,5 \pm 0,2$	-	4d	5,62 kgDQO/m ³ d	-	~6,7 g/L	(Pinheiro, 2023)

	Hidrotérmico	$30 \pm 2^\circ\text{C}$	5,5	SC	-200 a -360 mV	3d 4d 3d	5,62 kgDQO/m ³ d	30,1±5,7% gAGV _{DQO} /gDQO _{in}	6,7 gDQO/L	Este estudo
	Hidrotérmico	$30 \pm 2^\circ\text{C}$	5,5 – 6 6	SC	-240 a -330 mV	3d	5,62 11,25kgDQO/m ³ d 11,25 kgDQO/m ³ .d	39±6,7% gAGV _{DQO} /gDQO _{in}	23,2 gDQO/L	
	Hidrotérmico	$30 \pm 2^\circ\text{C}$	5 - 6 6	-240 a -330 mV	-240 a -330 mV	2d 3d 3d	11,25 kgDQO/m ³ .d	39±6,7% gAGV _{DQO} /gDQO _{in}	34,1 gDQO/L	
Biomassa microalgal e glicerol	CSTR (1,8 L)	Hidrotérmico	$30 \pm 2^\circ\text{C}$	5	+100 a -100 mV -50 a -100 mV	2d 4d 4d	11,25 kgDQO/m ³ .d	2,6±1,1% gAGV _{DQO} /gDQO _{in}	2,4 gDQO/L	

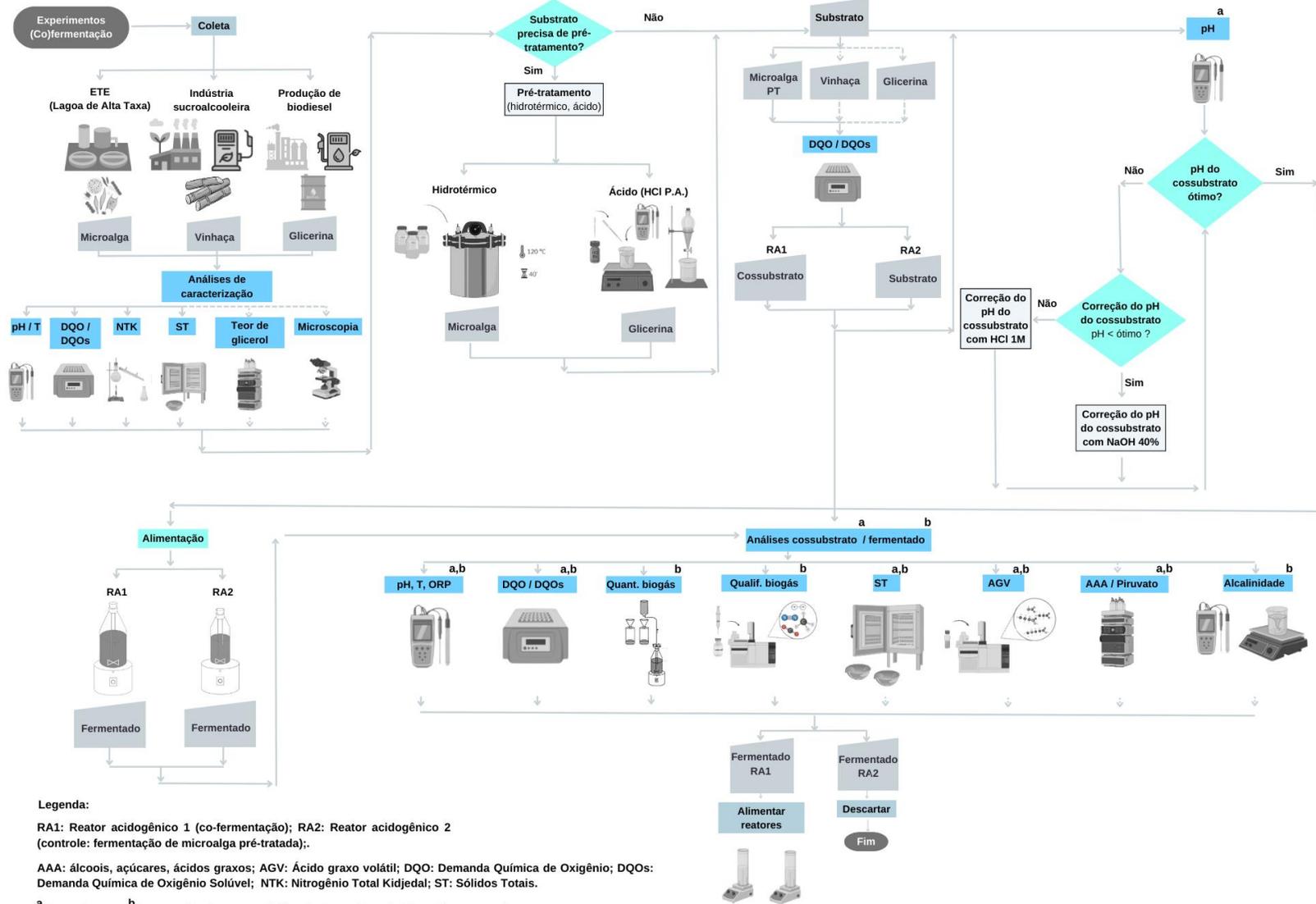
Fonte: A Autora (2024).

Nota: Y_{AGV} significa rendimento de ácidos graxos voláteis; SC significa sem controle; $[AGV]_{\text{máx}}$ significa concentração máxima de AGV. ^aValor total referente a ácidos orgânicos voláteis e solventes.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A presente pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Saneamento Ambiental (LSA), no Centro de Tecnologia e Geociências (CTG) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), em Recife, Pernambuco, Brasil. A Figura 6 apresenta um resumo esquemático dos materiais e métodos desta pesquisa.

Figura 6 – Fluxograma dos materiais e métodos desta pesquisa.



Fonte: a autora (2024).

4.1 SUBSTRATOS

4.1.1 Biomassa microalgal pré-tratada hidrotérmicamente (BMPT)

A biomassa microalgal (Figura 10) foi coletada de uma lagoa de alta taxa (LAT) piloto (Figuras 7), a qual realiza pós-tratamento de efluente de reator anaeróbico de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB)(Figura 8). O reator UASB e a LAT estão instalados na Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) Mangueira, no município do Recife, Pernambuco (Figura 7).

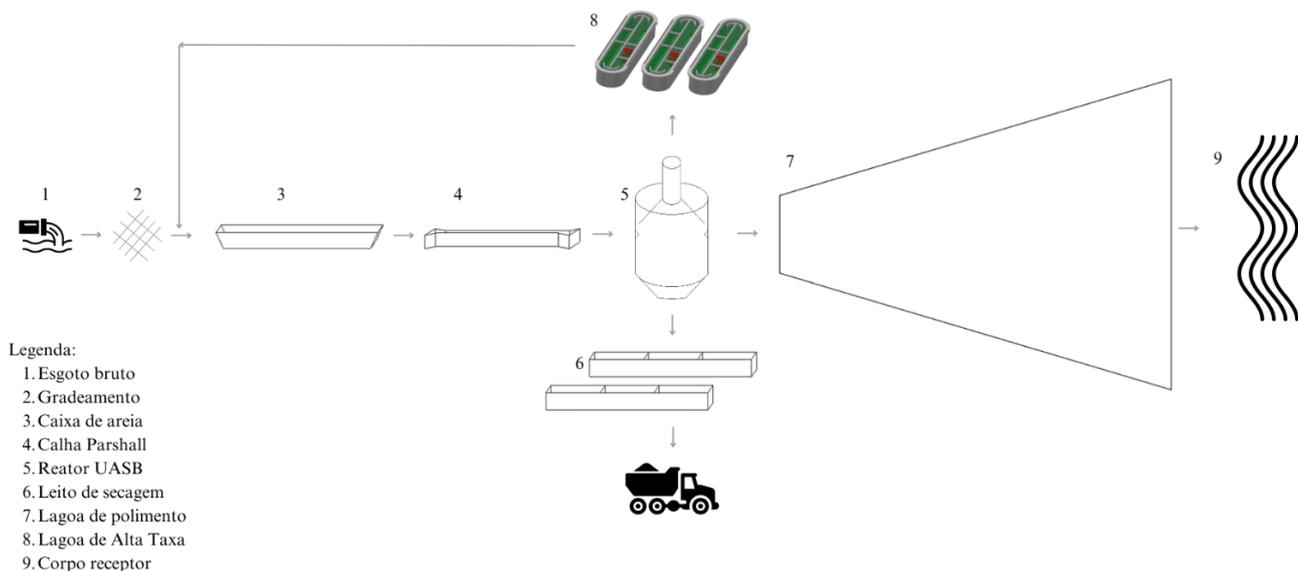
Figura 7 - Localização da ETE Mangueira, Recife, Brasil, e da LAT.



Fonte: Adaptado do *Google Earth*® (2024); a autora (2023).

A Figura 8 apresenta a representação esquemática da ETE Mangueira.

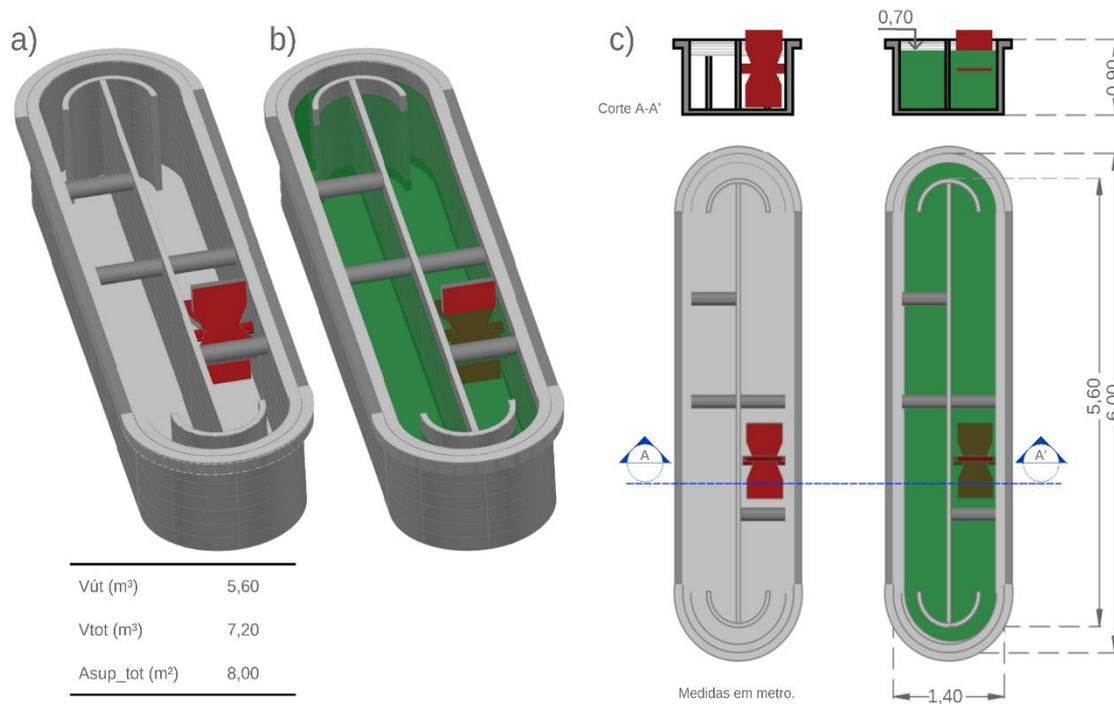
Figura 8 - Representação esquemática da ETE Mangueira.



Fonte: A autora (2024).

A Figura 9 ilustra as principais características da LAT.

Figura 9 - Representação esquemática da Lagoa de Alta Taxa, elaborada no *software* Civil3D®: a) LAT, em perspectiva e vazia; b) LAT, em perspectiva e cheia; c) Corte e planta baixa da LAT vazia e cheia.



Fonte: A autora (2024).

Foram realizadas 4 coletas (Figura 10), com auxílio de peneira de aço inoxidável, abertura 0,250 mm, e de água deionizada, para sua lavagem e concentração. Ao longo do estudo, a LAT foi conduzida sem variações nas condições operacionais (Santos Neto, 2023). Após a coleta, foram determinadas a composição microscópica das microalgas (microscópio Leica-DME), caracterização de variáveis físico-químicas (Tabela 10). A biomassa microalgal foi então armazenada a 4 °C, seguindo-se de etapa de pré-tratamento.

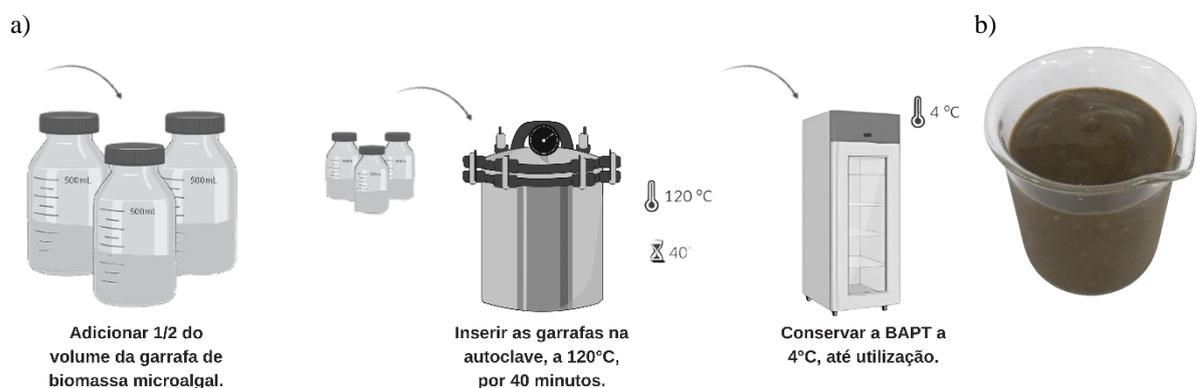
Figura 10 - Coleta da biomassa microalgal: concentração da biomassa microalgal, com peneira de abertura 0,250 mm.



Fonte: a autora (2023).

O pré-tratamento hidrotérmico utilizado foi adaptado de Martins (2019), em biomassa microalgal da mesma LAT deste estudo. O procedimento pode ser resumido da seguinte forma (Figura 11a): introdução de 250 mL de biomassa microalgal em frascos de boro-silicato, de 500 mL; os frascos foram introduzidos em autoclave (Phoenix, 50 litros, pressão máxima de 3 kgf/cm²), a 120 °C, por 40 min; após alcançar a temperatura ambiente, a biomassa microalgal pré-tratada (BMPT) foi caracterizada e armazenada a 4 °C. A Figura 11b representa a biomassa microalgal após o pré-tratamento.

Figura 11 - Pré-tratamento hidrotérmico aplicado à biomassa microalgal: a) metodologia; (b) biomassa microalgal pré-tratada.



Fonte: a) adaptado de Martins (2019); a autora (2023).

4.1.2 Vinhaça da cana-de-açúcar

Vinhaça da cana-de-açúcar foi coletada em uma usina sucroalcooleira, localizada no município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco (Figura 12a). Foram realizadas duas coletas

durante a safra 2022/2023, a fim de se obter características similares entre as amostras coletadas. As amostras (Figura 12b) foram armazenadas a 4°C e caracterizadas por variáveis físico-químicas quando da utilização nos testes (Tabela 10).

Figura 12 - Coleta da vinhaça: (a) usina sucroalcooleira; (b) vinhaça de cana-de-açúcar.

a)



b)



Fonte: a) *Google Earth*®, adaptado (2024); b) a autora (2023).

4.1.3 Glicerol residual

Glicerol residual, da produção de biodiesel, a partir de óleo de cozinha e álcool, foi obtido na Biorrefinaria Experimental de Resíduos Sólidos Orgânicos (BERSO), situada no Departamento de Energia Nuclear (DEN), da Universidade Federal de Pernambuco, campus Recife (Figuras 13a e 13b).

Figura 13 – a) Localização do Departamento de Energia Nuclear (DEN), da UFPE, e a Usina Piloto de Biodiesel; b) glicerina bruta.

a)



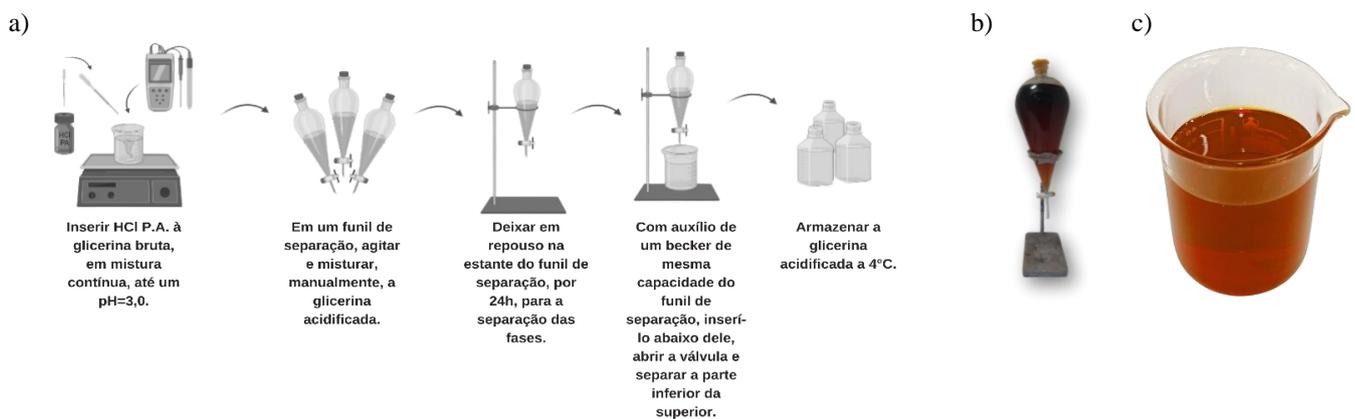
b)



Fonte: a) *Google Earth*®, adaptado (2024), UFPE, adaptado (2019); b) a autora (2023).

À fim de reduzir as impurezas, e aumentar o percentual de glicerol na amostra, um pré-tratamento químico para sua purificação, baseado em Hu *et al.*, (2012), foi realizado. As etapas do pré-tratamento podem ser simplificadas (Figura 14a), como segue: ácido clorídrico concentrado foi adicionado à glicerina, até o pH do meio atingir 3,0; a glicerina acidificada foi submetida à separação de fases durante 24 horas em um funil de separação; após a separação das fases, a fração com maior teor de glicerol foi coletado e armazenado a 4 °C até sua caracterização e utilização nos testes. A Figura 14b apresenta o processo de separação de fases, no funil de separação, e a Figura 14c, a glicerina purificada.

Figura 14 - Pré-tratamento químico, com HCl P.A. aplicado à glicerina residual: a) metodologia; b) separação de fases, no funil de separação; c) glicerina purificada.

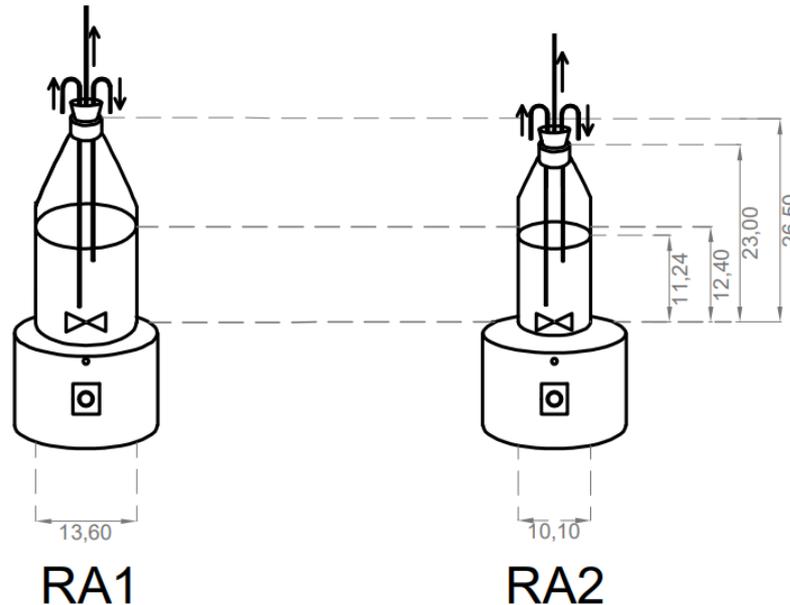


Fonte: a) adaptado de Hu *et al.*, 2012; b) e c) a autora (2023).

4.2 Configuração experimental

O experimento de cofermentação foi realizado em um frasco reator construído em borossilicato, com volume total de 2,2 L, dotado de 20% de headspace (volume útil de 1,8L), denominado reator acidogênico (RA1). Um outro frasco reator de 0,9 L de volume útil foi operado como reator controle, durante a estratégia IIA, (RA2) (Figura 15). Os fermentadores funcionaram sob agitação magnética de 150 RPM, e regime de alimentação semi-contínuo, 1 vez por dia, 5 vezes por semana, em condições mesofílicas a $30 \pm 2^\circ\text{C}$.

Figura 15 - Representação esquemática dos reatores e suas dimensões, feitas no AutoCAD®. Medidas em centímetros. Fermentador RA1, à esquerda, e controle, RA2, à direita.



Fonte: a autora (2023).

O fermentador RA1 foi previamente operado por 202 dias (Pinheiro, 2023), antes de ser iniciado o presente trabalho. Assim, o RA1 não precisou ser inoculado e já apresentava biomassa adaptada à cofermentação microalga misturada à vinhaça.

Neste trabalho, o período de operação do RA1 durou 340 dias, divididos em 6 fases, nas quais ocorreram variações no afluente (cossustrato) no TDH, COV e pH (Tabela 8). O RA1 foi alimentado com a mistura BMPT+VIN nas fases I-A, I-B, I-C, I-D enquanto a mistura BMPT+GLI foi usada como cossustrato nas fases II-A e II-B. As misturas binárias consistiram em razões 50:50% (BMPT:VIN) em termos de DQO nas fases I-A, I-B, I-C, I-D e 70:30% (BMPT:GLI) nas fases II-A e II-B. Essas proporções foram baseadas em um trabalho anterior,

desenvolvido por Silva *et al.* (2024), na busca pelo maior efeito sinérgico, positivo, entre os substratos avaliados.

O fermentador RA2 foi alimentado apenas com BMPT e operado por 86 dias como reator controle das fases II-A e II-B. O RA2, portanto, seguiu as condições de TDH e COV estabelecidas nestas fases para o RA1.

Tabela 8 - Configurações operacionais testadas nas 6 fases experimentais.

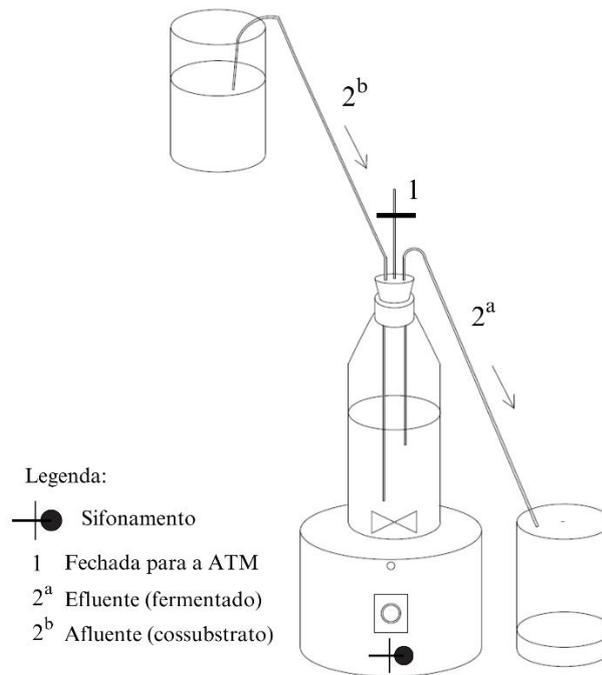
Período (d)	Duração (d)	Fase	Substratos	COV teórica (kgDQO.m ⁻³ .d ⁻¹)	TDH (d)
01-38	37	I-A	BMPT+VIN	5,62	4
39-107	68	I-B	BMPT+VIN	5,62	3
108-171	63	I-C	BMPT+VIN	11,25	3
172-244	72	I-D	BMPT+VIN	11,25	2
245-279	34	II-A	BMPT+GLI	11,25	2
280-346	66	II-B	BMPT+GLI	11,25	4

4.3 Regimes de alimentação e descarga

À fim de analisar a influência do tipo de alimentação, o trabalho experimentou 2 formas de alimentação: por sifonamento (Figura 16) e sob pressão atmosférica (Figura 17).

A alimentação por sifonamento ocorreu manualmente, da seguinte forma: a mangueira ligada ao mariote, que quantifica o volume de metano produzido, é desacoplada dele e fechada. O béquer, com o cossustrato, é colocado aproximadamente 30 cm acima do nível d'água do reator e o béquer efluente, inicialmente vazio, abaixo do nível mais baixo do reator, para promover uma diferença de potencial suficiente para que o sifonamento ocorra. Com o auxílio inicial de uma seringa descartável, do tipo catéter, sem agulha, de 60 mL, aplica-se uma pressão negativa dentro do reator, aspirando o cossustrato, do béquer. Imediatamente, a seringa é retirada e o fluxo de alimentação/descarga é iniciado, com o mínimo de intrusão atmosférica.

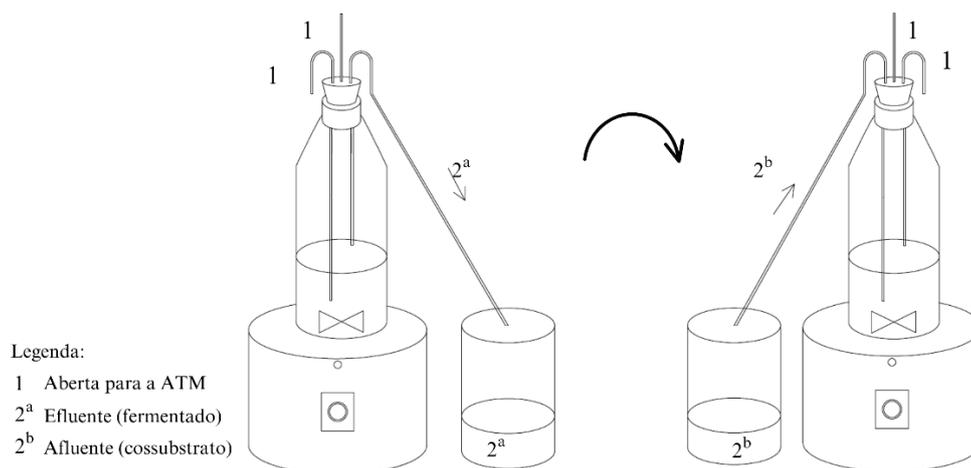
Figura 16 - Representação esquemática da alimentação sob regime de sifonamento, elaborada no AutoCAD®.



Fonte: a autora (2024).

A alimentação, sob pressão atmosférica, ocorreu da seguinte forma: a mangueira ligada ao mariote, que quantifica o volume de metano produzido, é desacoplada dele e aberta para a atmosfera, assim como a mangueira afluente. Com o auxílio de uma seringa descartável, do tipo catéter, sem agulha, de 60 mL, o efluente é primeiramente descarregado, na sua vazão diária. Em seguida, o cossubstrato é colocado, com o auxílio de um funil. Só então, fecha-se o sistema novamente.

Figura 17- Representação esquemática da alimentação sob pressão atmosférica, elaborada no AutoCAD®.



Fonte: a autora (2024).

4.4 Métodos analíticos

Os substratos (BMPT, VIN e GLI) foram caracterizados na preparação do cossustrato para o reator RA. Foram avaliados os valores de pH, sólidos totais (ST), sólidos totais voláteis (STV), Nitrogênio Total Kjeldahl (NTK), demanda química de oxigênio total e solúvel (DQO e DQOs, respectivamente) seguindo métodos analíticos *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA,2017).

O grau de solubilização (SD) foi calculado utilizando a Equação 28, na qual DQO_s é a concentração de DQO solúvel após o pré-tratamento, a DQO_{s0} , a concentração de DQO solúvel antes do pré-tratamento e a DQO, a concentração de DQO total antes do pré-tratamento (Donoso-Bravo *et al.*, 2011).

$$SD(\%) = \frac{DQO_s - DQO_{s0}}{DQO - DQO_{s0}} \times 100 \quad (28)$$

O cossustrato e o fermentado (efluente do reator acidogênico) foram caracterizados quanto ao pH, potencial redox (ORP) e temperatura, utilizando o equipamento multiparâmetro (HQ40d, Hach Instruments). Análises de DQO, DQOs, alcalinidades total e parcial, ST, STV, NTK também foram realizadas pelo menos 3 vezes por semana.

A quantificação de AGV foi realizada através de um cromatógrafo gasoso, com detecção por ionização de chama (GC-FID) Agilent Technologies 7890A. O método analítico pode ser descrito como segue: coluna J&W GC Column DB-WAXERT 122- 7332 (30 m 250 μm x 0,25 μm), gás de arraste H_2 ; modo de injeção Split, 1:10; volume de injeção 2 μL ; 250 $^\circ\text{C}$, como temperatura do injetor; fluxo na coluna, 1,0 mL/min; temperatura do forno, 200 $^\circ\text{C}$; temperatura do detector, 300 $^\circ\text{C}$. Os ácidos analisados foram: acético, propiônico, isobutírico, butírico, isopentanoico, pentanoico e capróico.

A conversão das unidades dos AGV individuais, obtidas pela análise de AGV no cromatógrafo gasoso, deu-se a partir da multiplicação de seus resultados individuais por seus respectivos DQO's equivalentes. Conforme Dahiya *et al.* (2023), foram: 1,07, para o HAc; 1,51, para HProp; 1,82, para os HBut e isoHBut; 2,04, para os HPent e isoHPent; 2,2, para o HCap.

Os rendimentos de AGV (Y_{AGV} , %) foram estimados usando a Equação 29, que considera a concentração de AGV como DQO (AGV_{DQO} , g/L), o TDH (dias) e a carga orgânica volumétrica aplicada (g/L.d).

$$Y_{AGV}(\%) = \frac{AGV_{DQO}}{TDH} \times \frac{1}{COV} \times 100 \quad (29)$$

Nas fases II-A e II-B, o percentual de glicerol foi obtido por cromatografia líquida de alta eficiência (LC-20AT, Shimadzu, Japão), com detector de índice de refração (RID-10A). As configurações do método cromatográfico foram: coluna Aminex HPX-87H 300 x 7,8 mm (BIORAD, EUA), a 40 °C, fluxo de fase móvel (H₂SO₄, 5 mM), de 0,6 mL.min⁻¹ e volume de injeção de 20 µL. A Tabela 9 sintetiza as variáveis e métodos analíticos adotados para caracterização dos substratos, cossustratos e fermentados.

Tabela 9 - Parâmetros e respectivos métodos analíticos utilizados na caracterização dos substratos, cossustratos e fermentados.

Parâmetro	Unidade	Método analítico
Demanda Química de Oxigênio (DQO)	mg O ₂ .L ⁻¹	Colorimétrico (5220 D, APHA (2017))
DQO solúvel (DQO _s)	mg O ₂ .L ⁻¹	Colorimétrico (5220 D, APHA (2017))
Microscopia (microalga)	-	Microscopia (magnificação 10x e 40x)
Nitrogênio Total (NTK)	mg.L ⁻¹	Titulométrico (4500-NTK B, APHA (2017))
pH	-	Eletrométrico (4500-H ⁺ B, APHA (2017))
Série de sólidos (ST, STV)	mg.L ⁻¹	Gravimétrico (2540 B, D, E, APHA (2017))
Temperatura	°C	Eletrométrico (2550B, APHA (2017))
Teor de glicerol	%	Cromatografia líquida

A razão entre a disponibilidade de carbono e de nitrogênio (C/N) dos substratos e cossustratos foi estimada usando a Equação 30, considerando a fração de carbono orgânico total (expresso pela DQO) (Carmo & Silva, 2012), dividido pela concentração do NTK.

$$C/N = \frac{0,425 \times DQO(mg/L) - 2,064}{NTK (mg/L)} \quad (30)$$

A produção quantitativa de biogás pela fermentação no RA1 foi medida de acordo com Aquino *et al.* (2007), pelo método gravimétrico, a partir do deslocamento de solução de hidróxido de sódio (NaOH – 3% m/v). Os volumes acumulados de metano foram convertidos para as Condições Normal de Temperatura e Pressão (CNTP). Amostras do biogás foram coletadas no *headspace* do RA1 e do reator controle (RA2) e analisadas para detecção da composição em metano, hidrogênio, dióxido de carbono e nitrogênio em cromatógrafo Agilent Technologies GC 7890 A, acoplado a detector de condutividade térmica (TCD). A descrição

do método pode ser sintetizada como segue: coluna capilar (Carboxen 1010 PLOT, 30m x 0,53mm); modo de injeção 50:1; volume de injeção 0,2 mL, temperatura do injetor 100 °C; ar, como gás de arraste; fluxo na coluna 3 mL/min; temperatura do forno, 150 °C; temperatura do detector, 200 °C; tempo de corrida, 3,5 min.

Para o cálculo do tempo de detenção hidráulico (TDH), considerou-se o volume útil do reator ($V_{\text{útil}}$) e a vazão diária (Q) (Equação 31):

$$TDH = \frac{V_{\text{útil}}}{Q} \quad (31)$$

A carga orgânica volumétrica (COV) foi definida de acordo com a literatura e, através de sua fórmula (Equação 32), foi calculada a concentração C_2 , em DQO correspondente da mistura, em termos de DQO, seguindo a Equação 33, na qual Q é a vazão diária e $V_{\text{útil}}$, o volume útil do reator (Equação 32).

$$COV = \frac{Q \times C_2}{V_{\text{útil}}} = \frac{C_2}{TDH} \quad (32)$$

$$C_2 = \frac{COV * V_{\text{útil}}}{Q} \quad (33)$$

Para o cálculo do cossustrato, o volume de cada substrato foi obtido através da Equação 34, onde V_1 é a incógnita, ou seja, é o volume do substrato a ser adicionado na mistura; C_1 é a concentração do substrato, obtida na análise de DQO; C_2 é a concentração da mistura (Equação 33), e Q , é o volume diário (ou vazão).

$$V_1 = \frac{C_2 \times Q}{C_1} \quad (34)$$

4.5 Metabólitos da degradação do glicerol (Fase II-B)

As vias metabólicas oxidativas e redutivas da degradação do glicerol foram estudadas na fase II-B. Assim, os álcoois (etanol, glicerol, 1,3 propanodiol), açúcares (glicose, frutose), ácidos (lático, succínico) e piruvato foram analisados em amostras do cossustrato e do fermentado coletadas nessa fase. Os álcoois e açúcares foram determinados por HPLC-RAD, com condições metodológicas similares ao do método de determinação do glicerol. O piruvato foi determinado em amostras do cossustrato e do fermentado por HPLC acoplado a um detector UV-Vis (Shimadzu LC-20AT, coluna Biorad Aminex HPX-87H, fase móvel de ácido sulfúrico 5mM, fluxo móvel de 0,8 mL/min, volume de injeção de 20 uL, 40°C a temperatura do forno.

Para avaliar a rota predominante, oxidativa ou redutiva, do cossustrato e da cofermentação entre BMPT e GLI, foram somadas as médias das concentrações, em mg.L⁻¹, dos intermediários analisados nos cromatógrafos. Para o glicerol, a média de glicerol; para a rota oxidativa, foi considerada a soma das médias dos piruvato, HAc, HBut, etanol, HLat, HSuc; para a rota redutiva, o 1,3 PPD.

5 RESULTADOS

Nesta seção são apresentados os resultados da metodologia aplicada.

5.1 Caracterização dos substratos

Nesta seção serão abordados os resultados das análises obtidos das coletas da microalga, microalga pré-tratada hidrotérmicamente, vinhaça e glicerina. A Tabela 10 apresenta a média e desvio padrão dos parâmetros dos substratos individuais.

Tabela 10 - Caracterização dos substratos coletados (média \pm desvio padrão).

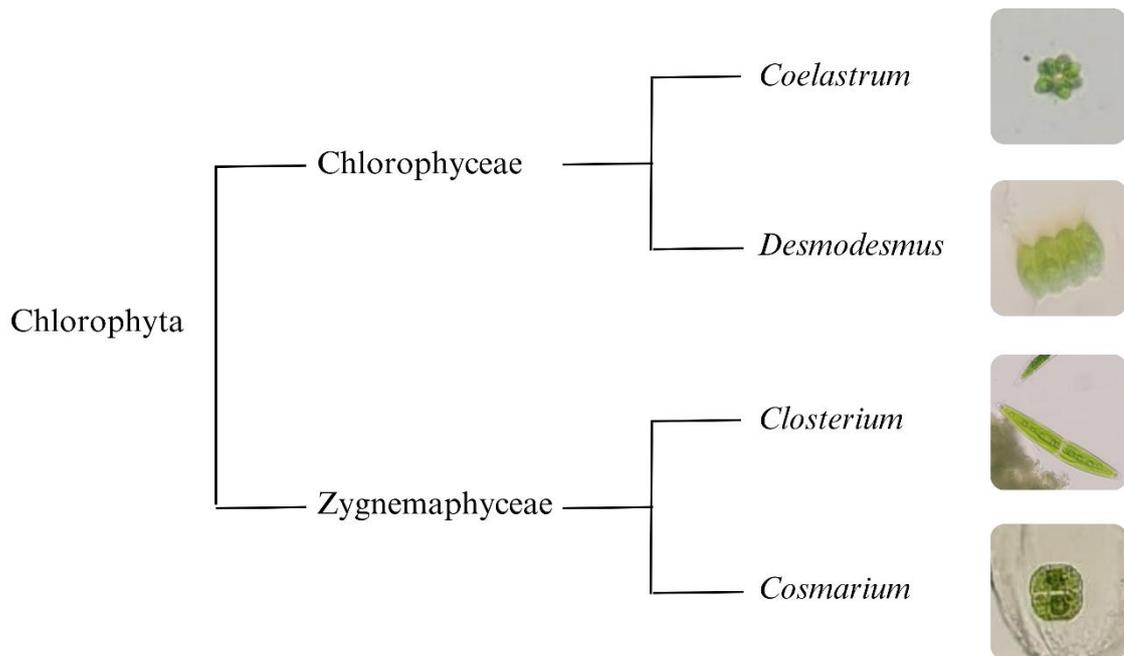
Parâmetros	BM	BMPT	VIN	GLI
C/N	14,2	21,5	48,8	n.a. ²
DQO (g O ₂ .L ⁻¹)	46 \pm 13,5	52 \pm 23,1	27 \pm 2,5	1231 \pm 4,1
DQOs (g O ₂ .L ⁻¹)	3,4 \pm 3,5	11,1 \pm 6,1	15,7 \pm 1	992 \pm 10,8
Na (mg.L ⁻¹)	100 \pm 2	n.a. ²	37 \pm 1	31198 \pm 1621
NTK (mg.L ⁻¹)	1380 \pm 454	1138 \pm 214	239 \pm 123	n.d. ¹
pH	7,3 \pm 0,3	7,6 \pm 0,1	3,7 \pm 0	3,0
ST (g.L ⁻¹)	33,4 \pm 27,4	26,7 \pm 3,6	57,6 \pm 34,3	482,6 \pm 30,7
STV (g.L ⁻¹)	27,1 \pm 22,8	19,4 \pm 2,4	10,3 \pm 4,2	376,9 \pm 26,6
Teor de glicerol (%)	n.a. ²	n.a. ²	n.a. ²	55

Nota: ¹ n.d. significa abaixo do limite de detecção; ² n.a. significa não avaliado.

5.1.1 Microalga e microalga pré-tratada

Foram identificados quatro gêneros de microalgas predominantes nas quatro coletas realizadas: *Desmodesmus*, *Cosmarium*, *Closterium* e *Coelastrum*. A Figura 18 indica o filo, classe, gênero e as imagens das microscopias realizadas em cada coleta.

Figura 18 – Identificação do filo, classe, gênero e as imagens das microscopias realizadas em cada coleta.



Fonte: A autora (2023).

O pH da BM e da BMPT manteve-se neutro, dentro da faixa ideal para a digestão, citada por Fuess *et al.*, (2023), de 7,4, e de Strazzera *et al.*, (2021), de 7,0, trabalhando com vinhaça e resíduos alimentares, respectivamente.

A relação C/N da microalga bruta foi de 14,2 (Tabela 10), abaixo da faixa ideal referenciada por Nghiem *et al.*, (2017) e Vázquez-Fernández *et al.*, (2022), entre 20 e 30, para a digestão, no fornecimento de nutrientes e uma forma de buscar a não inibição da DA. A alta concentração de NTK está relacionada à característica das microalgas, que são ricas em proteína, em suas composições, conforme já visto.

Após o pré-tratamento, essa razão passou de 14,2 para 21,5. Esse resultado deve-se ao fato de a DQOs aumentar 226,5% e o NTK reduzir 17,5%. Explica-se esse incremento na DQOs devido ao pré-tratamento ter favorecido a solubilização da matéria orgânica, apresentando um grau de 18%, 12,5% maior do que o encontrado por Pinheiro (2023), que teve aproximadamente 16%. Com relação à redução do NTK, durante o processo de pré-tratamento, os frascos de borossilicato não são totalmente vedados, para evitar que a ebulição da microalga, que consiste na formação de uma camada de espuma, devido à presença de proteínas, açúcares e o vapor de água; com o aumento de pressão, essa espuma é “empurrada para cima”, aumentando a pressão no frasco, que pode levar ao seu rompimento (o que aconteceu algumas vezes). Essa folga na vedação, permite perdas, tanto do substrato, que pode extravasar do frasco ou se esse se romper, assim como o escape de nitrogênio na forma gasosa. Embora tenha resultado dentro do limite

inferior da faixa ideal, a busca por uma maior disponibilidade de carbono, como cossustrato foi aplicada.

Devido às características físicas da BMPT, com a duplicação da COV, sua consistência gelatinosa imprimiu dificuldades no seu manuseio, provocando entupimentos nas mangueiras e conexões dos reatores. Esse efeito foi minimizado, já no fim do experimento, processando essa BMPT em um liquidificador.

5.1.2 Vinhaça

Foram realizadas duas coletas para a vinhaça, que apresentaram características diferentes. O segundo lote apresentou maior valor de NTK, um incremento em quase 50%, comparando-se com a concentração do primeiro lote, o que influenciou nos resultados de AGV, conforme discutido no item 5.2. A vinhaça apresentou relação C/N acima da faixa ideal, adequada para fornecer uma relação mais equilibrada, ao misturar com o outro substrato.

Com relação ao pH, o caráter fortemente ácido está relacionado ao processo de produção do etanol, com o emprego de ácido H_2SO_4 no caldo da cana-de-açúcar, antes da fermentação (Fuess & Garcia, 2014). Fuess *et al.* (2023) trabalharam com vinhaças com pH entre 4,5 e 4,7.

5.1.3 Glicerol residual

Foi realizada no glicerol residual a análise de teor de glicerol, que apontou 40%. Para aumentar esse percentual, um pré-tratamento ácido (Figura 14a), baseado em Hu *et al.* (2012), foi aplicado, alcançando 55%. Esse baixo grau pode estar ligado à matéria-prima usada para a produção do biodiesel, ao tipo de triglicerídeo contido no óleo vegetal, gerando um glicerol bruto contendo água, sais, metanol e outros compostos orgânicos (Quispe *et al.*, 2013). Thompson e He (2006) avaliaram várias matérias-primas e o teor de glicerol variou entre 60 e 70%.

Destacam-se, também, as altas concentrações de DQO e de DQO_s, que podem estar associadas ao conteúdo da glicerina, e a baixa concentração de NTK, aquém do limite de detecção. Esses resultados são compatíveis com os encontrados por Silva *et al.*, (2024), com DQO de 854,8 g O₂.L⁻¹, e o NTK abaixo da detecção. Não foram realizadas análises de proteínas na glicerina e não foram encontrados relatos de altas concentrações dessas nesse tipo de substrato, na literatura pesquisada, o que pode justificar as concentrações abaixo do limite de detecção.

5.2 Caracterização dos cossustrato

A Tabela 11 apresenta as médias, com seus respectivos desvios-padrão, dos cossustratos, durante todo o experimento.

Tabela 11- Principais características de alimentação do substrato usado para alimentar o RA1 durante as fases (média \pm desvio padrão).

Parâmetros	Fase I (BMPT + VIN)				Fase II (BMPT + GLI)	
	I-A	I-B	I-C	I-D	II-A	II-B
C/N	8,12	33,4	126,84	9,55	67,01	21,18
DQO (g.L ⁻¹)	20,8 \pm 3,0	20,1 \pm 4,4	40,7 \pm 12,6	22,2 \pm 3,9	29,6 \pm 18,8	37,6 \pm 10,2
DQO _s (g.L ⁻¹)	11,3 \pm 2,0	11,3 \pm 2,1	16,4 \pm 2,1	10,1 \pm 1,8	15,9 \pm 0,1	15,1 \pm 5,4
NTK(mg.L ⁻¹)	1089 \pm 195	256 \pm 47	136 \pm 17	987 \pm 182	187 \pm 2	754 \pm 273
pH	4,8 \pm 0,1	4,9 \pm 0,1	4,7 \pm 0,1	4,7 \pm 0,1	6,5 \pm 0,1	5,7 \pm 0,1
pH corrigido	5.5 \pm 0.1	5.5 \pm 0.1	6.0 \pm 0.1	5.0 \pm 0.1	5.0 \pm 0.1	5.0 \pm 0.1
ST (g.L ⁻¹)	17,85	16,9 \pm 0,65	38,8 \pm 16,47	15,98 \pm 1,63	22,44 \pm 0,43	19,44 \pm 4,79
STV (g.L ⁻¹)	12,68	12,69 \pm 0,43	29,73 \pm 12,79	12,29 \pm 1,34	17,33 \pm 0,32	15,3 \pm 4,36

Fonte: A autora (2024).

Conforme discutido no item 3.4.5, a faixa ideal relatada na literatura para a relação C/N, para a DA ocorrer sem inibição, é entre 20 e 30. Pode-se observar que apenas a fase II-B esteve dentro desse intervalo, e a I-B, próximo ao limite superior; as fases I-A e I-D, abaixo, e a I-C e II-A muito acima. As elevadas razões das fases I-C e II-A conduziram aos menores volumes de biogás, dentre todas as fases (Tabela 12). Esses resultados são compatíveis com os de Harsha & Singh, (2021), que relatam que para altas razões de C/N, baixos rendimentos de biogás são produzidos, devido à rápida absorção do nitrogênio. Nas fases I-A e I-D, as altas concentrações de NTK levaram às suas baixas razões C/N, o que pode causar falhas na acidogênese, pela formação de compostos tóxicos para os microrganismos. De fato, pode-se observar, na Figura 19, na fase I-D, dia 210, que houve uma queda de 88% na produção de AGV. Isso pode ter sido devido à troca de lote da vinhaça, essa que apresentou maiores concentrações de NTK. A partir dessa substituição, verifica-se que os AGV totais produzidos chegaram aos mesmos patamares dos da fase I-A, indicando que, provavelmente, pelas altas concentrações do NTK, a acidogênese pode ter sofrido inibição.

A faixa de pH ideal para o primeiro estágio da DA é entre 5,2 e 11, dependendo do substrato e intermediários de interesse (An *et al.*, 2024; Lee *et al.*, 2014). Durante todas as fases

I (BMPT + VIN), os cossubstratos apresentaram pH entre 4,7 e 4,9, necessitando ser ajustado com NaOH 40%. Nas fases I-A e I-B, para 5,5. Com a duplicação da COV, e baseada nos estudos de Strazzera *et al.*, (2021) e Ferguson *et al.* 2016, que observaram que altas COV resultam na queda do pH, para a fase I-C, o pH foi corrigido para 6,0, alcançando as maiores médias e rendimentos de AGV (Tabela 12 e Figura 19). Para a fase I-D, optou-se por corrigir o pH do cossubstrato para 5,0, para entender seu desempenho. Com a troca do cossubstrato para glicerina, ajustou-se o pH para 5,0, com HCl 1M, devido ao pH dos cossubstratos estarem entre 5,7 e 6,5. Optou-se por essa escolha para minimizar a produção de 1,3 PPD pois, na fermentação, a rota redutiva pode ser favorecida para valores entre 6,5 e 7,5 (Asopa *et al.*, 2022).

Para TDH maiores, menores volumes de substratos são utilizados na alimentação e, conseqüentemente, menores volumes de fermentado, na sua descarga. Para indústrias, tratar menores volumes não é interessante, por isso testou-se a adequação a TDH menores. Conforme referenciado na Equação 31, nos menores TDH, maiores vazões de carga e descarga foram empregados, que pode ter levado a um rearranjo nas comunidades microbianas envolvidas. Da troca de substrato, para a glicerina, nas fases II, devido a suas características intrínsecas, alta DQO (> 1000 g/L), menor volume de glicerina foi introduzido à mistura. No entanto, percebeu-se, com os resultados, grande influência desse substrato.

Com relação a COV, a duplicação, na fase I-C, resultou no aumento da DQO e DQOs (Tabela 11), assim como da viscosidade do afluente, como esperado.

Com a substituição dos substratos, resultados diferentes foram observados, fato que culminou em uma busca para entender o que estava acontecendo, analisando também, para AGV, álcoois e açúcares, os cossubstratos. Observou-se, na Figura 22b, alta variabilidade na concentração de glicérol afluente, a presença de intermediários, como os AGV ora citados, com exceção do HCap, HLat e de piruvato. Paralelamente, em comparação com o reator controle RA2, só com BMPT, esse não apresentou, em nenhuma das amostras do cossubstrato, HAc, HisoBut, HCap, glicérol, 1,3 PPD, inferindo-se à contribuição da glicerina no cossubstrato do RA1.

5.3 Efeitos da COV e do TDH no desempenho da fermentação

Os efeitos de diferentes TDH e COV na produção de AGV foram estudados durante quase um ano de teste de fermentação acidogênica. Foram adotadas duas misturas diferentes de substratos: ii) primeiro, a mistura BMPT-VIN (dias 1-244), ii) depois, uma mistura BMPT-GLI

(dias 245-346). As características físico-químicas do fermentado, incluindo a concentração do total de AGV e o rendimento correspondente, estão resumidas na Tabela 12.

Tabela 12 - Média e desvio padrão dos dados de fermentação ao longo do tempo

Parâmetros	I-A	I-B	I-C	I-D	II-A	II-B
pH	6,3 ± 0,2	5,1 ± 0,3	5,5 ± 0,5	5,3 ± 0,2	5,5 ± 0,2	5,4 ± 0,3
ORP (mV)	-345 ± 12	-251 ± 49	-284 ± 44	-286 ± 32	18 ± 85	-40 ± 34
DQO (gO ₂ .L ⁻¹)	18,7 ± 4,7	13,4 ± 1,8	35,3 ± 8,4	25,6 ± 3,7	26,8 ± 11,3	36,1 ± 5,3
ST (g.L ⁻¹)	14,5 ± 0,8	10,2 ± 0,1	22,9 ± 5,3	-	-	21,9 ± 1,9
STV (g.L ⁻¹)	9,2 ± 1,1	7,1 ± 0,1	14,9 ± 3,8	-	-	16,9 ± 1,4
NTK (mg.L ⁻¹)	14,3 ± 4,2	57,5 ± 38,6	178 ± 102	84,8 ± 48,7	-	-
Biogás (mL.d ⁻¹)	889 ± 637	647 ± 545	603 ± 234	772 ± 101	72,5 ± 68,2	123 ± 82
AGV (mg DQO.L ⁻¹)	3.842 ± 691,5	5.000,5 ± 998,2	13.856,3 ± 3.582,3	12.731,1 ± 10.802,2	508,4 ± 238,3	1.260 ± 625,1
AGV _{máx} (mg DQO.L ⁻¹)	5.009,97	6.687,23	23.242,27	34.067,85	997,93	2.450,49
Y _{AGV} (%)	14,4 ± 1,3	30,1 ± 5,7	39 ± 6,7	25,7 ± 8	1,8 ± 0,6	2,6 ± 1,1
HAc (mg DQO.L ⁻¹)	219,4 ± 155,7	1.437,8 ± 562,5	4.884,2 ± 1.624	4.298,4 ± 3.491,5	278,3 ± 122,5	591 ± 265,5
HProp (mg DQO.L ⁻¹)	969,5 ± 385,5	1.102 ± 295,4	4.058 ± 1.265	2.524 ± 2.134,2	80,4 ± 48	321,5 ± 164
HBut ¹ (mg DQO.L ⁻¹)	1.001 ± 841	1.254,2 ± 429	2.544,6 ± 736,2	3.311,8 ± 3.032	86,3 ± 54,7	195,6 ± 140
HPent ² (mg DQO.L ⁻¹)	1.519 ± 177	1.050 ± 155	2.073,2 ± 309,5	2.135,1 ± 1.860	58,7 ± 28,7	135,6 ± 119
HCap (mg DQO.L ⁻¹)	133,3 ± 51,6	157 ± 51	296,6 ± 84,5	462,1 ± 527,2	4,7 ± 3,3	16,5 ± 33,6

Fonte: A autora (2024).

¹ Somatório dos ácidos isobutanoico e butanoico; ² somatório dos ácidos isopentanoico e pentanoico.

5.3.1 Misturas BMPT-VIN (fases I-A, I-B, I-C e I-D)

A primeira configuração operacional ocorreu com BMPT-VIN com TDH de 4 dias e COV de 5,65 g DQO.L⁻¹.d⁻¹. Após uma fase de inicialização preliminar, o reator atingiu a condição de estado estável em cerca de uma semana desde o início da campanha experimental, ou seja, em cerca de dois TDH. Este curto tempo está associado à operação anterior do reator que já ocorria sob as mesmas condições operacionais (Pinheiro *et al.*, 2024). A condição de estado estacionário foi caracterizada por uma concentração média de 3,8 g AGV_{DQO}/L, correspondendo a um rendimento de 14,4%.

A redução do TDH de 4 para 3 dias (fase I-B) com a mistura BMPT-VIN melhorou o desempenho de produção de AGV. O sistema atingiu concentração e conversão de DQO em AGV de 5,0 g AGV_{DQO}/L e de 30,1%, respectivamente, com TDH de 3 dias e representou um melhor desempenho que pode ser explicado considerando os compostos químicos dos

substratos, especialmente da VIN, geralmente representados por estruturas químicas muito biodegradáveis, como açúcares e álcoois, que precisam de pouco tempo para serem convertidos a AGV (Christofolletti *et al.*, 2013). Um estudo realizado por Eng *et al.* (2022) apresentou um desempenho muito semelhante com um rendimento de AGV de 33,2% (com base na DQO), a partir da monofermentação da vinhaça de cana-de-açúcar em temperatura mesofílica. Consequentemente, a adoção da VIN permitiu a melhoria da conversão de AGV, que geralmente é menor para a biomassa de microalgas, na faixa de 10-15% (Cho *et al.*, 2015).

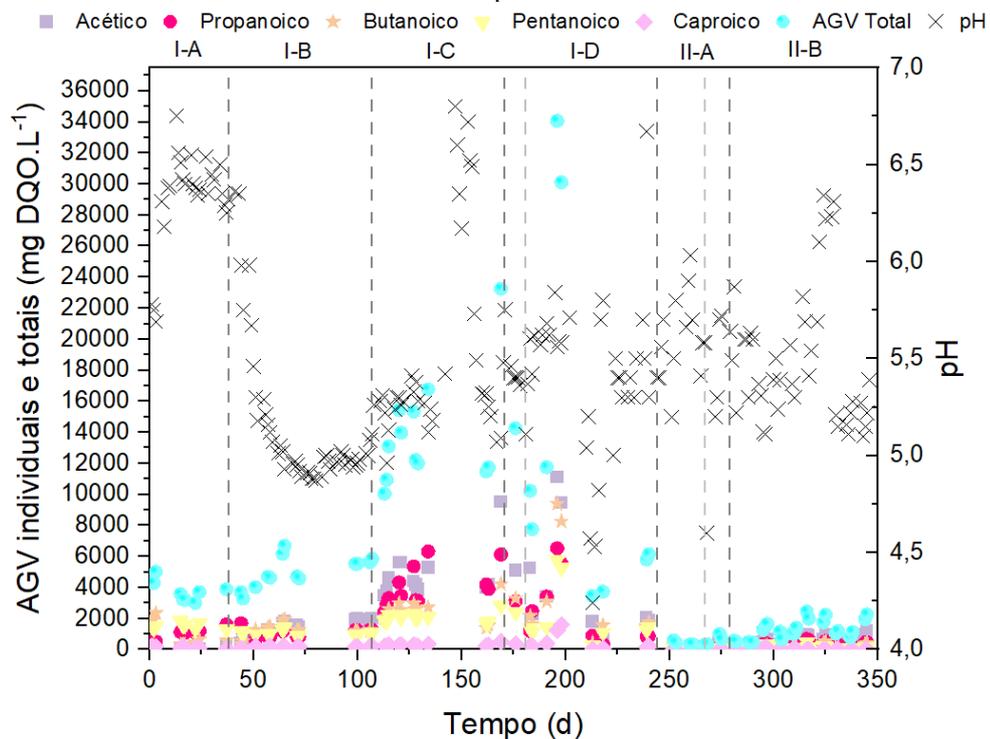
Conforme relatado, o desempenho do sistema com TDH de 3 dias foi melhor que com o de 4 dias. Isso se deveu à alta cinética de hidrólise e conversão em AGV de compostos simples presentes nos substratos. Consequentemente, o TDH superior a 3 dias causou o início da passagem da fermentação acidogênica para a metanogênica, com a consequente conversão dos AGV em metano (Rizzioli *et al.*, 2024). Essa teoria também é consistente com os dados de produção de biogás obtidos no reator. O primeiro estágio experimental (fase I-A) realizado com TDH de 4 dias apresentou a maior produção de biogás, de cerca de 900 mL/d (Tabela 12).

O TDH de 3 dias foi mantido constante na fase operacional seguinte (fase I-C), enquanto a COV foi dobrada de 5,62 para 11,25 g DQO/Ld. O aumento desta variável resultou em efeito positivo na fermentação acidogênica, cuja concentração de AGV foi elevada para 13,8 g AGV_{DQO}/L e o rendimento de conversão subiu para 39%. A COV é considerada outro parâmetro fundamental na fermentação acidogênica: na literatura encontra-se demonstrado que uma COV baixa favorece a fase metanogênica da digestão anaeróbia, enquanto valores altos levam à formação de AGV, inibindo os microrganismos metanogênicos ((Bolzonella *et al.*, 2018; Leite *et al.*, 2023). Diversos trabalhos já demonstraram que bons rendimentos de AGV foram obtidos quando a COV foi superior a 10 g DQO.L⁻¹d⁻¹ (Strazzera *et al.*, 2021). Entretanto, é importante considerar que a COV superior a 20 g DQO.L⁻¹d⁻¹ pode ser responsável pela inibição da fermentação acidogênica, com uma produção instável de AGV e pela impossibilidade de atingir uma condição de estado estacionário (Cheng *et al.*, 2016).

A COV de 11,25 g DQO/Ld foi testada na fase operacional seguinte (I-D), mas com um valor de TDH menor, 2 dias. Em geral, os resultados mostraram uma redução da concentração e do rendimento de AGV, que foram de 12,7 g AGV_{DQO}/L e 25,75%, respectivamente. Além disso, é notável observar que o fermentador apresentou maior variabilidade na produção de AGV (elevado desvio padrão, Tabela 12). Isso demonstra que o tempo reacional nesta fase não foi longo suficiente para garantir uma hidrólise ideal e estável e a conversão da BMPT-VIN em AGV. Consequentemente, o TDH de 3 dias foi o melhor para a otimização desses substratos em AGV.

As alterações no TDH e na COV também influenciaram no perfil dos AGV (Figura 20). Os ácidos HPent e HBut foram os predominantes, representando cerca de 39% e 26% do total de AGV durante a fase I-A, caracterizada pelo TDH mais longo e a COV mais baixa, 4 dias e 5,62 gDQO.L⁻¹d⁻¹, respectivamente. O aumento da COV para 11,25 gDQO.L⁻¹d⁻¹ e a manutenção do TDH em 3 dias (fase I-C) favoreceu a formação dos AGV mais curtos, os ácidos acético e propiônico, que representaram cerca de 35,2% e 29,3% do total de AGV. Na fase I-D, a redução para TDH de 2 dias promoveu os HAc e HBut, com 33,8% e 26%, respectivamente. Isso foi consistente com trabalhos de pesquisa anteriores sobre a fermentação acidogênica (Possente *et al.*, 2022), que observaram que a produção de AGV de maior cadeia carbônica, como os ácidos butírico, pentanoico e caproico, geralmente requerem um TDH mais longo e uma razão molar específica entre os compostos doadores de elétrons, ou seja, etanol e ácido láctico, e receptor final de elétrons, ou seja, os AGV.

Figura 19 - Variação temporal do AGV total e individuais e variação do valor do pH do meio reacional ao longo das fases experimentais.



Fonte: A autora (2024).

5.3.2 Misturas BMPT-GLI (fases II-A e II-B)

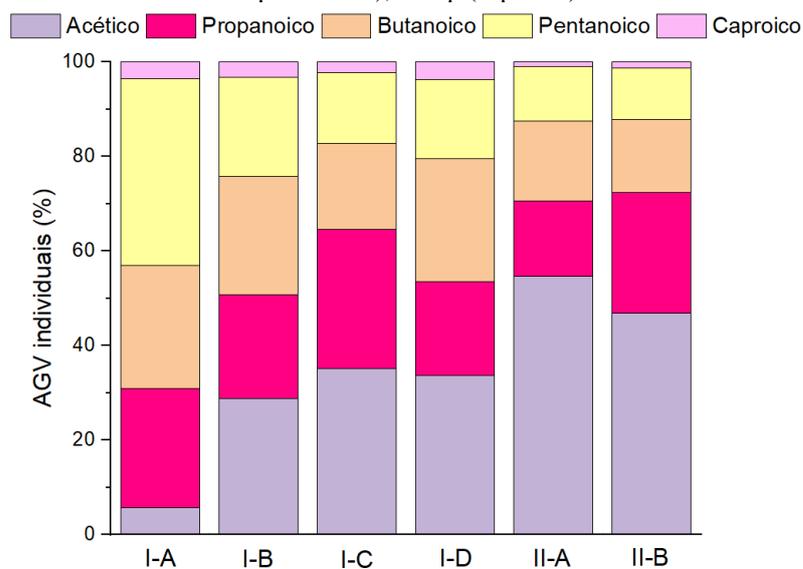
A fermentação acidogênica também foi realizada na mistura BMPT-GLI ao longo das duas últimas etapas do experimento, fases II-A e II-B. O desempenho da fermentação de AGV

foi baixo, especialmente com o menor TDH de 2 dias (Figura 19). O glicerol é um dos substratos mais adotados para a produção de AGV e metano por digestão anaeróbia. Pesquisas anteriores alcançaram alta produção específica de metano na faixa de 300-380 LCH₄/kgSV (Viana *et al.*, 2012). Como os AGV são os intermediários biológicos da produção de metano por digestão anaeróbia, a presença de metano significa uma formação prévia desses compostos nos mesmos reatores. De toda forma, os baixos rendimentos obtidos com a mistura BMPT-GLI podem ser explicados pelo alto teor de glicerol, que inibiu tanto os AGV quanto os microrganismos produtores de metano. Alguns autores demonstraram o início dos efeitos inibitórios sobre as vias metabólicas quando o glicerol bruto está na faixa entre 0,9 e 1,5 g/L ou para concentrações superiores a 1% v/v (Fountoulakis *et al.*, 2010). Considerando o valor médio da DQO afluente variando entre 30 e 35 g/L para as fases II-A e II-B (Tabela 11) e a proporção BMPT-GLI de 70:30, é possível estimar que a concentração média de GLI na mistura variou entre 9,0 e 10,5 gDQO.L⁻¹ nas fases II-A e II-B, respectivamente. Esses valores estão acima das concentrações inibidoras (mencionado anteriormente) e podem explicar a redução do rendimento de AGV. Por fim, é interessante observar que aumento do TDH de 2 para 4 dias na fase experimental II-B levou ao aumento do rendimento de AGV de 1,80 para 2,58%, o que demonstrou que o sistema precisava de mais tempo para degradar os intermediários derivados da hidrólise do glicerol.

5.4 Efeito do TDH e da COV na dinâmica dos AGV individuais

Em termos do perfil de AGV, os ácidos HPent (39,5%), HBut (26%) e HProp (25,3%) foram predominantes na fase I-A (Figura 20). A predominância de ácidos de cadeia ímpar está associada à composição proteica do substrato (Llamas *et al.*, 2022; Regueira *et al.*, 2020; Whang *et al.*, 2020). Nessa fase, a porcentagem de HAc foi a mais baixa (5,7%), o que pode indicar a presença de arqueas acetoclásticas que o metabolizaram. Somente nessa estratégia a relação HProp/HAc excedeu 1,4 (4,4), condição limitante relacionada a falhas do processo fermentativo (Zhang *et al.*, 2014). Portanto, o TDH foi reduzido para forçar a expulsão dos organismos metanogênicos na fase seguinte.

Figura 20 -Composição de AGV individual nas diferentes fases experimentais. Os ácidos são: HAc (acético), HProp (propiônico), HBut (soma do butanoico e do isobutanoico), HPent (soma do pentanoico e do isopentanoico), HCap (caproico).



Fonte: A autora (2024).

Na estratégia I-B, a redução do TDH e a correção do pH para 5,5 promoveram o acúmulo de AGV em comparação com a fase anterior, resultando em uma diminuição do pH do meio de reação (Figura 19). O perfil de AGV mudou com HAc, HProp e HBut destacando-se, com composição de 40%, 22% e 19% do AGV total, respectivamente (Figura 20).

Na fase I-C, o efeito da duplicação da COV ($11,25 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) mantendo-se o TDH (3 dias) foi analisado. Uma vez que o valor do pH tende a diminuir em condições de alta carga orgânica (Strazzera *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2014), o pH do afluente foi corrigido para 6,0, o que resultou no valor de $5,5 \pm 0,5$ no fermentado e no maior rendimento médio de AGV de todo o experimento. O perfil de AGV da fase I-C foi HAc (35,3%), HProp (29,3%) e HBut (18,4%).

Na fase I-D, o fermentador foi conduzido sob a mesma condição de COV ($11,25 \text{ kgDQO/m}^3.\text{d}$), porém com menor TDH o que proporcionou diminuição na produção de AGV (comentado anteriormente). Outro fator relacionado aos resultados desta fase é a mudança do lote da VIN, a qual apresentou menor concentração de DQO e maior concentração de NTK em comparação com o primeiro lote, resultando em um alto desvio padrão ($239 \pm 123 \text{ mg/L}$, Tabela 10). Assim, houve uma diminuição na concentração de DQO do afluente e um aumento na concentração de NTK do fermentador, o que promoveu uma menor diluição do NTK da MB. O perfil de AGV na fase I-D foi HAc (33,8%), HBut (26%) e HProp (20%) (Figura 20).

Quando a VIN foi substituída pela GLI, as condições de operação da fase I-D foram mantidas. Conforme já relatado, esta foi a combinação mais desfavorável para a produção de

AGV, mostrando uma redução de aproximadamente 88% no rendimento, chegando a $1,80 \pm 0,60\%$ g AGV_{DQO}/gDQO_{afluente}, o que pode ser relacionado ao alto teor de glicerol, à sobrecarga do fermentador, tempo de detenção insuficiente para os microrganismos metabolizarem os cossustratos e/ou à presença de compostos tóxicos não identificados.

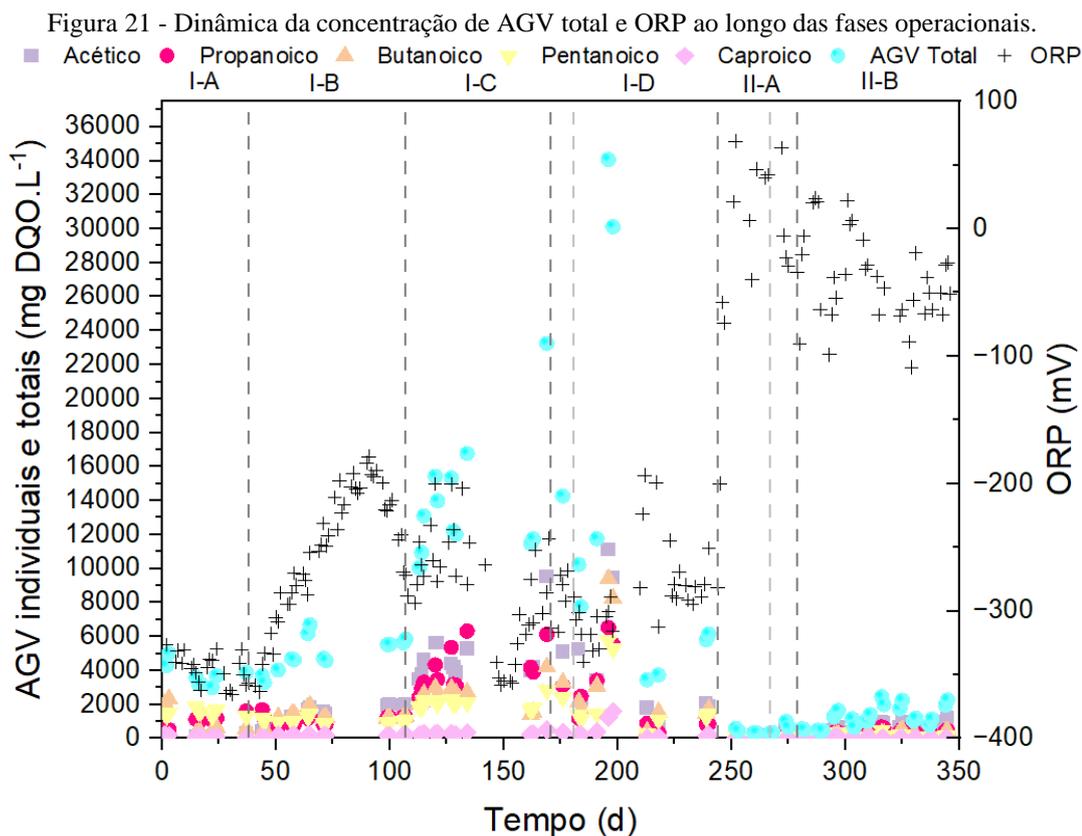
Os AGV predominantes nas fases II-A foram HAc (54,7%), seguidos por HBut (17%) e HProp (15,8%) e, na fase II-B, HAc (47%), HProp (25,5%) e HBut (15,5%) (Figura 20). A maior porcentagem de HAc produzida pode estar relacionada à produção de álcool devido à substituição da VIN pelo GLI. A fermentação do álcool por bactérias acetogênicas em temperaturas mesofílicas leva à produção de HAc (Quispe, Coronado, Carvalho Jr., 2013; Wang *et al.*, 2020). Durante o catabolismo bacteriano, mais NAD⁺ pode ser produzido na via de produção de HProp do que na fermentação de HBut. Quando há um maior rendimento de NADH no meio, o HProp tende a ser formado naturalmente, de modo que haja uma relação NADH/NAD⁺ adequada equilibrada (Silva *et al.*, 2020).

5.5 Influência do ORP na produção de AGV

O potencial redox foi monitorado diariamente durante todo o experimento de fermentação acidogênica. De acordo com Wang *et al.* (2020), o potencial redox reflete as condições ambientais das reações bioquímicas e indica a uma possível alteração das vias metabólicas e por consequência, a formação de metabólitos.

5.5.1 Misturas BMPT-VIN

Conforme discutido, os compostos químicos presentes nos substratos, especialmente na VIN usada nas estratégias I-A a ID, exigem menos tempo para serem degradados e convertidos em AGV (Wang *et al.*, 2020). Assim, verificou-se que o TDH de 4 dias foi suficiente dar suporte à codigestão entre -300 e -400 mV (Tabela 12 e Figura 21). Yin *et al.* (2016) concluíram que o ORP entre -200 e -300 mV, e o valor de pH 6,0, não são adequados para as reações fermentativas em resíduo de alimentos. Pandey *et al.* (2022) relataram que a metanogênese é possível em uma faixa abaixo de -230 mV, enquanto Wang *et al.* (2014) relataram ORP abaixo de -350 mV.



Fonte: A autora (2024).

A redução do TDH de 4 para 3d, fase I-B, pode ter resultado na eliminação de organismos metanogênicos do reator, levando a um aumento da ORP e a uma reconfiguração do perfil de AGV (Figura 21). Nas outras estratégias, o ORP permaneceu entre -200 e -330 mV (Figura 21), com abundância de ácidos acético, propanoico e butanoico (Figura 20).

Entre os dias 181 e 266, que incluíam as fases I-D e II-A, a alimentação do fermentador ocorreu com o *headspace* aberto e, durante o período em que o cossustrato foi a vinhaça, o ORP ficou abaixo de -200 mV (Figura 21), isto é, não houve significativa transferência de oxigênio do ar para o meio líquido e por isso o potencial de oxidação-redução não apresentou variação diferente do que em outras fases, sob sifonamento. Yin *et al.* (2016) estudaram a fermentação de resíduos de alimentos em condições de aeração limitada e anaeróbias, e seus resultados confirmam os encontrados na literatura: na faixa de -100 e -200 mV, obtiveram uma concentração máxima de 29,4 g/L de AGV total, enquanto no ORP entre -200 e -300 mV, 17,98 g/L. Outro estudo relatou que a acidogênese é favorecida entre -100 e -250 mV (Lim *et al.*, 2014). Nesses estudos, os ácidos HBut, HAc e HProp também foram encontrados em proporções mais altas. No presente trabalho, uma concentração máxima de 34,1 g AGV_{DQO}/L

foi alcançada na fase I-D, quando o ORP registrou valor -310mV (Figura 21), com regime de alimentação sob pressão atmosférica.

Conforme verificado na fase I-D, a alimentação com *headspace* aberto não provocou alterações diferentes das outras fases I, do valor do ORP, em comparação com o tipo por sifonamento, porém a partir da introdução do glicerol (II-A), houve um aumento de 106% no potencial de oxidação-redução, resultando em valores positivos de ORP (Tabela 12 e Figura 21).

5.5.2 Mistura BMPT-GLI.

Chen *et al.* (2013) verificaram que uma alta concentração de glicerol (60 g/L) foi totalmente convertida a subprodutos após 13 horas de metabolismo, por uma cultura pura especializada, resultando em acúmulo de ácido propiônico com valor de ORP final de 15 mV. Entre as fases II-A e II-B houve aumento da proporção de HProp e diminuição de HAc o que coincide com o estudo mencionado. Porém, a cofermentação do presente estudo, foi realizada com microbioma aberto (biomassa mista). Portanto, o efeito do acúmulo de HProp não é positiva para a toda comunidade bacteriana, o que sustenta a hipótese da inibição da atividade acidogênica na presença do glicerol.

De acordo com Vesga-Baron *et al.* (2021), variações no ORP interferem diretamente nos processos metabólicos por meio das relações intracelulares NADH/NAD⁺ que afetam por consequência as reações da fermentação escura, incluindo as reações de ferredoxina e formiato hidrogenase. Os autores ressaltam, ainda, que as principais enzimas na produção de H₂ são afetadas, os valores de ORP influenciam também a produção de metabólitos da fermentação no escuro.

Outra hipótese para a baixa produtividade de AGV e elevação do ORP nas fases II-A e II-B é a influência da salinidade do glicerol. O glicerol apresentou 31.200 mg Na⁺/L, portanto a concentração média de Na⁺ afluyente nas fases II-A e II-B foi de 178,5 e 84,9 mg/L, respectivamente. Essas concentrações estão na faixa estimulante para o tratamento anaeróbio e não representam um fator inibitório devido à salinidade, cujo valor relatado está acima de 3.500 mg/L (Liu *et al.*, 2017; Mccarty, 1964).

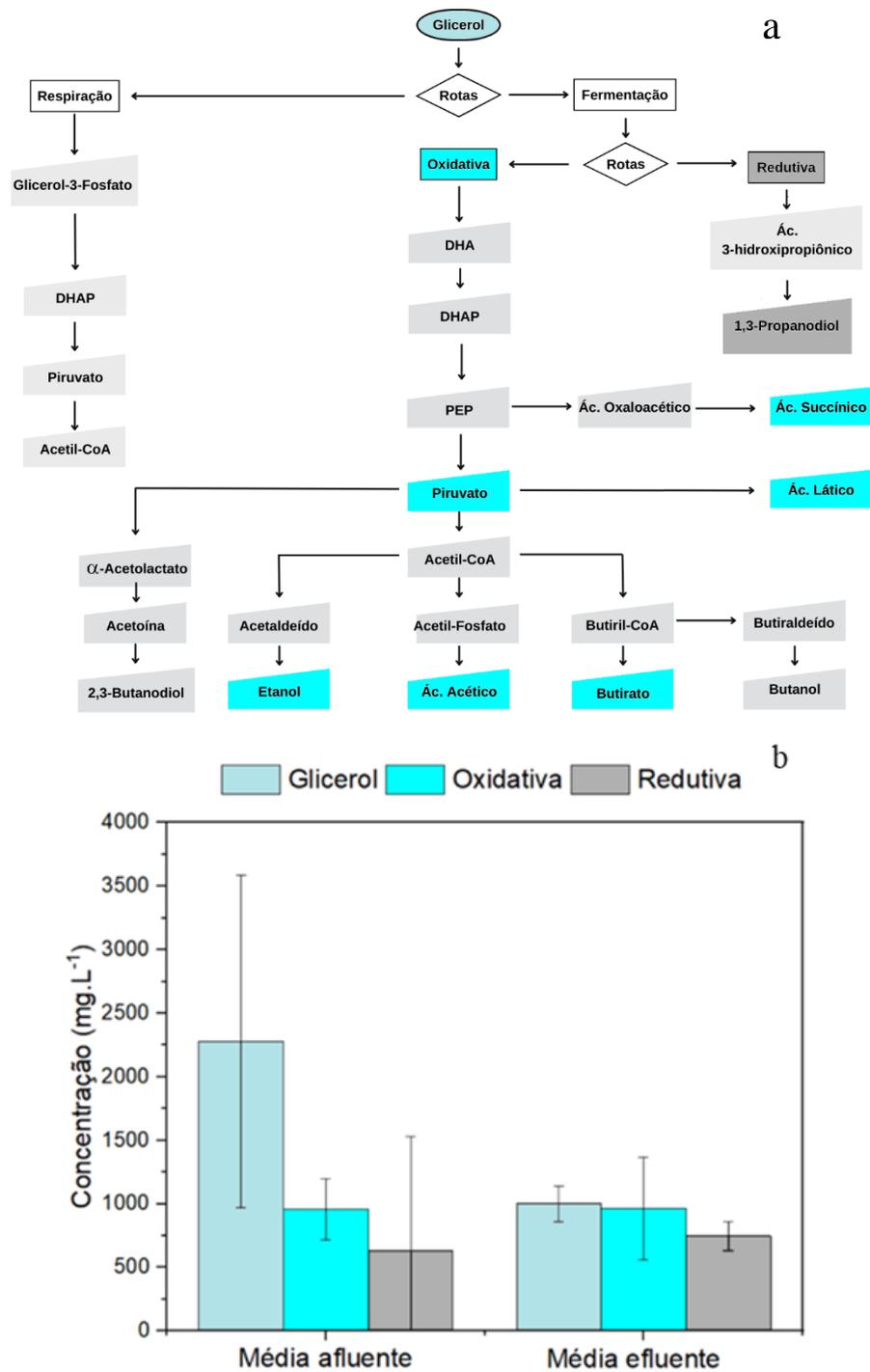
5.6 Produtos de fermentação da fase II-B e inferência de rotas metabólicas de degradação

Devido aos baixos rendimentos de AGV nas fases II-A e II-B e elevação do valor do ORP, foram realizadas análises de álcoois, açúcares e piruvato para identificar a possível rota e os produtos da cofermentação de BMPT e GLI.

A Figura 22a mostra as vias de fermentação do GLI. Pode-se observar que a rota oxidativa produz piruvato, os ácidos HAc, HBut, Iso-HBut, succínico (HSuc) e láctico (HLat), etanol e butanol. Por outro lado, a via redutiva produz 1,3-propanodiol (1,3-PPD). Asopa et al. (2022) e Veras et al. (2020) relatam que a GLI, por ser de natureza reduzida, tende a produzir produtos reduzidos, como o 1,3 PPD. Importante ressaltar que não foram identificadas concentrações de HSuc e 1,3 PPD no fermentado do RA2 (reator controle). A produção de AGV total no RA2 variou entre 1,2 e 2,2 g/L e foi composta por HAc, HProp, HBut além de etanol (entre 200 e 400 mg/L). Verifica-se, portanto, que a rota oxidativa é favorecida com a presença da microalga pré-tratada, ao passo que o glicerol é um substrato que suportou também o metabolismo redutivo de microrganismos. De fato, os resultados mostraram que o GLI foi consumido em cerca de 22%, produzindo um aumento médio na rota oxidativa de 12%, consistindo principalmente de HAc, HBut. Já na rota redutiva, houve aumento de 10% na concentração de 1,3 propanodiol. Assim, verifica-se que a fermentação ocorreu pelas duas rotas metabólicas, com produção de AGV concorrendo com a produção de 1,3 propanodiol.

A coexistência de rotas metabólicas é associada ao tipo de microrganismo presente no fermentador. Uma vez que o inóculo é misto, é alta a possibilidade de suporte das rotas oxidativas e fermentativas em que a transferência de elétrons nas reações catabólicas e anabólicas resultam em um valor de ORP balanceado (Liu *et al.*, 2013).

Figura 22 - Vias metabólicas do glicerol (a) e composição de produtos metabólicos das rotas oxidativas e fermentativas, destacando-se os compostos considerados (b). A rota oxidativa inclui os ácidos HAc, iso-HBut, HBut, HSuc, HLat, etanol e piruvato. A rota redutora inclui o 1,3-propanodiol.



Fonte: A autora (2024).

6 CONCLUSÃO

A cofermentação de biomassa de microalgas com vinhaça e com glicerol em combinações binárias resultou em produção de altas concentrações de ácidos graxos voláteis e outros subprodutos metabólicos que variariam ao longo das fases operacionais. Pode-se concluir que:

- a) O desempenho da fermentação acidogênica foi superior com TDH de 3 dias devido à alta cinética de hidrólise e conversão em AGV. A operação com TDH superior a 3 dias beneficiou microrganismos metanogênicos. A concentração de glicerol no cossubstrato do reator impediu a análise da relação entre TDH e a fermentação do glicerol;
- b) O aumento da COV resultou em efeito positivo na fermentação acidogênica, elevando a concentração de AGV para 13,80 g AGV_{DQO}/L e o rendimento de conversão para aproximadamente 40%. O manejo da COV foi importante pois altas cargas favoreceram a formação de AGV, inibindo a metanogênese;
- c) A alimentação com headspace aberto não provocou alteração do valor do ORP, porém, a partir da introdução do glicerol (II-A), houve um aumento de 106% no potencial de oxidação-redução, resultando em valores positivos de ORP;
- d) A máxima concentração de AGV (34,1 g AGV_{DQO}/L) foi alcançada na fase I-D com ORP de -310 mV. Nas outras estratégias, a fermentação ocorreu com valor de ORP entre -200 e -330 mV, o que proporcionou abundância HAc, HProp e HBut. A fermentação do glicerol ocorreu entre rotas metabólicas e maior equilíbrio do ORP (valores próximos a zero);
- e) A rota oxidativa foi favorecida pela presença da microalga pré-tratada, enquanto o glicerol suportou o metabolismo redutivo de microrganismos. O GLI foi consumido em cerca de 22%, aumentando a rota oxidativa em 12%, produzindo principalmente HAc, HSuc, e HBut. Na rota redutiva, a concentração de 1,3-propanodiol aumentou em 10%.

Verificou-se, portanto, que o processo de cofermentação tem um benefício estratégico na produção de AGV. A mistura com glicerol resultou em condições limitantes do desempenho do processo porém observações importantes sobre a rota metabólica e o efeito da biomassa de microalga foram inferidos. Para futuros estudos recomenda-se:

- a) Realizar testes de fermentação do glicerol como único substrato e misturado à microalga pré-tratada utilizando concentrações mais baixas (entre 5 e 10 g/L de glicerol);

- b) Estudar o fluxo de elétrons, a razão entre NAD^+ e NADH para auxiliar nas interpretações do estado redox dos microrganismos acidogênicos;
- c) Analisar a comunidade bacteriana envolvida na fermentação e associar aos resultados de produção de AGV e às rotas metabólicas de conversão;
- d) Otimizar o tempo de teste em cada fase, aplicando a representatividade do índice de período operacional (RIOP), que relaciona um tempo de referência para repetição de testes (ex: 30 dias) e o tempo de detenção hidráulico estipulado para cada fase (Fuess *et al.* 2023).

REFERÊNCIAS

- Agnihotri, S., Yin, D. M., Mahboubi, A., Sapmaz, T., Varjani, S., Qiao, W., Koseoglu-Imer, D. Y., & Taherzadeh, M. J. (2022). A Glimpse of the World of Volatile Fatty Acids Production and Application: A review. In *Bioengineered* (Vol. 13, Issue 1, pp. 1249–1275). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1996044>
- An, X., Xu, Y., & Dai, X. (2024). Biohythane production from two-stage anaerobic digestion of food waste: A review. In *Journal of Environmental Sciences (China)* (Vol. 139, pp. 334–349). Chinese Academy of Sciences. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2023.04.031>
- ANP (Agência Nacional de Petróleo Gás Natural e Biocombustíveis) (2023b) Anhydrous and hydrated ethanol production (2013–2022). Disponível em: <https://www.gov.br/anp/pt-br/centrais-de-contudo/dados-abertos/ano-estatistico-2023> (in Portuguese) . Acesso em: 5 mai 2024.
- Anukam, A., Mohammadi, A., Naqvi, M., & Granström, K. (2019). A review of the chemistry of anaerobic digestion: Methods of accelerating and optimizing process efficiency. In *Processes* (Vol. 7, Issue 8, pp. 1–19). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/PR7080504>
- APHA, AWWA, and WPCF. Standard methods for the examination of water and wastewater, 25th ed. Baltimore: Port City Press, 2017.
- Aquino, S. F., & Chernicharo, C. A. L. (2005). Acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGVS) em reatores anaeróbios sob estresse: causas e estratégias de controle. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 10, n. 2, p. 152-161, 2005.
- Aquino, F. Aquino; Chernicharo, Carlos A. L.; Foresti, Eugênio; Florencio, Maria de Lourdes dos Santos; Monteggia, Luiz. O. Metodologias para determinação da atividade metanogênica específica (AME) em lodos anaeróbios. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 192–201, 2007.
- Asopa, R. P., Bhoi, R., & Saharan, V. K. (2022). Valorization of glycerol into value-added products: A comprehensive review on biochemical route. In *Bioresource Technology Reports* (Vol. 20). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.101290>
- Asunis, F., De Gioannis, G., Dessì, P., Isipato, M., Lens, P. N., Muntoni, A., Poletini, A., Pomi, R., Rossi, A., Spiga, D. (2020). The dairy biorefinery: Integrating treatment processes for cheese whey valorisation. *Journal of environmental Management*, 276, 111240.
- Bolzonella, D., Battista, F., Cavinato, C., Gottardo, M., Micolucci, F., Lyberatos, G., & Pavan, P. (2018). Recent developments in biohythane production from household food wastes: A review. In *Bioresource Technology* (Vol. 257, pp. 311–319). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.02.092>
- Buitrón, G., Carrillo-Reyes, J., Morales, M., Faraloni, C., & Torzillo, G. (2017). Biohydrogen production from microalgae. In *Microalgae-based biofuels and bioproducts* (pp. 209-234). Woodhead Publishing.
- Cabral e Silva, A. S. Codigestão anaeróbia de resíduos orgânicos visando a produção de metano. 2020. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) - Universidade Federal de Pernambuco, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Orientador: Maria de Lourdes Florencio dos Santos. Disponível em:

<https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/40163/1/DISSERTA%C3%87%C3%83O%20Alyne%20Soares%20Cabral%20e%20Silva.pdf>

Cardoso Ribeiro, J., Mota, V. T., Maia de Oliveira, V., Dacanal, G. C., & Zaiat, M. (2022). Hydrogen and organic acid production from dark fermentation of sugarcane vinasse without buffers in mesophilic and thermophilic conditions. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 97(6), 1585–1596. <https://doi.org/10.1002/jctb.7003>

Carmo, D. L.; Silva, C. A. Métodos de quantificação de carbono e matéria orgânica em resíduos orgânicos. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 36, p. 1211-1220, 2012.

Chen, F., Feng, X. H., Liang, J. F., Xu, H., & Ouyang, P. K. (2013). An oxidoreduction potential shift control strategy for high purity propionic acid production by *Propionibacterium freudenreichii* CCTCC M207015 with glycerol as sole carbon source. *Bioprocess and biosystems engineering*, 36, 1165-1176.

Cheng, J., Ding, L., Lin, R., Yue, L., Liu, J., Zhou, J., & Cen, K. (2016). Fermentative biohydrogen and biomethane co-production from mixture of food waste and sewage sludge: Effects of physiochemical properties and mix ratios on fermentation performance. *Applied energy*, 184, 1-8.

Chernicharo, C. A. L. *Reatores Anaeróbios*. 2. ed. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental-UFMG, Belo Horizonte, Brasil, 2016, 379 p.

Chilakamarry, C. R., Mimi Sakinah, A. M., Zularisam, A. W., Pandey, A., & Vo, D. V. N. (2021). Technological perspectives for utilisation of waste glycerol for the production of biofuels: A review. In *Environmental Technology and Innovation* (Vol. 24). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101902>

Chilakamarry, C. R., Sakinah, A. M., Zularisam, A. W., & Pandey, A. (2021). Glycerol waste to value added products and its potential applications. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*, 1(4), 378-396.

Chisti, Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*. v.25. p.294-306, 2007.

Cho, H. U., Kim, Y. M., Choi, Y. N., Xu, X., Shin, D. Y., & Park, J. M. (2015). Effects of pH control and concentration on microbial oil production from *Chlorella vulgaris* cultivated in the effluent of a low-cost organic waste fermentation system producing volatile fatty acids. *Bioresource technology*, 184, 245-250.

Christofoletti, C. A., Escher, J. P., Correia, J. E., Marinho, J. F. U., & Fontanetti, C. S. (2013). Sugarcane vinasse: environmental implications of its use. *Waste management*, 33(12), 2752-2761.

CONAB, C. N. de A. (2023). Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar. Safra 2022/23, quarto levantamento, n. 4. (pp. 1–49). CONAB. <http://www.conab.gov.br>

Dahiya, S., Lingam, Y., & Venkata Mohan, S. (2023). Understanding acidogenesis towards green hydrogen and volatile fatty acid production – Critical analysis and circular economy perspective. In *Chemical Engineering Journal* (Vol. 464). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2023.141550>

Dahiya, S., Sarkar, O., Swamy, Y. V., & Mohan, S. V. (2015). Acidogenic fermentation of food waste for volatile fatty acid production with co-generation of biohydrogen. *Bioresource technology*, 182, 103-113.

- Damtie, M. M., Shin, J., Jang, H. M., Cho, H. U., Wang, J., & Kim, Y. M. (2021). Effects of biological pretreatments of microalgae on hydrolysis, biomethane potential and microbial community. *Bioresource Technology*, 329. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124905>
- Delatin, G. C. (2021). *Avaliação técnico-econômica da produção de ácido succínico por rota fermentativa* [Universidade Federal de Uberlândia]. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/32821>. Acesso em: 2 jun 2024.
- Dionisi, D., Majone, M., Papa, V., & Beccari, M. (2004). Biodegradable Polymers from Organic Acids by Using Activated Sludge Enriched by Aerobic Periodic Cossubstratoing. *Biotechnology and Bioengineering*, 85(6), 569–579. <https://doi.org/10.1002/bit.10910>
- Donoso-Bravo, A. et al. Assessment of the influence of thermal pre-treatment time on the macromolecular composition and anaerobic biodegradability of sewage sludge. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 2, p. 660–666, 1 jan. 2011.
- Eng, F., Fuess, L. T., Bovio-Winkler, P., Etchebehere, C., Sakamoto, I. K., & Zaiat, M. (2022). Optimization of volatile fatty acid production by sugarcane vinasse dark fermentation using a response surface methodology. Links between performance and microbial community composition. *Sustainable Energy Technologies and Assessments*, 53, 102764.
- ETENE, E. T. de E. E. do N. (2023). Caderno setorial ETENE: agroindústria. <https://www.bnb.gov.br/revista/etene/article/view/2626/1780>
- Feng, S., Ngo, H. H., Guo, W., Chang, S. W., Nguyen, D. D., Liu, Y., Zhang, S., Phong Vo, H. N., Bui, X. T., & Ngoc Hoang, B. (2022). Volatile fatty acids production from waste streams by anaerobic digestion: A critical review of the roles and application of enzymes. In *Bioresource Technology* (Vol. 359). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127420>
- Ferguson, R. M., Coulon, F., & Villa, R. (2016). Organic loading rate: A promising microbial management tool in anaerobic digestion. *Water research*, 100, 348-356.
- Fernández-Domínguez, D., Astals, S., Peces, M., Frison, N., Bolzonella, D., Mata-Alvarez, J., & Dosta, J. (2020). Volatile fatty acids production from biowaste at mechanical-biological treatment plants: Focusing on fermentation temperature. *Bioresource Technology*, 314, 123729.
- Fuess, L. T., Braga, A. F. M., Eng, F., Gregoracci, G. B., Saia, F. T., Zaiat, M., & Lens, P. N. L. (2023). Solving the bottlenecks of sugarcane vinasse biodigestion: Impacts of temperature and substrate exchange on sulfate removal during dark fermentation. *Chemical Engineering Journal*, 455. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.140965>
- Fuess, L. T., & Garcia, M. L. (2014). Implications of stillage land disposal: a critical review on the impacts of fertigation. *Journal of Environmental Management*, 145, 210-229.
- Fountoulakis, M. S., Petousi, I., & Manios, T. (2010). Co-digestion of sewage sludge with glycerol to boost biogas production. *Waste management*, 30(10), 1849-1853.
- Garcia-Aguirre, J., Aymerich, E., de Goñi, J. G. M., & Esteban-Gutiérrez, M. (2017). Selective VFA production potential from organic waste streams: assessing temperature and pH influence. *Bioresource technology*, 244, 1081-1088.
- Google Earth® website, 2024. Disponível em: < <https://earth.google.com/web/@0,-21.44980005,0a,22251752.77375655d,35y,0h,0t,0r/data=OgMKATA>>. Acesso em: 01 de jun de 2024.

- Gomes, D. P. P. (2023). *Desafios e potencialidades do uso de diferentes inóculos para produção biológica de ácido capróico*. [Tese]. Universidade Federal de Pernambuco.
- Harsha, G., & Singh, M. N. (2021). Art of anaerobic digestion: An overview. In *Research Journal of Chemistry and Environment* (Vol. 25, Issue 8).
- Henze, M., van Loosdrecht, M. C., Ekama, G. A., & Brdjanovic, D. (Eds.). (2008). *Biological wastewater treatment*. IWA publishing.
- Hoarau, J., Caro, Y., Grondin, I., & Petit, T. (2018). Sugarcane vinasse processing: Toward a status shift from waste to valuable resource. A review. *Journal of water process engineering*, 24, 11-25.
- Hu, S., Luo, X., Wan, C., & Li, Y. (2012). Characterization of crude glycerol from biodiesel plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(23), 5915–5921. <https://doi.org/10.1021/jf3008629>
- Jankowska, E., Chwialkowska, J., Stodolny, M., & Oleskiewicz-Popiel, P. (2017). Volatile fatty acids production during mixed culture fermentation—The impact of substrate complexity and pH. *Chemical Engineering Journal*, 326, 901-910.
- Jodhani, S., Sebastian, J., Lee, J., Venkiteshwaran, K., Lee, H. S., Singh, V., ... & Hussain, A. (2024). Acidogenic Fermentation of Food Waste for the Production of Short-Chain Fatty Acids: The Impact of Inoculum Type and Inoculum Heat Pretreatment. *Fermentation*, 10(3), 162.
- Kabir, S. Bin, Khalekuzzaman, M., Hossain, N., Jamal, M., Alam, M. A., & Abomohra, A. E. F. (2022). Progress in biohythane production from microalgae-wastewater sludge co-digestion: An integrated biorefinery approach. In *Biotechnology Advances* (Vol. 57). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.107933>
- Kaur, T., Devi, R., Kour, D., Yadav, N., Prasad, S., Singh, A., ... & Yadav, A. N. (2020). Advances in microbial bioresources for sustainable biofuels production: current research and future challenges. *Biofuels production—sustainability and advances in microbial bioresources*, 371-387.
- Konstantinović, S. S., Danilović, B. R., Ćirić, J. T., Ilić, S. B., Savić, D. S., & Veljković, V. B. (2016). Valorization of crude glycerol from biodiesel production. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, 22(4), 461-489.
- Krupp, M., & Widmann, R. (2009). Biohydrogen production by dark fermentation: Experiences of continuous operation in large lab scale. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(10), 4509-4516.
- Lee, W. S., Chua, A. S. M., Yeoh, H. K., & Ngoh, G. C. (2014). A review of the production and applications of waste-derived volatile fatty acids. In *Chemical Engineering Journal* (Vol. 235, pp. 83–99). <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.09.002>
- Kwietniewska, E., & Tys, J. (2014). Process characteristics, inhibition factors and methane yields of anaerobic digestion process, with particular focus on microalgal biomass fermentation. *Renewable and sustainable energy reviews*, 34, 491-500.
- Lay, C. H., Sen, B., Huang, S. C., Chen, C. C., & Lin, C. Y. (2013). Sustainable bioenergy production from tofu-processing wastewater by anaerobic hydrogen fermentation for onsite energy recovery. *Renewable energy*, 58, 60-67.

- Lee, W. S., Chua, A. S. M., Yeoh, H. K., & Ngoh, G. C. (2014). A review of the production and applications of waste-derived volatile fatty acids. In *Chemical Engineering Journal* (Vol. 235, pp. 83–99). <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.09.002>
- Leitão, R. C., Gehring, T. A., De, W., Cavalcante, A., Baima, I., Freitas, F., Colares, A. S., Cornelius Van Haandel, A., Angenent, L. T., & Santaella, S. T. (2017). *Comunicado Técnico*.
- Leite, W. R. M. (2015). *Digestão anaeróbia em temperaturas mesofílica e termofílica de lodo de ete usando reatores de estágio único e dois estágios*. [Tese]. Universidade Federal de Santa Catarina.
- Leite, W. R. M., Magnus, B. S., de Moraes, B. A. B., Kato, M. T., Florencio, L., da Costa, R. H. R., & Belli Filho, P. (2023). Mesophilic anaerobic digestion of waste activated sludge in an intermittent mixing reactor: Effect of hydraulic retention time and organic loading rate. *Journal of Environmental Management*, 338, 117839.
- Liang, S., Gliniewicz, K., Gerritsen, A. T., & McDonald, A. G. (2016). Analysis of microbial community variation during the mixed culture fermentation of agricultural peel wastes to produce lactic acid. *Bioresource Technology*, 208, 7-12.
- Lim, J. W., Chiam, J. A., & Wang, J. Y. (2014). Microbial community structure reveals how microaeration improves fermentation during anaerobic co-digestion of brown water and food waste. *Bioresource technology*, 171, 132-138.
- Liu, C. G., Xue, C., Lin, Y. H., & Bai, F. W. (2013). Redox potential control and applications in microaerobic and anaerobic fermentations. *Biotechnology advances*, 31(2), 257-265.
- Liu, N., Wang, Q., Jiang, J., & Zhang, H. (2017). Effects of salt and oil concentrations on volatile fatty acid generation in food waste fermentation. *Renewable Energy*, 113, 1523–1528. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.07.042>
- Llamas, M., Greses, S., Tomás-Pejó, E., & González-Fernández, C. (2022). Carboxylic acids production via anaerobic fermentation: Microbial communities' responses to stepwise and direct hydraulic retention time decrease. *Bioresource Technology*, 344. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126282>
- Lü, F., Wang, Z., Zhang, H., Shao, L., & He, P. (2021). Anaerobic digestion of organic waste: Recovery of value-added and inhibitory compounds from liquid fraction of digestate. In *Bioresource Technology* (Vol. 333). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125196>
- Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Bender, K. S.; Buckley, D. H.; Stahl, D. A. *Microbiologia de Brock [recurso eletrônico] / ; [tradução : Alice Freitas Versiani ... [et al.] ; revisão técnica: Flávio Guimarães da Fonseca]. – 14. ed. – Porto Alegre : Artmed, 2016.*
- Magdalena, J. A., Greses, S., & González-Fernández, C. (2019). Impact of Organic Loading Rate in Volatile Fatty Acids Production and Population Dynamics Using Microalgae Biomass as Substrate. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54914-4>
- Manchala, K.R.; Sun, Y.; Zhang, D. ; Wang, Z.W. Anaerobic digestion modelling, *Adv. Bioenergy 2* (2017) 69–141, <https://doi.org/10.1016/bs.aibe.2017.01.001>.
- Marinho, I. da C. Lagoas de alta taxa para remoção de nutrientes do esgoto doméstico: produção de compostos de valor agregado. 2022. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) - Universidade Federal de Pernambuco, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Orientador: Maria de Lourdes Florencio dos Santos.

- Martins, L. R. Avaliação de pré-tratamentos para a produção de metano a partir de biomassa algal. 2019. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) - Universidade Federal de Pernambuco, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. Orientador: Maria de Lourdes Florencio dos Santos.
- McCarty, P.L., 1964. Anaerobic waste treatment fundamentals, Part three. *Public works* 95 (9), 91-94.
- Melo Filho, C. M. de. Otimização da produção metano a partir de biomassa algal cultivada em esgoto doméstico. 2017. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) - Universidade Federal de Pernambuco, Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco. Orientador: Maria de Lourdes Florencio dos Santos.
- Menezes, C. A., de Souza Almeida, P., Augusto, I. M. G., Paulinetti, A. P., Lovato, G., Rodrigues, J. A. D., & Silva, E. L. (2024). A techno-economic assessment of hydrogen and methane production from the anaerobic treatment of vinasse and glycerol: Single-vs. two-stage process. *Process Safety and Environmental Protection*, 187, 950-961.
- Metcalf, Eddy. Tratamento e recuperação de recursos [recurso eletrônico]; tradução: Ivanildo Hespagnol, José Carlos Mierzwa. – 5. ed. – Porto Alegre : AMGH, 2016.
- Moraes, B. S., Zaiat, M., & Bonomi, A. (2015). Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil: Challenges and perspectives. *Renewable and Sustainable energy reviews*, 44, 888-903.
- Morales, M., Aflalo, C., & Bernard, O. (2021). Microalgal lipids: A review of lipids potential and quantification for 95 phytoplankton species. In *Biomass and Bioenergy* (Vol. 150). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2021.106108>
- Nda-Umar, U. I., Ramli, I., Taufiq-Yap, Y. H., & Muhamad, E. N. (2018). An overview of recent research in the conversion of glycerol into biofuels, fuel additives and other bio-based chemicals. *Catalysts*, 9(1), 15.
- Nghiem, L. D., Hai, F. I., Price, W. E., Wickham, R., Ngo, H. H., & Guo, W. (2017). By-products of anaerobic treatment: methane and digestate from manures and cosubstrates. In *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (pp. 469-484). Elsevier.
- OECD/FAO. Organización para la cooperación y el desarrollo económicos. organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura. *Perspectivas Agrícolas 2021/2030*, OECD Publishing, Paris, 2021.
- Oliveira, D. C. P., Machado, F. K. V., Pinheiro, A. A. D., Santos, M. de L. F. dos, & Leite, W. R. M. (2023). Produção de ácidos graxos voláteis para geração de polihidroxialcanoato. *32º Congresso Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental*. https://cbesa.sigotech.online/storage/trabalhos/arquivos/completo/1231_tema_ii.pdf
- Pandey, A. K., Pilli, S., Bhunia, P., Tyagi, R. D., Surampalli, R. Y., Zhang, T. C., Kim, S. H., & Pandey, A. (2022). Dark fermentation: Production and utilization of volatile fatty acid from different wastes- A review. *Chemosphere*, 288. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132444>
- Parsaee, M., Kiani Deh Kiani, M., & Karimi, K. (2019). A review of biogas production from sugarcane vinasse. In *Biomass and Bioenergy* (Vol. 122, pp. 117–125). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.01.034>

Pinheiro, A. A. D. (2023). *Codigestão anaeróbia de biomassa de algas e vinhaça para produção de metano* [Dissertação]. Universidade Federal de Pernambuco.

Pinheiro, A. A. D., da Silva, E. M., de Oliveira, D. C. P., Magnus, B. S., Motteran, F., Florencio, L., & Leite, W. R. M. (2024). Volatile fatty acid and methane production from vinasse and microalgae using two-stage anaerobic co-digestion. *Environmental Science and Pollution Research*. <https://doi.org/10.1007/s11356-024-34089-w>

Possente, S., Bertasini, D., Rizzioli, F., Bolzonella, D., & Battista, F. (2022). Volatile fatty acids production from waste rich in carbohydrates: Optimization of dark fermentation of pasta by products. *Biochemical Engineering Journal*, 189, 108710.

Quispe, C. A., Coronado, C. J., & Carvalho Jr, J. A. (2013). Glycerol: Production, consumption, prices, characterization and new trends in combustion. *Renewable and sustainable energy reviews*, 27, 475-493.

Rabii, A., Aldin, S., Dahman, Y., & Elbeshbishy, E. (2019). A review on anaerobic co-digestion with a focus on the microbial populations and the effect of multi-stage digester configuration. *Energies*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/en12061106>

Regueira, A., Bevilacqua, R., Lema, J. M., Carballa, M., & Mauricio-Iglesias, M. (2020). A metabolic model for targeted volatile fatty acids production by cofermentation of carbohydrates and proteins. *Bioresource Technology*, 298. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122535>

Rizzioli, F., Benedetti, V., Patuzzi, F., Baratieri, M., Bolzonella, D., & Battista, F. (2024). Valorization of orange peels in a biorefinery loop: recovery of limonene and production of volatile fatty acids and activated carbon. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 14(8), 9793-9803.

RFA - Renewable Fuels Association. Annual ethanol production. U.S. and world ethanol production. Disponível em: <<https://ethanolrfa.org/markets-and-statistics/annual-ethanol-production>>. Acesso em: 18 de nov. de 2023.

Rogeri, R. C., Fuess, L. T., de Araujo, M. N., Eng, F., do Vale Borges, A., Damianovic, M. H. R. Z., & da Silva, A. J. (2024). Methane production from sugarcane vinasse: The alkalinizing potential of fermentative-sulfidogenic processes in two-stage anaerobic digestion. *Energy Nexus*, 14, 100303.

Sá, A. J. F. de. Avaliação da produção lipídica por microalgas utilizando efluente de reator UASB. 2020. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) - Universidade Federal de Pernambuco, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. Orientador: Maria de Lourdes Florencio dos Santos.

Samul, D., Leja, K., & Grajek, W. (2014). Impurities of crude glycerol and their effect on metabolite production. *Annals of microbiology*, 64, 891-898.

Santos Neto, A. G. dos. Formação de agregados de microalgas-bactérias em lagoas de alta taxa visando a recuperação de recursos e o tratamento de esgoto. 2023. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) - Universidade Federal de Pernambuco, Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco. Orientador: Maria de Lourdes Florencio dos Santos.

Sátiro, J. R. Biofloculação de microalgas em lagoas de alta taxa visando à produção de biocombustíveis. 2021. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) - Universidade Federal

de Pernambuco, Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco.
Orientador: Maria de Lourdes Florencio dos Santos.

Shobana, S., Saratale, G. D., Pugazhendhi, A., Arvindnarayan, S., Periyasamy, S., Kumar, G., & Kim, S. H. (2017). Fermentative hydrogen production from mixed and pure microalgae biomass: key challenges and possible opportunities. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(42), 26440-26453.

Sialve, B., Bernet, N., & Bernard, O. (2009). Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. *Biotechnology advances*, 27(4), 409-416.

Silva, E. M. da. (2022). Co-digestão anaeróbia de biomassa algal com diferentes resíduos orgânicos para otimização da produção de biogás [Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal de Pernambuco].
<https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/47348/1/TCC%20Edilberto%20Mariano%20da%20Silva.pdf>

Silva, E. M. da, de Araújo, S. C., Veras, S. T. S., Pinheiro, A. A. D., Motteran, F., Kato, M. T., Florencio, L., & Leite, W. R. M. (2024). Anaerobic co-digestion of microalgal biomass, sugarcane vinasse, and residual glycerol from biodiesel using simplex-centroid mixture design: methane potential, synergic effect, and microbial diversity. *Environmental Science and Pollution Research*. <https://doi.org/10.1007/s11356-024-33193-1>

Silva, M. C. de A., Monteggia, L. O., Alves Barroso Júnior, J. C., Granada, C. E., & Giongo, A. (2020). Evaluation of semi-continuous operation to hydrogen and volatile fatty acids production using raw glycerol as substrate. *Renewable Energy*, 153, 701–710.
<https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.01.152>

Solé-Bundó, M., Passos, F., Romero-Güiza, M. S., Ferrer, I., & Astals, S. (2019). Co-digestion strategies to enhance microalgae anaerobic digestion: A review. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 112, pp. 471–482). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.05.036>

Sukphun, P., Sittijunda, S., & Reungsang, A. (2021). Volatile fatty acid production from organic waste with the emphasis on membrane-based recovery. *Fermentation*, 7(3), 159.

Sun, C., Ren, H., Sun, F., Hu, Y., Liu, Q., Song, G., ... & Show, P. L. (2022). Glycerol organosolv pretreatment can unlock lignocellulosic biomass for production of fermentable sugars: Present situation and challenges. *Bioresource technology*, 344, 126264.

Strazzer, G., Battista, F., Andreolli, M., Menini, M., Bolzonella, D., & Lampis, S. (2021a). Influence of different household Food Wastes Fractions on Volatile Fatty Acids production by anaerobic fermentation. *Bioresource Technology*, 335.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125289>

Strazzer, G., Battista, F., Tonanzi, B., Rossetti, S., & Bolzonella, D. (2021). Optimization of short chain volatile fatty acids production from household food waste for biorefinery applications. *Environmental Technology and Innovation*, 23.
<https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101562>

Sunarno, J. N., Prasertsan, P., Duangsuwan, W., Cheirsilp, B., & Sangkharak, K. (2020). Improve biotransformation of crude glycerol to ethanol of *Enterobacter aerogenes* by two-stage redox potential fed-batch process under microaerobic environment. *Biomass and Bioenergy*, 134. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105503>

- Szacherska, K., Oleskowicz-Popiel, P., Ciesielski, S., & Mozejko-Ciesielska, J. (2021). Volatile fatty acids as carbon sources for polyhydroxyalkanoates production. In *Polymers* (Vol. 13, Issue 3, pp. 1–21). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/polym13030321>
- Takeda, P. Y., Oliveira, C. A., Dias, M. E. S., Paula, C. T., Borges, A. do V., & Damianovic, M. H. R. Z. (2022). Enhancing the energetic potential of sugarcane biorefinery exchanging vinasse and glycerol in sugarcane off-season in an anaerobic reactor. *Renewable Energy*, 195, 1218–1229. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2022.06.128>
- Talan, A., Pokhrel, S., Tyagi, R. D., & Drogui, P. (2022). Biorefinery strategies for microbial bioplastics production: Sustainable pathway towards Circular Bioeconomy. In *Bioresource Technology Reports* (Vol. 17). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100875>
- Tang, J., Wang, X. C., Hu, Y., Zhang, Y., & Li, Y. (2017). Effect of pH on lactic acid production from acidogenic fermentation of food waste with different types of inocula. *Bioresource technology*, 224, 544-552.
- Thompson JC, He BB. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple cossubstratostocks. *Applied Engineering in Agriculture* 2006;22:261–5.
- Vassalle, L., Passos, F., Rosa-Machado, A. T., Moreira, C., Reis, M., Pascoal de Freitas, M., Ferrer, I., & Mota, C. R. (2022). The use of solar pre-treatment as a strategy to improve the anaerobic biodegradability of microalgal biomass in co-digestion with sewage. *Chemosphere*, 286. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131929>
- Vázquez-Fernández, A., Suárez-Ojeda, M. E., & Carrera, J. (2022). Review about bioproduction of Volatile Fatty Acids from wastes and wastewaters: Influence of operating conditions and organic composition of the substrate. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10(3), 107917.
- Veras, S. T. S.; Rojas, P.; Florencio, L.; Kato, M. T.; Sanz, J. L. 1,3-Propanediol production from Glycerol in polyurethane foam containing anaerobic reactors: performance and biomass cultivation and retention. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 27, n. 36, p. 45662–45674, 2020. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH.
- Vesga-Baron, A., Etchebehere, C., Schiappacasse, M. C., Chamy, R., & Tapia-Venegas, E. (2021). Controlled oxidation-reduction potential on dark fermentative hydrogen production from glycerol: Impacts on metabolic pathways and microbial diversity of an acidogenic sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 46(7), 5074-5084.
- Viana, M. B., Freitas, A. V., Leitão, R. C., Pinto, G. A. S., & Santaella, S. T. (2012). Anaerobic digestion of crude glycerol: a review. *Environmental Technology Reviews*, 1(1), 81-92.
- Vivek, N., Sindhu, R., Madhavan, A., Anju, A. J., Castro, E., Faraco, V., ... & Binod, P. (2017). Recent advances in the production of value added chemicals and lipids utilizing biodiesel industry generated crude glycerol as a substrate—Metabolic aspects, challenges and possibilities: An overview. *Bioresource technology*, 239, 507-517.
- Wakai, S., Yoshie, T., Asai-Nakashima, N., Yamada, R., Ogino, C., Tsutsumi, H., ... & Kondo, A. (2014). L-lactic acid production from starch by simultaneous saccharification and fermentation in a genetically engineered *Aspergillus oryzae* pure culture. *Bioresource technology*, 173, 376-383.

- Wang, Y., Ho, S. H., Cheng, C. L., Guo, W. Q., Nagarajan, D., Ren, N. Q., Lee, D. J., & Chang, J. S. (2016). Perspectives on the feasibility of using microalgae for industrial wastewater treatment. In *Bioresource Technology* (Vol. 222, pp. 485–497). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.106>
- Wang, Q., Li, H., Feng, K., & Liu, J. (2020). Oriented fermentation of food waste towards high-value products: A review. In *Energies* (Vol. 13, Issue 21). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/en13215638>
- Wang, K.; Yin, J.; Shen, D.; Li, N. Anaerobic Digestion of Food Waste for Volatile Fatty Acids (VFAs) Production with Different Types of Inoculum: Effect of PH. *Bioresour. Technol.* 2014, 161, 395–401.
- Ward, A. J., Lewis, D. M., & Green, F. B. (2014). Anaerobic digestion of algae biomass: A review. *Algal Research*, 5, 204-214.
- Wu, Y., Ma, H., Zheng, M., & Wang, K. (2015). Lactic acid production from acidogenic fermentation of fruit and vegetable wastes. *Bioresource technology*, 191, 53-58.
- Xia, A., Jacob, A., Tabassum, M. R., Herrmann, C., & Murphy, J. D. (2016). Production of hydrogen, ethanol and volatile fatty acids through co-fermentation of macro-and micro-algae. *Bioresource technology*, 205, 118-125.
- Xu, S., Selvam, A., & Wong, J. W. (2014). Optimization of micro-aeration intensity in acidogenic reactor of a two-phase anaerobic digester treating food waste. *Waste management*, 34(2), 363-369.
- Yin, J., Yu, X., Zhang, Y., Shen, D., Wang, M., Long, Y., & Chen, T. (2016). Enhancement of acidogenic fermentation for volatile fatty acid production from food waste: Effect of redox potential and inoculum. *Bioresource Technology*, 216, 996-1003.
- Yu, H. Q., & Fang, H. H. (2003). Acidogenesis of gelatin-rich wastewater in an upflow anaerobic reactor: influence of pH and temperature. *Water research*, 37(1), 55-66.
- Yukesh Kannah, R., Kavitha, S., Parthiba Karthikeyan, O., Rene, E. R., Kumar, G., & Rajesh Banu, J. (2021). A review on anaerobic digestion of energy and cost effective microalgae pretreatment for biogas production. In *Bioresource Technology* (Vol. 332). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125055>
- Zhang, C., Su, H., Baeyens, J., & Tan, T. (2014). Reviewing the anaerobic digestion of food waste for biogas production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 38, 383-392.
- Zhao, M., Wang, Y., Zhou, W., Zhou, W., & Gong, Z. (2023). Co-valorization of crude glycerol and low-cost substrates via oleaginous yeasts to micro-biodiesel: status and outlook. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 180, 113303.
- Zhuo, G., Yan, Y., Tan, X., Dai, X., & Zhou, Q. (2012). Ultrasonic-pretreated waste activated sludge hydrolysis and volatile fatty acid accumulation under alkaline conditions: effect of temperature. *Journal of Biotechnology*, 159(1-2), 27-31.