

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

KARINA GUEDES DE OLIVEIRA

DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS GERADOS EM  
PROCESSOS DE TRATAMENTO DE RESÍDUOS EMPREGANDO  
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA E GASOSA

PALOTINA

2022

KARINA GUEDES DE OLIVEIRA

DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS GERADOS EM  
PROCESSOS DE TRATAMENTO DE RESÍDUOS EMPREGANDO  
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA E GASOSA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná, como requisito à obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Sequinel

PALOTINA

2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIAS E EXATAS  
Rua Pioneiro, 2153, -- Bairro JardimDallas, Palotina/PR, CEP 85950-000  
Telefone: 3360-5000 - <http://www.ufpr.br/>

#### ATA DE REUNIÃO

Aos quinze dias do mês de setembro do ano de dois mil e vinte e dois, às catorze horas e trinta minutos, na Sala 11 do Bloco Didático III, Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, realizou-se a Defesa Pública e Oral do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado "Determinação de Ácidos Orgânicos Voláteis Gerados em Processos de Tratamento de Resíduos Empregando Cromatografia Líquida e Gasosa" apresentado pela discente Karina Guedes de Oliveira, orientada pelo Prof. Dr. Rodrigo Sequinel, como um dos requisitos obrigatórios para conclusão do curso de graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Iniciados os trabalhos, o orientador e Presidente da Banca concedeu a palavra à discente, para exposição do seu trabalho. A seguir, foi concedida a palavra em ordem sucessiva aos membros da Banca de Exame, os quais passaram a arguir a discente. Ultimada a defesa, que se desenvolveu nos termos normativos, a Banca de Exame, em sessão secreta, passou aos trabalhos de julgamento, tendo atribuído à discente as seguintes notas: **Profa. Dra. Dilcemara Cristina Zenatti, nota: 95 (noventa e cinco), Profa. Dra. Ivonete Rossi Bautitz, nota: 95 (noventa e cinco), e Prof. Dr. Rodrigo Sequinel, nota: 95 (noventa e cinco).** A nota final da discente, após a média aritmética dos três membros da banca de exame, foi 95 (noventa e cinco). As considerações e sugestões feitas pela Banca de Exame deverão ser atendidas pela discente sob acompanhamento de seu orientador. Nada mais havendo a tratar foi lavrada a presente ata, que, lida e aprovada, vai por todos assinada eletronicamente.



Documento assinado eletronicamente por **RODRIGO SEQUINEL, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 15/09/2022, às 22:44, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **IVONETE ROSSI BAUTITZ, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 16/09/2022, às 14:39, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **DILCEMARA CRISTINA ZENATTI, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 16/09/2022, às 14:52, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida aqui informando o código verificador **4877519** e o código CRC **7DAA69EE**.

*Dedico este trabalho as pessoas que contribuíram,  
direta e indiretamente, na minha jornada acadêmica.  
E a todos que possam adquirir algum conhecimento com este trabalho.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela saúde, calma, sabedoria, por nunca deixar eu desistir dos meus objetivos e abençoar minha trajetória acadêmica.

Aos meus pais, Lourdes e Antônio, que são as pessoas mais importantes da minha vida, pela educação e por todo o apoio e incentivo durante a graduação.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rodrigo Sequinel, pelas orientações, ensinamentos, compreensão e paciência ao esclarecer minhas dúvidas durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos técnicos, Guilherme, Maiara e Raquel do Laboratório de Análise Instrumental e Controle de Qualidade e o Thompson do Laboratório de Biocombustíveis, pelos conselhos e por sempre me ajudarem no laboratório.

A doutoranda, Kátia, pela parceria, conhecimento, conselhos e pela confiança em deixar eu acompanhar a sua pesquisa, agregando para o meu aprendizado.

Aos membros da banca, as professoras Dra. Dilcemara Cristina Zenatti e Dra. Ivonete Rossi Bautitz, por aceitarem o convite e pelo carinho e conhecimento repassado nas disciplinas ministradas na graduação.

A todos os professores que conheci durante a graduação, pelo conhecimento compartilhado.

Aos meus amigos e colegas conquistados na graduação, pelo carinho, aprendizado, conselhos, apoio, os trabalhos em grupo e as conversas sobre os mais diversos assuntos.

A UFPR – Palotina e ao Programa PIBIC e Fundação Araucária, pela concessão da bolsa de estudo e incentivo nos projetos de iniciação científica.

E agradeço a todos que contribuíram e estiveram comigo durante a minha trajetória acadêmica.

“Seja menos curioso sobre as pessoas e mais curioso sobre ideias”.

(Marie Curie)

## RESUMO

Das fontes para a produção de energia, o biogás é umas das fontes mais favoráveis ao meio ambiente. É um biocombustível renovável e possui um bom poder calorífico. O qual é obtido a partir da degradação da matéria orgânica em condições anaeróbias. Sendo assim, durante o processo fermentativo são gerados os ácidos orgânicos voláteis (AOVs), também nomeados de ácidos graxos voláteis (AGVs). A concentração desses ácidos permite analisar condições de estabilidade e instabilidade no reator. Os AOVs são ácidos de cadeia curta, de baixo peso molecular e de elevado caráter hidrofílico. Neste contexto, foi realizado o acompanhamento de um biorreator de fermentação contínua anaeróbia para a produção de biogás, utilizando como substratos lodo ativado e lodo flotado. Diante disso, o objetivo do trabalho foi a identificação e a quantificação dos AOVs do reator anaeróbio empregando as técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e cromatografia gasosa (CG). Para a cromatografia líquida foi utilizada a coluna de fase reversa RP C18 ACE e detector arranjo de diodo (DAD) e para a cromatografia gasosa, detector de ionização de chama (FID) e coluna capilar ZB-WAXplus. Os AOVs escolhidos foram: acético, propiônico, butírico, isovalérico, valérico, caprício, láctico e fórmico. As amostras foram filtradas e injetadas diretamente no HPLC. E no CG, o método de análise foi por padronização interna e realizou-se uma microextração líquido-líquido para a extração dos ácidos orgânicos. As amostras foram colocadas em vials e injetadas no equipamento. Além disso, foram realizadas as curvas analíticas dos ácidos e calculados os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para cada técnica cromatográfica, em que apresentaram  $r^2 > 0,98$ . Sendo assim, entre as duas técnicas cromatográficas, a coluna do HPLC apresentou problemas na identificação dos AOVs, devido aos interferentes da matriz da amostra do reator anaeróbio. E a CG foi a que apresentou resultados positivos na identificação e quantificação dos AOVs, sendo possível aplicar a curva analítica para quantificar os analitos de interesse.

Palavras – chave: ácidos orgânicos voláteis; cromatografia; reatores anaeróbios.

## ABSTRACT

Of the sources for energy production, biogas is one of the most environmentally friendly sources. It is a renewable biofuel and has a good calorific value. Which is obtained from the degradation of organic matter under anaerobic conditions. Thus, during the fermentation process, volatile organic acids (VOAs) are generated, also called volatile fatty acids (VFAs). The concentration of these acids allows analyzing stability and instability conditions in the reactor. VOAs are short-chain acids, with low molecular weight and high hydrophilic character. In this context, a continuous anaerobic fermentation bioreactor was monitored for the production of biogas, using activated sludge and floated sludge as substrates. Therefore, the objective of this work was the identification and quantification of the AOVs of the anaerobic reactor using the techniques of high performance liquid chromatography (HPLC) and gas chromatography (GC). For liquid chromatography, the RP C18 ACE reversed-phase column and diode array detector (DAD) were used and for gas chromatography, flame ionization detector (FID) and ZB-WAXplus capillary column were used. The AOVs chosen were: acetic, propionic, butyric, isovaleric, valeric, caproic, lactic and formic. The samples were filtered and injected directly into the HPLC. And in the GC, the method of analysis was by internal standardization and a liquid-liquid microextraction was carried out for the extraction of organic acids. The samples were placed in vials and injected into the equipment. In addition, analytical curves of acids were performed and the limits of detection (LD) and quantification (LQ) were calculated for each chromatographic technique, in which  $r^2 > 0,98$  was obtained. Thus, between the two chromatographic techniques, the HPLC column presented problems in the identification of the AOVs, due to the interferences of the sample matrix of the anaerobic reactor. And GC was the one that showed positive results in the identification and quantification of AOVs, being possible to apply the analytical curve to quantify the analytes of interest.

Keywords: volatile organic acids; chromatography; anaerobic reactors.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - EXEMPLO DE UM PICO CROMATOGRÁFICO.....	17
FIGURA 2 - DIAGRAMA DOS ELEMENTOS DE UM CROMATÓGRAFO LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE OU HPLC).....	18
FIGURA 3 – DIAGRAMA DOS ELEMENTOS DE UM CROMATÓGRAFO GASOSO (CG) .....	20
FIGURA 4 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA DIGESTÃO ANAERÓBIA....	22
FIGURA 5 – BIORREATOR (1 E 2) E GASÔMETROS (3).....	30
FIGURA 6 – CROMATÓGRAFO LÍQUIDO (HPLC) .....	31
FIGURA 7 – CROMATÓGRAFO GASOSO (CG).....	34
FIGURA 9 - CROMATOGRAMA DA SOLUÇÃO PADRÃO DE 7,5 mg.L <sup>-1</sup> DOS AOVs .....	38
FIGURA 10 – CROMATOGRAMA DA SOLUÇÃO PADRÃO DE 120,0 mg.L <sup>-1</sup> DOS AOVs.....	38
FIGURA 11– CROMATOGRAMA DA SOLUÇÃO PADRÃO DE 300,0 mg.L <sup>-1</sup> COM OS ÁCIDOS FÓRMICO, LÁCTICO, ACÉTICO E CAPRÓICO.....	39
FIGURA 12 – CROMATOGRAMA DA SOLUÇÃO PADRÃO DE 300,0 mg.L <sup>-1</sup> COM OS ÁCIDOS PROPIÔNICO, BUTÍRICO, ISOVALÉRICO E VALÉRICO .....	39
FIGURA 13 – CROMATOGRAMA DO TRATAMENTO 1: AMOSTRA CENTRIFUGADA E FILTRADA .....	42
FIGURA 14 – CROMATOGRAMA DO TRATAMENTO 2: AMOSTRA COM FORTIFICAÇÃO DE AOVs NA CONCENTRAÇÃO DE 120 mg.L <sup>-1</sup> .....	42
FIGURA 15 – CROMATOGRAMA DO TRATAMENTO 3: AMOSTRA REALIZADA A MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO COM ÉTER ETÍLICO .....	43
FIGURA 16 – CROMATOGRAMA DO TRATAMENTO 3: AMOSTRA REALIZADA A MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO COM ACETONITRILA.....	43
FIGURA 17 - CROMATOGRAMA DO TRATAMENTO 4: AMOSTRA COM FORTIFICAÇÃO DE AOVs NA CONCENTRAÇÃO DE 60 mg.L <sup>-1</sup> E REALIZADA A MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO COM ACETONITRILA.....	44
FIGURA 18 – CROMATOGRAMA DA AMOSTRA DO REATOR ANAERÓBIO ANALISADA NA UNIOESTE (CASCAVEL, PR).....	45
FIGURA 19 – CROMATOGRAMA DA CURVA DE BAIXA CONCENTRAÇÃO: 18 mg.L <sup>-1</sup> .....	48
FIGURA 20 – CROMATOGRAMA DA CURVA DE BAIXA CONCENTRAÇÃO: 200 mg.L <sup>-1</sup> .....	48
FIGURA 21 – CROMATOGRAMA DA CURVA DE ALTA CONCENTRAÇÃO: 800 mg.L <sup>-1</sup> .....	48
FIGURA 22 – CROMATOGRAMA 1: AMOSTRA DO REATOR ANAERÓBIO .....	50
FIGURA 23 – CROMATOGRAMA 2: AMOSTRA DO REATOR ANAERÓBIO .....	51

FIGURA 24 – CROMATOGRAMA 3: AMOSTRA DO REATOR ANAERÓBIO .....	51
FIGURA 25 – GRÁFICO DA CONCENTRAÇÃO DE AOVs CORRESPONDENTE AO 3° E 4° MÊS DE OPERAÇÃO (FAIXA DE CONCENTRAÇÃO: 0 a 300 mg.L <sup>-1</sup> ) .....	53
FIGURA 26 – GRÁFICO DA CONCENTRAÇÃO DE AOVs CORRESPONDENTE AO 3° E 4° MÊS DE OPERAÇÃO (FAIXA DE CONCENTRAÇÃO: 300 a 2900 mg.L <sup>-1</sup> )	53

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – REAÇÕES QUÍMICAS DA FORMAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS E ÁLCOOIS PROVENIENTES DA ETAPA DE ACIDOGÊNESE ATÉ A FORMAÇÃO DE CO <sub>2</sub> E H <sub>2</sub> A PARTIR DA GLICOSE E DO GLICEROL .....	26
TABELA 2 – SISTEMA DE ELUIÇÃO DA FASE MÓVEL PARA O HPLC .....	32
TABELA 3 - TESTES REALIZADOS PARA ANALISAR O PERFIL CROMATOGRÁFICO DAS AMOSTRAS DO REATOR ANAERÓBIO .....	33
TABELA 4 – SISTEMA DE AQUECIMENTO PARA O CG .....	35
TABELA 5 - EQUAÇÃO DA RETA, COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO LINEAR (R <sup>2</sup> ), LIMITE DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA .....	41
TABELA 6 - EQUAÇÃO DA RETA, COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO LINEAR (R <sup>2</sup> ), LIMITE DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA CURVA BAIXA .....	49
TABELA 7 - EQUAÇÃO DA RETA, COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO LINEAR (R <sup>2</sup> ), LIMITE DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA CURVA ALTA .....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS

AOVs – Ácidos orgânicos voláteis

BEN – Balanço Energético Nacional

CG – Cromatografia Gasosa

CGL – Cromatografia gás-líquido

CGS – Cromatografia gás-sólido

CL – Cromatografia líquido-líquido

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DAD – Diode array detector (Detector arranjo de diodos)

FID – Flame ionization detector (Detector ionização por chama)

FE – Fase estacionária

FM – Fase móvel

FR – Fator de resposta

HPLC - High Performance Liquid Chromatography

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

UV – Ultravioleta

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1 OBJETIVOS .....	15
1.1.1 Objetivo geral .....	15
1.1.2 Objetivos específicos.....	15
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	16
2.1 CROMATOGRAFIA.....	16
2.1.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE OU HPLC).....	18
2.1.2 Cromatografia Gasosa (CG).....	19
2.2 DIGESTÃO ANAERÓBIA .....	21
2.3 CONDIÇÕES OPERACIONAIS EM REATORES ANAERÓBIOS.....	23
2.3.1 Ácidos orgânicos voláteis (AOVs) .....	24
2.3.2 pH: acidez e alcalinidade.....	26
2.3.3 Temperatura.....	27
2.4 SUBSTRATOS .....	27
2.4.1 Lodo ativado e lodo flotado como substratos alternativos .....	29
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	30
3.1 REAGENTES .....	31
3.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC).....	31
3.2.1 Instrumentação.....	31
3.2.2 Preparo das soluções padrões .....	32
3.2.3 Amostras .....	33
3.2.4 Testes de extração realizados com as amostras do reator anaeróbio .....	33
3.3 CROMATOGRAFIA GASOSA (CG).....	34
3.3.1 Instrumentação.....	34
3.3.2 Preparo das soluções padrões .....	35
3.3.3 Amostras .....	36
3.4 LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ).....	37
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	38
4.1 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC).....	38
4.1.1 Curva analítica - HPLC.....	38
4.1.2 Amostras do reator anaeróbio .....	41
4.2 CROMATOGRAFIA GASOSA (CG).....	47
4.2.1 Curva analítica - CG .....	47
4.2.2 Amostras do reator anaeróbio .....	50

<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	55
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	56

## 1 INTRODUÇÃO

A busca por fontes de energias renováveis é cada vez mais crescente, principalmente devido aos impactos ambientais causados pelo aumento de emissões de gases do efeito estufa, provenientes dos combustíveis fósseis. Diante disso, há muitos estudos sobre a utilização de fontes de energias alternativas que minimizam os efeitos negativos gerados ao meio ambiente, sendo os principais impactos, o aquecimento global, extinção de espécies, mudanças climáticas, destruição da camada de ozônio, chuva ácida e o agravamento do efeito estufa, entre outros.

Mesmo com as preocupações sobre os impactos ambientais, as fontes de energias não renováveis, principalmente as derivadas do petróleo (combustíveis fósseis), predominam na matriz energética brasileira, principalmente pela tecnologia avançada de obtenção e o rendimento energético. Conforme o Balanço Energético Nacional 2022 – BEN (ano base 2021) realizado pela Empresa de Pesquisa Energética (EPE), em 2021 as fontes não renováveis representaram 55,3%, enquanto as fontes renováveis representaram 44,7% da matriz energética brasileira (BEN, 2022).

Diante disso, das fontes para a produção de energia, o biogás é uma das fontes mais favoráveis ao meio ambiente. Sua aplicação contribui com o combate à poluição do solo e dos lençóis freáticos e a redução dos gases causadores do efeito estufa (ANEEL, 2008), além de ser um biocombustível renovável, possui um bom poder calorífico (BEN, 2022).

O biogás é obtido a partir da degradação da matéria orgânica por bactérias fermentativas e metanogênicas em condições anaeróbias. Tendo como substratos resíduos urbanos, industriais e agropecuários (ANEEL, 2008). Sendo uma das alternativas sustentáveis no tratamento de resíduos, além de estabilizar a matéria orgânica e gerar subprodutos (ARAÚJO, 2017).

Neste contexto, durante o processo fermentativo são gerados os ácidos orgânicos voláteis (AOVs), também nomeados de ácidos graxos voláteis (AGVs). Os AOVs são um dos fatores mais importantes na operação e controle de reatores anaeróbios na produção de biogás, pois a concentração desses ácidos permite analisar condições de estabilidade e instabilidade no reator. Além de influenciar nas rotas metabólicas dos microrganismos e na conversão até o produto final (biogás) (AQUINO; CHERNICHARO, 2005).

Diante disso, foi realizado o acompanhamento de um biorreator de fermentação contínua anaeróbia para a produção de biogás, utilizando como substratos lodo ativado e lodo flotado provenientes de um sistema de tratamento de resíduos de um abatedouro de aves, evidenciando os AOVs gerados durante o processo fermentativo. E o método de quantificação foi a partir da cromatografia, sendo a técnica mais empregada em métodos analíticos para a determinação de AOVs em amostras biológicas de efluentes.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Quantificar os ácidos orgânicos voláteis (AOVs) presentes na fração líquida de reatores anaeróbios de processos de produção de biogás pelas técnicas de cromatografia líquida e gasosa.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- I) Construir a curva analítica;
- II) Calcular os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ);
- III) Determinar os AOVs em amostras de reatores anaeróbios de produção de biogás;
- IV) Comparar as duas técnicas cromatográficas (líquida e gasosa) na determinação dos seguintes AOVs: acético, propiônico, butírico, valérico, isovalérico, capróico, láctico e fórmico.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 CROMATOGRAFIA

A cromatografia foi inventada pelo botânico russo Mikhail Tswett logo após a virada do século XX. Ele empregou a técnica para separar vários pigmentos de plantas, como as clorofilas e xantofilas, passando soluções dessas espécies através de colunas de vidro recheadas com carbonato de cálcio finamente dividido. As espécies separadas apareceram como bandas coloridas na coluna, o que explica o nome que ele escolheu para o método, do grego *chroma*, que significa “cor”, e *graphein*, que significa “escrever” (SKOOG; WEST; HOLLER; CROUCH, 2006).

A cromatografia é uma técnica que permite identificar, separar e determinar componentes químicos em misturas complexas. Na qual os componentes (analitos) de uma mistura são separados com base nas diferenças de velocidade de migração, nas quais são transportados através de uma fase estacionária por uma fase móvel líquida ou gasosa (SKOOG; WEST; HOLLER; CROUCH, 2006).

A técnica cromatográfica pode ser de dois tipos, a cromatografia planar e em coluna. A primeira, quando é em camada delgada, utilizando uma placa de vidro, de alumínio ou nos poros de um papel (FORESTI *et al*, 2005), nesse caso a fase móvel desloca-se através da fase estacionária por capilaridade ou por ação da gravidade. E na cromatografia em coluna, o modo mais utilizado, na qual a fase estacionária é acomodada dentro de uma coluna e a fase móvel é forçada a passar através da coluna sob pressão ou por gravidade (SKOOG; WEST; HOLLER; CROUCH, 2006).

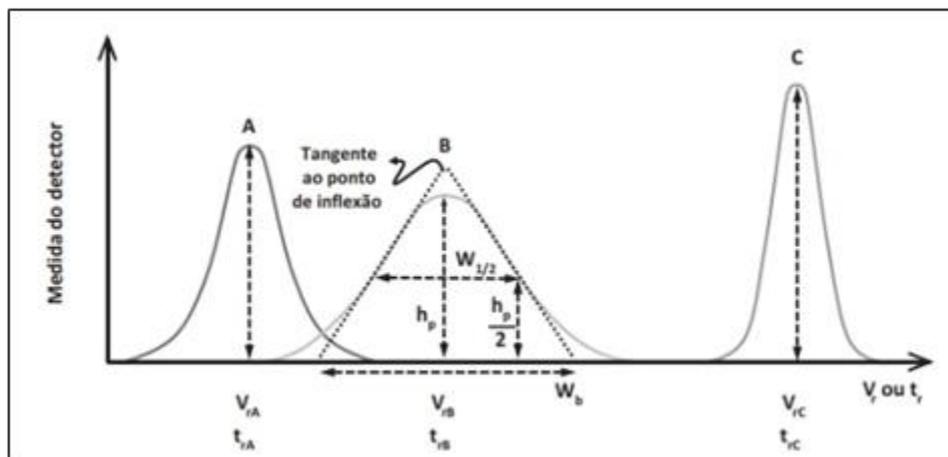
A cromatografia baseia-se na partição dos constituintes da amostra entre a *fase móvel* (FM), líquida, gasosa ou um fluido supercrítico e, a *fase estacionária* (FE), líquida ou sólida, ambos imiscíveis. A cromatografia é classificada de acordo com a fase móvel utilizada: *cromatografia líquida* (fase móvel é um líquido) e a *cromatografia gasosa* (fase móvel é um gás). E o princípio de separação é caracterizado de acordo com a fase estacionária, se for líquida, o mecanismo de separação ocorre por *partição*. Se for sólida, o modo de separação é por *adsorção* (FORESTI *et al*, 2005).

As técnicas cromatográficas que utilizam o fenômeno de partição são: a cromatografia em papel, a cromatografia líquido-líquido (CL), a cromatografia gás - líquido (CGL) e a High Performance Liquid Chromatography (HPLC). E em relação ao fenômeno de adsorção, pode-se citar: Cromatografia gás-sólido e cromatografia líquido-sólido (MATOS, 2015).

Têm-se também a denominação cromatografia preparativa, quando o objetivo é a purificação de uma quantidade de amostra a ser analisada, é possível coletar as frações da amostra separadas em seus componentes individuais, ou cromatografia analítica, quando o objetivo é determinar e quantificar as substâncias presentes (FORESTI *et al*, 2005).

Segundo Kilikian e Pessoa Jr. (2020), cromatograma é o sinal gráfico obtido após a separação da amostra. No gráfico, a ordenada identifica os diferentes solutos no eluente que sai da coluna e a abscissa representa o tempo ou o volume de eluente que passou pela coluna. A Figura 1 representa um cromatograma.

FIGURA 1 – EXEMPLO DE UM PICO CROMATOGRÁFICO



FONTE: KILIKIAN; PESSOA JR. (2020).

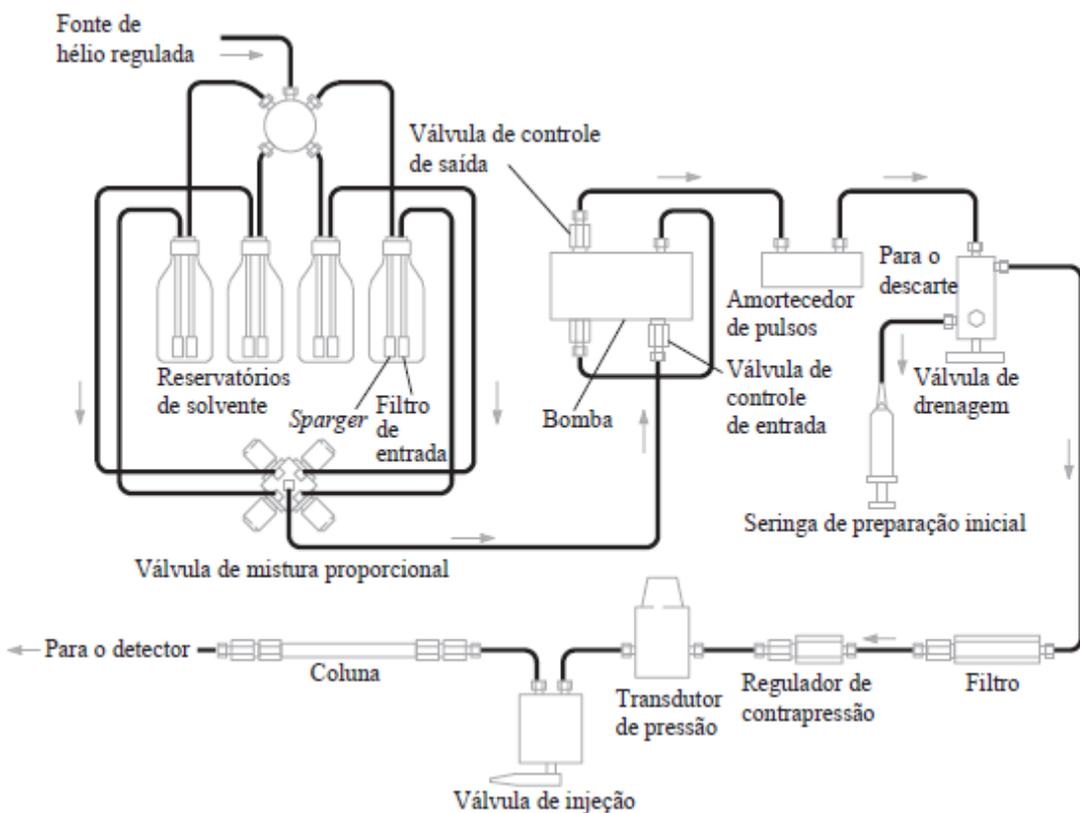
O ponto mais alto dos picos corresponde ao instante de máxima concentração da molécula no eluente (fase móvel), instante esse que caracteriza o tempo de retenção ( $t_r$ ) ou também o volume de retenção ( $V_r$ ), que é o volume que passa pela coluna até o instante de saída de uma dada molécula na sua máxima concentração. Além disso, há outros parâmetros que são analisados nos processos cromatográficos: altura do pico ( $h_p$ ), largura do pico na sua base ( $W_b$ ) e a largura do pico na metade de sua altura ( $W_{1/2}$ ).  $W_b$  e  $W_{1/2}$  são aplicadas na determinação do grau de separação entre duas moléculas e eficiência da separação (KILIKIAN; PESSOA JR., 2020).

### 2.1.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE ou HPLC)

Na cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês: High Performance Liquid Chromatography – HPLC), a fase móvel é um líquido e a fase estacionária pode ser líquida ou sólida, sendo muito finamente dividida. E o líquido é pressurizado para obter vazões satisfatórias (SKOOG; WEST; HOLLER; CROUCH, 2006). Há vários tipos de cromatografia líquida e o que define cada uma será o tipo de fase estacionária ou o mecanismo de separação, as quais podemos citar: cromatografia líquido-líquido (ou partição); cromatografia líquido-sólido (ou adsorção); cromatografia de troca iônica; cromatografia por exclusão de tamanho; cromatografia por afinidade e cromatografia quiral (MATOS, 2015).

Conforme a Figura 2, o HPLC é equipado com reservatórios de fase móvel e solventes; sistema de bombeamento; sistema de injeção da amostra; configuração da coluna e o detector.

FIGURA 2 - DIAGRAMA DOS ELEMENTOS DE UM CROMATÓGRAFO LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE OU HPLC)



FONTE: SKOOG; WEST; HOLLER; CROUCH (2006).

Os reservatórios de fase móvel e solventes são constituídos por frascos de vidro de 500 mL a 1L e, desgaseificadores para a remoção de gases dissolvidos e partículas presentes nos líquidos. Além disso, a eluição da fase móvel pode ser do tipo isocrática ou por gradiente, a primeira é quando a composição (ou concentração) do solvente permanece constante e a segunda, quando a composição (ou concentração) do solvente é alterada em etapas ou continuamente, ou seja, a proporção do solvente é variada, o qual o cromatógrafo é equipado com válvulas que podem introduzir líquidos de dois ou mais reservatórios (SKOOG; WEST; HOLLER; CROUCH, 2006).

Em relação ao sistema de bombeamento, existem três tipos principais de bomba: a de seringa acionada por rosca, a bomba recíproca e a pneumática de pressão constante (SKOOG; WEST; HOLLER; CROUCH, 2006). E o sistema de injeção da amostra pode ser manual ou automático e com volumes variáveis.

Em cromatografia líquida os principais detectores são: absorvância (UV-Vis), fluorescência, eletroquímico, índice de refração, condutividade, espectrometria de massas, FTIR, espalhamento de luz, atividade óptica, seletivo a elementos, fotoionização (KILIKIAN; PESSOA JR., 2020).

### 2.1.2 Cromatografia Gasosa (CG)

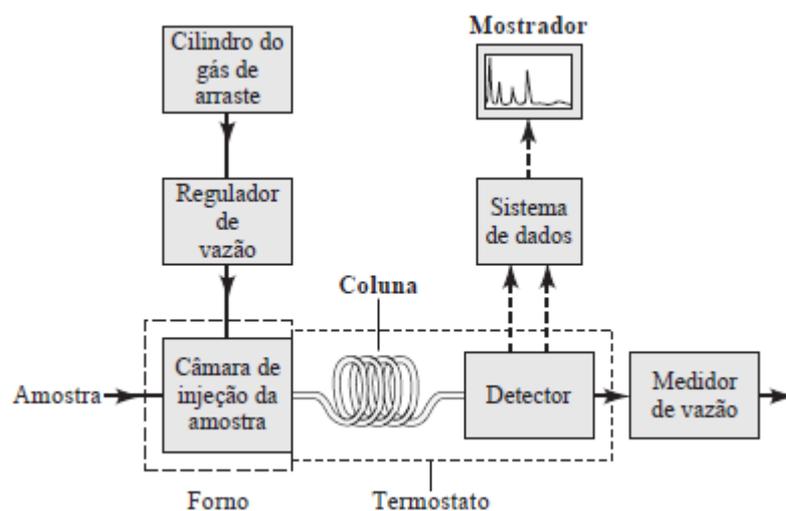
Na cromatografia gasosa, a amostra é vaporizada e separada em consequência da partição entre uma fase móvel gasosa e uma fase estacionária líquida ou sólida contida dentro da coluna. A eluição é realizada por um fluxo de fase móvel gasosa inerte, ou seja, a fase móvel não interage com o analito, sendo sua função transportar o analito através da coluna (SKOOG; WEST; HOLLER; CROUCH, 2006).

Existem dois tipos de CG, a cromatografia gás-líquido (CGL) e a cromatografia gás-sólido (CGS). Como citado, na CGL a fase móvel é um gás e a fase estacionária é um líquido retido na superfície de um sólido inerte ou nas paredes de um tubo capilar por adsorção ou ligação química. E na CGS a fase móvel é um gás e a fase estacionária é um sólido que retêm os analitos por adsorção física. A cromatografia gás-sólido é utilizada na separação de amostras com baixa massa molecular, tendo seu uso limitado. Enquanto a cromatografia gás-líquido permite amplo uso em diferentes áreas (MATOS, 2015; SKOOG; WEST; HOLLER; CROUCH, 2006).

Um cromatógrafo gasoso é composto pelos seguintes elementos: sistema de

gás de arraste; sistema de injeção de amostra; configuração da coluna e o detector, conforme indicado na Figura 3.

FIGURA 3 – DIAGRAMA DOS ELEMENTOS DE UM CROMATÓGRAFO GASOSO (CG)



FONTE: SKOOG; WEST; HOLLER; CROUCH (2006).

O sistema de gás de arraste (ou fase móvel) é quimicamente inerte e os gases mais utilizados são o hélio, argônio, nitrogênio, hidrogênio e ar sintético. Os gases ficam armazenados em cilindros pressurizados e possuem reguladores de pressão, manômetros e medidores de vazão que auxiliam no controle da vazão do gás. Sendo assim, a vazão do gás de arraste é controlada por um regulador de pressão no cilindro do gás e um outro regulador de pressão ou fluxo montado no cromatógrafo e, o medidor de vazão no final da coluna (SKOOG; WEST; HOLLER; CROUCH, 2006).

Em CG, as colunas podem ser de dois tipos: colunas recheadas e colunas capilares (ou colunas tubulares abertas), podendo ser de aço inoxidável, vidro, sílica fundida ou Teflon. A temperatura da coluna é uma variável que deve ser controlada dentro de poucos décimos de grau para obter uma boa precisão, sendo abrigada em um forno termostaticado e a temperatura ótima da coluna depende do ponto de ebulição da amostra. Sendo assim, normalmente, é empregada uma programação de temperatura para amostras com vários pontos de ebulição, o qual a temperatura é aumentada continuamente ou em etapas conforme o tempo (SKOOG; WEST; HOLLER; CROUCH, 2006).

Sobre o sistema de detecção, os detectores mais comuns são: ionização em

chama (FID); condutividade térmica; captura de elétrons; espectrômetro de massas; termiônico; condutividade eletrolítica (Hall); fotoionização e infravermelho com transformada de Fourier, sendo os quatro primeiros os mais empregados (FORESTI *et al*, 2005).

## 2.2 DIGESTÃO ANAERÓBIA

A degradação da matéria orgânica normalmente é realizada na ausência de oxigênio pelo processo chamado de digestão anaeróbia, o qual tem como produto final o biogás. Em termos gerais, a digestão anaeróbia é um processo que ocorre na ausência de ar atmosférico, ocorrendo a decomposição da matéria orgânica por meio de microrganismos acidogênicos e metanogênicos, mantendo a temperatura em torno de 35 °C. Do ponto de vista da conversão energética, o produto final é composto por metano (50 a 75%) e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), tendo um conteúdo energético em torno de 5.500 kcal / m<sup>3</sup> e o efluente gerado durante o processo pode ser utilizado como biofertilizante (SÁ *et al*, 2014).

A digestão anaeróbia da matéria orgânica envolve a atividade de pelo menos três grupos de microrganismos: I) bactérias fermentativas (ou acidogênicas); II) bactérias acetogênicas (ou sintróficas) e III) microrganismos metanogênicos (AQUINO; CHERNICHARO, 2005).

A conversão da matéria orgânica complexa é dividida em dois estágios e quatro etapas principais, no primeiro estágio ocorre a formação de ácidos e no segundo, a formação de metano. Sendo que no primeiro estágio ocorrem as etapas de hidrólise, acidogênese e acetogênese. E no segundo, a etapa da metanogênese.

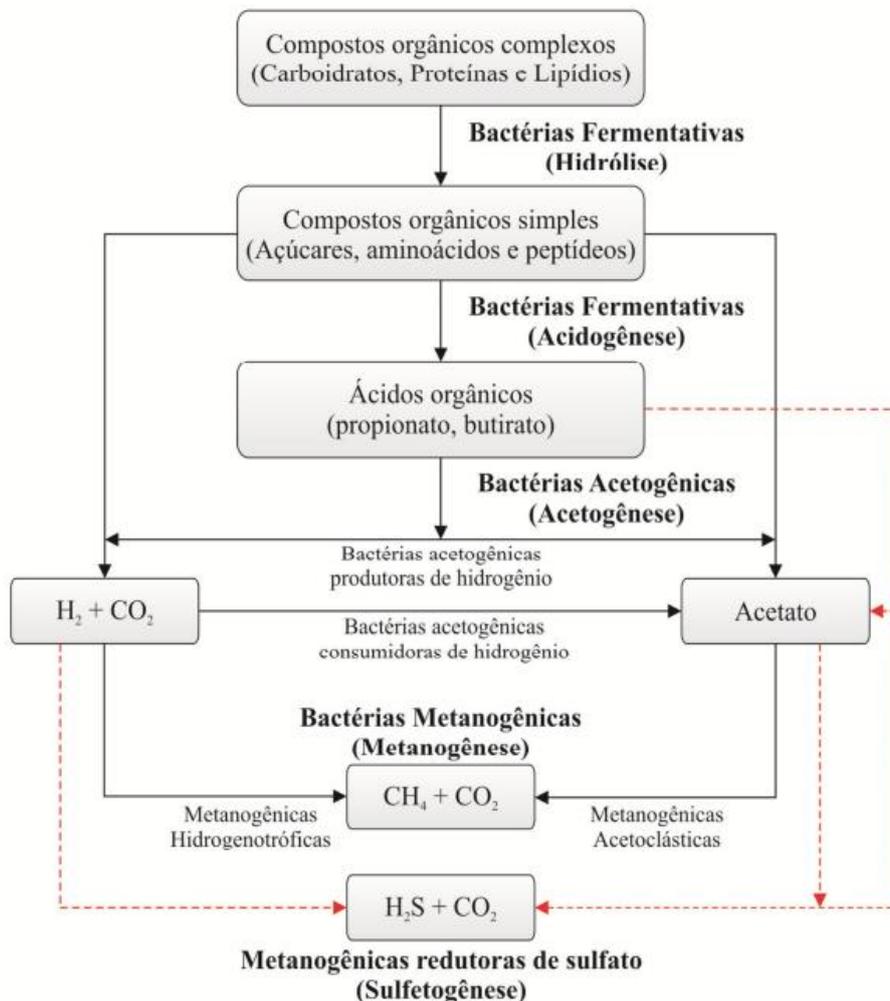
Na hidrólise a matéria orgânica complexa, como carboidratos, lipídeos e proteínas, é hidrolisada por bactérias hidrolíticas (ou fermentativas), em produtos mais simples, ou seja, em monômeros dissolvidos (açúcares, aminoácidos, peptídeos e ácidos graxos). Na acidogênese, os produtos da hidrólise são convertidos, por bactérias acidogênicas (ou fermentativas), em ácidos orgânicos (principalmente acético, propiônico e butírico), álcoois (etanol e butanol) e cetonas (acetonas). E na fase acetogênese, tem a formação de acetato, hidrogênio (H<sub>2</sub>), dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), sendo convertidos por bactérias acetogênicas e além delas, há as bactérias homoacetogênicas, que transformam o H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> em acetato (SÁ *et al*, 2014; ARAÚJO, 2017; FLORES, 2019).

Após a acetogênese, tem-se o segundo estágio, a fase da metanogênese, onde

ocorre a formação de metano ( $\text{CH}_4$ ) e dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) por bactérias metanogênicas hidrogenotróficas (utilizam  $\text{H}_2$  e  $\text{CO}_2$  para produzir  $\text{CH}_4$  e  $\text{CO}_2$ ) e bactérias metanogênicas acetoclásticas (convertem o acetato em  $\text{CH}_4$  e  $\text{CO}_2$ ) (ARAÚJO, 2017; FLORES, 2019).

Por fim, a fase sulfetogênese, nem sempre ocorre e é indesejável que ocorra, pode acontecer quando os resíduos que contém enxofre encontram-se em condições favoráveis à sua produção pela redução de sulfatos e sulfitos em sulfeto (BERGER, 2013).

FIGURA 4 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA DIGESTÃO ANAERÓBIA



FONTE: BASSIN E DEZOTTI (2008) *apud* BERGER (2013).

Segundo Aquino e Chernicharo (2005), os microrganismos fermentativos são os primeiros a atuar na etapa sequencial de degradação do substrato e são os que mais se beneficiam energeticamente. Por causa disso, bactérias acidogênicas

possuem baixo tempo mínimo de geração (em torno de 30 minutos) e as mais elevadas taxas de crescimento do consórcio microbiano. Desta forma, a etapa acidogênica só será limitante do processo se o material a ser degradado não for facilmente hidrolisado.

Além disso, o processo fermentativo permite a utilização de diversos substratos, principalmente resíduos lignocelulósicos, glicerina, resíduos alimentícios e lácteos, gorduras, entre outros e, permite a geração de metabólitos intermediários de alto valor agregado. A produção de biogás por fermentação anaeróbia pode ser realizada por culturas mistas ou puras e diversos tipos de microrganismos podem ser utilizados para a produção (FONSECA, 2016; SÁ *et al*, 2014).

### 2.3 CONDIÇÕES OPERACIONAIS EM REATORES ANAERÓBIOS

Dentre as condições operacionais nos reatores, pode-se citar, o tipo de biorreator, substrato (nutrientes), carga orgânica, microrganismo, tempo de detenção hidráulica e o modo de condução do processo fermentativo. Além disso, há outros parâmetros bioquímicos que influenciam nas condições operacionais dos reatores juntamente com os AOVs, como pH e temperatura.

Outro aspecto importante é a partida do reator, segundo Araújo (2017) , após a partida da operação, deve-se evitar ou combater alterações nas condições ideais do ambiente e sobrecarga orgânica, hidráulica ou tóxica, através de determinações e controles de vazões, concentração de matéria orgânica, compostos tóxicos compatíveis com o resíduo a ser digerido, volume e composição dos gases produzidos. Desde que o resíduo orgânico seja bem caracterizado, e que não sofra muitas variações ao longo do tempo, essas determinações podem ser efetuadas eventualmente ou até evitadas.

Para lidar com distúrbios e desequilíbrios em reatores anaeróbios é preciso identificar as causas do problema e dos fatores que limitam os processos metabólicos envolvidos, e isso só será efetivamente conseguido a partir do entendimento dos fenômenos físico-químico-biológicos que governam o tratamento anaeróbio (AQUINO; CHERNICHARO, 2005).

### 2.3.1 Ácidos orgânicos voláteis (AOVs)

Os ácidos orgânicos voláteis (AOVs) são ácidos de cadeia curta, de baixo peso molecular, de elevado caráter hidrofílico e que apresentam valores de pKa que variam de 3,75 a 4,87. Os AOVs que contém de 1 a 5 carbonos são comumente denominados ácidos fórmico (C1), láctico (C3), acético (C2), propiônico (C3), butírico (C4), valérico (C5), isovalérico (C5) e com exceção do ácido capróico que contém 6 carbonos, apresentam-se predominantemente dissociados em meios cujos valores de pH sejam maiores que os respectivos valores de pKa. Em função disso, é comum na literatura da engenharia sanitária e ambiental se referir a tais compostos pelo nome do sal correspondente (exemplo: acetato, propionato, butirato) (MESQUITA *et al*, 2013).

Os AOVs são um dos principais indicadores no monitoramento dos reatores de fermentação anaeróbia, a fim de prever instabilidade durante o processo de degradação da matéria orgânica. Os microrganismos fermentativos não dispõem de um aceptor final de elétrons, em condições anaeróbias, como oxigênio nos processos aeróbios. Assim, o substrato orgânico é ao mesmo tempo utilizado como aceptor e doador de elétrons, desta forma, uma parte do composto orgânico poluente é oxidada enquanto a outra parte é reduzida (AQUINO; CHERNICHARO, 2005).

Nesse sentido:

A fermentação de 1 mol de glicose por esse processo produz 2 moles de ácido pirúvico, e como o ácido pirúvico é um composto mais oxidado que a glicose, a sua formação envolve a geração de 2 moles de NADH, que é a forma reduzida do transportador de elétrons (NAD<sup>+</sup>) mais comum na degradação de carboidratos. Como há quantidade limitada de NAD<sup>+</sup> dentro das células, o microorganismo precisa re-oxidar e reciclar o transportador de elétrons se livrando dos 2 elétrons presentes na molécula de NADH. Microorganismos aeróbios fazem essa reciclagem transferindo elétrons do NADH para o oxigênio, o que leva a formação de água, enquanto que microorganismos anaeróbios fermentativos transferem os elétrons do NADH para a molécula de piruvato [para formar NAD<sup>+</sup>], levando à formação de vários compostos reduzidos (principalmente propionato, butirato, hidrogênio, etanol, propanol, formiato) a depender do tipo de microorganismo e das condições ambientais envolvidas (AQUINO; CHERNICHARO, 2005, p. 153).

É favorável que a reciclagem de NADH seja realizada por microrganismos que tem a capacidade de reduzir prótons, produzindo hidrogênio. Pois a canalização de elétrons para a formação de hidrogênio, diminui a formação de produtos mais reduzidos que acetato (como propionato, butirato e etanol), que além de contribuírem na DQO do efluente, não são substratos diretos da metanogênese. Em contrapartida, a acumulação de hidrogênio na fase dissolvida pode levar a inibição termodinâmica de importantes conversões metabólicas (AQUINO; CHERNICHARO, 2005).

Segundo Cerqueira (2011), entre os ácidos carboxílicos com baixa massa molecular (C2-C5), os ácidos acético, propiônico e butírico são os mais importantes quantitativamente nesse processo. Os autores ainda evidenciam, que a presença de AOVs, geralmente, é um indicativo de atividade bacteriana, a determinação das concentrações dos ácidos orgânicos voláteis tem sido utilizada como um indicador útil no monitoramento da produção de biogás. Os AOVs podem ser estimulantes, inibidores ou mesmo tóxicos para as bactérias fermentativas. Níveis baixos de concentração de AOVs podem não ter efeito ou ter um efeito estimulante sobre a produção de biogás. No entanto, em níveis elevados de concentração, os AOVs podem levar a uma severa inibição sobre a geração de hidrogênio.

Um reator estável, operando sob condições ótimas de crescimento microbiano e degradação de matéria orgânica, pode operar próximo a condições de equilíbrio termodinâmico. Porém, essa condição é raramente observada devido às variações na concentração, composição e vazão do afluente e às mudanças de condições ambientais, como temperatura, ausência temporária de nutrientes e presença temporária de compostos tóxicos. Os principais fatores que contribuem para a acumulação de AOVs e que determinam o grau de estabilidade de reatores anaeróbios durante condições de distúrbio são os limites cinéticos e termodinâmicos, associados a choque de carga orgânica. (AQUINO; CHERNICHARO, 2005).

Além dos AOVs, também são produzidos outros compostos intermediários, como os álcoois. E a concentração desses compostos interferem na conversão do produto final. Na Tabela 1, evidencia-se as reações químicas da formação de alguns AOVs e álcoois gerados durante a digestão anaeróbia a partir de glicose e glicerol.

TABELA 1 - REAÇÕES QUÍMICAS DA FORMAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS E ÁLCOOIS PROVENIENTES DA ETAPA DE ACIDOGÊNESE ATÉ A FORMAÇÃO DE CO<sub>2</sub> E H<sub>2</sub> A PARTIR DA GLICOSE E DO GLICEROL

Glicose <sup>1</sup>	Glicerol <sup>2</sup>
<b>Ácido acético:</b> C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> + 2 H <sub>2</sub> O ----> 2 CH <sub>3</sub> COOH + 2 CO <sub>2</sub> + 4 H <sub>2</sub>	<b>Ácido acético:</b> C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> + H <sub>2</sub> O ----> CH <sub>3</sub> COOH + CO <sub>2</sub> + 3 H <sub>2</sub>
<b>Ácido butírico:</b> C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> ----> CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOH + 2 CO <sub>2</sub> + 2 H <sub>2</sub>	<b>Ácido butírico:</b> C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> ----> C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> + 2 CO <sub>2</sub> + 4 H <sub>2</sub>
<b>Etanol e acetato:</b> C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> + 2 H <sub>2</sub> O ----> CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH + CH <sub>3</sub> COOH + 2 CO <sub>2</sub> + 2 H <sub>2</sub>	<b>Butanol:</b> 2 C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> ----> C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O + 2 CO <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O + 2 H <sub>2</sub>
<b>Ácido propiônico:</b> C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> + 2 H <sub>2</sub> ----> 2 CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> COOH + 2 H <sub>2</sub> O	<b>Etanol:</b> C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> ----> C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O + CO <sub>2</sub> + H <sub>2</sub>
<b>Etanol:</b> C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> ----> 2 CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH + 2 CO <sub>2</sub>	<b>1,3 - propanodiol:</b> 2 C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> ----> CH <sub>3</sub> COOH + C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub> + 2 H <sub>2</sub> (gerando ácido acético e butírico)
<b>Ácido láctico:</b> C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> ----> CH <sub>3</sub> CHOHCOOH + 2 CO <sub>2</sub>	<b>Ácido láctico:</b> C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> ----> C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> + H <sub>2</sub>
<b>Razão 3/2 ácido butírico e acético:</b> 4 C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> + 2 H <sub>2</sub> O ----> 3 CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOH + 2 CH <sub>3</sub> COOH + 8 CO <sub>2</sub> + 10 H <sub>2</sub>	<b>Succinato:</b> 2 C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> ----> C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub> + 2 CO <sub>2</sub> + 5 H <sub>2</sub>

Fonte: GHIMIRE *et al* (2015)<sup>1</sup> e MAINTINGUER *et al* (2015)<sup>2</sup>.

### 2.3.2 pH: acidez e alcalinidade

Nas fases da hidrólise e da acidogênese, o pH ideal fica em torno de 5,2 a 6,3. E nas etapas da acetogênese e metanogênese o pH ideal fica entre 6,5 a 8. Abaixo do pH crítico pode haver precipitação dos íons metálicos, bem como inibição da ação bacteriana, devido à produção de ácidos, visto que a parede celular bacteriana é mais permeável às moléculas não dissociadas em comparação com suas formas ionizadas. Acima do pH crítico, a partir do qual a concentração de íons carbonato disponíveis é elevada, os metais pesados passam a ser precipitados na forma de carbonatos, e neste caso é acentuada a influência do pH (ARAÚJO, 2017).

### 2.3.3 Temperatura

A temperatura é um dos parâmetros que afeta diretamente a fermentação anaeróbica, temperaturas extremas influenciam na inibição dos microrganismos, por isso é importante manter uma temperatura constante dentro do reator. A porcentagem de metano na constituição do biogás é maior quando o processo de fermentação ocorre em temperaturas mais elevadas, o que garante um maior poder calorífico a mistura, sendo que a velocidade de digestão anaeróbica é maior a temperaturas termofílicas em relação as mesofílicas (ARAÚJO, 2017).

As arqueas metanogênicas podem ser divididas em dois grupos, as mesofílicas, que atuam em temperaturas na faixa de 20 a 40°C e as termofílicas, que atuam na faixa de 50 a 60°C. O processo de digestão e gaseificação é altamente acelerado em temperaturas entre 35 e 37°C. Para temperaturas inferiores a 35°C o processo de digestão é menor e para temperaturas inferiores a 15°C, a produção é muito reduzida, podendo ser cessada (BARREIRA, 2003 *apud* ARAÚJO,2017).

## 2.4 SUBSTRATOS

Vários materiais ricos em carboidratos, proteínas e lipídios são utilizados como substratos na produção de hidrogênio e metano por processos biológicos, entretanto os carboidratos é a fonte mais utilizada nos processos fermentativos, porém, há substratos alternativos que começaram a serem utilizados na produção de biogás, o qual podemos destacar os subprodutos provenientes de biomassa e de biocombustíveis (por exemplo, o glicerol), permitindo assim o reaproveitamento dos resíduos.

Carboidratos simples, como sacarose e glicose, são facilmente biodegradáveis, sendo bastante utilizados como substratos modelo. No entanto, fontes puras de carboidratos representam matérias-primas caras para produção de biogás em grande escala, sendo viáveis apenas quando baseadas em fontes renováveis e de baixo custo. É neste contexto que se destaca a utilização de materiais residuais como potenciais substratos para a produção de biogás (FONSECA, 2016).

Os resíduos lignocelulósicos originados do processo de produção de etanol e a glicerina (ou glicerol) do processo de produção de biodiesel são dois materiais residuais que merecem destaque com relação ao grande potencial de produção de

hidrogênio e biogás. A biomassa lignocelulósica, proveniente do bagaço da cana-de-açúcar, consiste em um material complexo, cuja estrutura é formada por celulose, hemicelulose (ou xilana) e lignina (SÁ *et al*, 2014).

Conforme estudos realizados por Sá *et al* (2014), em que utilizaram substratos sintéticos que simulavam resíduos da produção de etanol de primeira geração (a partir da sacarose), etanol de segunda geração (a partir de materiais lignocelulósicos, os quais permitem a geração de açúcares C5 e C6) e glicerina, os autores obtiveram os seguintes resultados em relação a produção de hidrogênio: o meio contendo sacarose apresentou o maior rendimento de H<sub>2</sub> (4,24 mol de H<sub>2</sub>/mol de sacarose), os meios com glicose, frutose e xilose apresentaram rendimentos similares, 2,19, 2,09 e 1,88 mol de H<sub>2</sub>/mol de substrato, respectivamente e o menor rendimento de H<sub>2</sub> foi obtido quando se utilizou a glicerina como substrato (0,80 mol de H<sub>2</sub>/mol de glicerina).

Entretanto, do ponto de vista energético, o glicerol é um interessante substrato para a geração de hidrogênio biológico, pois pode ser biodegradado por bactérias anaeróbias fermentativas. Sendo assim, ele é gerado pelo processo de obtenção de biodiesel a partir de óleos vegetais ou gorduras animais, o qual utiliza a adição de catalisadores, como o hidróxido de sódio e álcoois, como o metanol e o etanol, com reatores mantidos sob aquecimento e agitação (MAINTINGUER *et al*, 2015).

As gorduras, óleos e graxas, segundo Long *et al* (2012), podem ser degradados anaerobicamente através da via de oxidação em acetato e H<sub>2</sub>, que são posteriormente convertidos em metano. A beta-oxidação começa quando o ácido graxo é ativado pela coenzima - A e a oxidação resultante leva à liberação de acetil-CoA e a formação de uma cadeia de ácido graxo, que é encurtada por dois carbonos. O acetil-CoA é oxidado por meio do ciclo do ácido cítrico e o processo de beta-oxidação é repetido. A digestão anaeróbica de gordura tem um rendimento teórico de 1430 mL de biogás/g em comparação com 930 mL de biogás/g para proteínas e 840 mL de biogás/g para carboidratos. Proteínas e carboidratos podem ser convertidos em biogás com 50-58% de metano, enquanto as gorduras podem ser convertidas em biogás com 66-73% de metano.

#### 2.4.1 Lodo ativado e lodo flotado como substratos alternativos

Dentre os materiais residuais que podem ser utilizados como substratos, além dos resíduos lignocelulósicos e do glicerol, os resíduos provenientes de sistemas de tratamentos industriais, como o lodo ativado e o lodo flotado, também merecem destaque como substratos alternativos na produção de biogás.

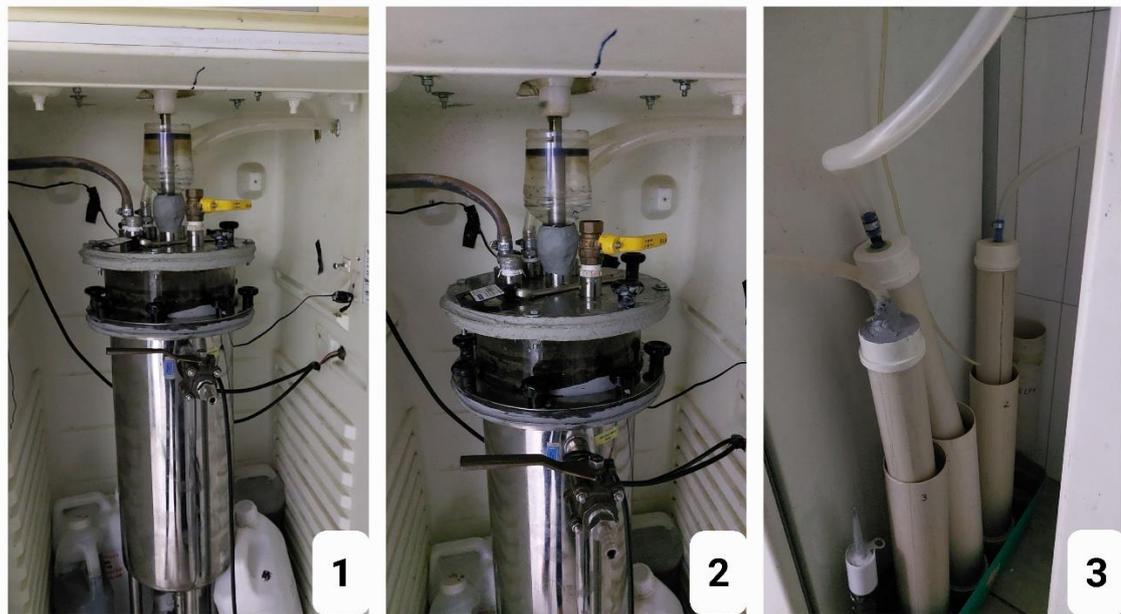
O lodo flotado é um resíduo gorduroso, que apresenta elevada carga orgânica, enquanto o lodo ativado encontra-se nos processos finais nas lagoas de tratamento, sendo considerado um resíduo “mais limpo”, comparado ao lodo flotado. Sendo assim, o lodo flotado pode ser um potencial substrato na geração de energia, principalmente ao utilizá-lo juntamente com outros resíduos industriais, por exemplo, com o próprio lodo ativado. A utilização dele sozinho para a produção de biogás não é viável, visto que é um resíduo composto por lipídeos, demandando mais energia por parte dos microrganismos para a sua degradação (FLORES, 2019).

O sistema de lodos ativados presentes no Brasil, proporciona ótima eficiência na remoção de carga orgânica e nitrogênio. Porém, ainda necessita de eliminação dos resíduos de lodo gerado, necessitando de outro processo de tratamento para estabilizar a matéria orgânica. E o processo mais viável é a degradação da matéria orgânica por meio da fermentação anaeróbia. O sistema de tratamento por reator anaeróbio depende de uma série de fatores que influenciam no equilíbrio do sistema, sendo assim, a biodigestão demanda do acompanhamentos dos níveis de pH, alcalinidade, acidez, temperatura, produção de subprodutos, como os ácidos orgânicos voláteis e ácidos graxos de cadeia longa, além do balanço de substrato e inóculo (FLORES, 2019).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizado o acompanhamento de um biorreator anaeróbio com alimentação contínua de mistura completa para a produção de biogás, localizado no Laboratório de Biocombustíveis da Universidade Federal do Paraná (UFPR) - Setor Palotina, tendo como substratos lodo ativado e lodo flotado provenientes do sistema de tratamento de resíduos de um abatedouro de aves. A ideia central dessa pesquisa (de doutorado) é saber qual é a quantidade limite de lodo flotado que pode ser adicionado a fim de não ocorrer inibição dos microrganismos responsáveis pela fermentação. Diante do contexto, os AOVs gerados no decorrer do processo foram analisados e comparados a partir de duas técnicas cromatográficas, devido que a presença dos ácidos geralmente é indicativo de atividade bacteriana e indicador no monitoramento de produção de biogás. Na Figura 5 pode-se observar a imagem do reator anaeróbio.

FIGURA 5 – BIORREATOR (1 E 2) E GASÔMETROS (3)



FONTE: Imagens cedidas por Kátia Fagnani (discente de doutorado da UNIOESTE - Cascavel) (2022).

### 3.1 REAGENTES

Os padrões analíticos dos ácidos acético; propiônico; butírico; valérico; isovalérico; caprótico; láctico e ácido crotônico foram obtidos da Sigma – Aldrich Brasil Ltda (São Paulo, Brasil), o ácido fórmico da Alphatec (Control Lab, Paraná, Brasil), éter etílico da Cromoline Química Fina Ltda (São Paulo, Brasil); sulfato de sódio da Dinâmica Química Contemporânea Ltda (São Paulo, Brasil) e o metanol HPLC da J.T Baker SOLUSORB® (LAS do Brasil Ltda, Goiás, Brasil). E a água utilizada no processo foi purificada em sistema de água Ultrapura Arium® Mini da Sartorius (São Paulo, Brasil).

### 3.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

#### 3.2.1 Instrumentação

O equipamento utilizado para a pesquisa foi do Laboratório de Análise Instrumental e Controle de Qualidade da Universidade Federal do Paraná (UFPR) - Setor Palotina.

A separação por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi realizada no equipamento da Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000, com detector DAD (Diode Array Detector), injeção automática e sistema de aquisição de dados Chromeleon Console 7 (Figura 6). A coluna utilizada foi a de fase reversa RP C18 ACE (5 µm; 250 x 4,6 mm), com vazão de 1,0 mL.min<sup>-1</sup> e injeção de 20 µL de amostra. A identificação dos AOVs foi realizada a partir dos seus tempos de retenção e pela comparação entre os espectros (na região ultravioleta - UV), no comprimento de onda de 220 nm, das misturas das soluções padrões e dos picos obtidos das amostras. A eluição da fase móvel foi do tipo gradiente, sendo a composição: solução de ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) (pH3): metanol, com tempo de corrida de 33 min. Na Tabela 2 é apresentada o sistema de eluição da fase móvel.

FIGURA 6 – CROMATÓGRAFO LÍQUIDO (HPLC)



FONTE: A autora (2022).

TABELA 2 - SISTEMA DE ELUIÇÃO DA FASE MÓVEL PARA O HPLC

	Razão (%/min)	Proporção da fase móvel (%) *	Tempo de espera (min)
<b>Início</b>	-	90:10	5,0
<b>1</b>	3,0	75:25	5,0
<b>2</b>	20,0	35:65	2,0
<b>3</b>	5,0	25:75	2,0

FONTE: A autora (2022).

NOTA: \* Proporção da fase móvel (%): solução de ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ) (pH3): metanol.

### 3.2.2 Preparo das soluções padrões

Para a determinação dos AOVs seguiu-se a metodologia proposta por Cerqueira *et al* (2011) e Silva *et al* (2017).

Foram preparadas soluções estoque individuais dos ácidos acético, propiônico, butírico, valérico, isovalérico, capróico, láctico e fórmico na concentração de 1000 mg.L<sup>-1</sup> diluídas em água purificada.

As soluções da mistura dos oito AOVs para a construção da curva analítica foram obtidas a partir da diluição da solução estoque de 1000 mg.L<sup>-1</sup>. Foram preparadas soluções analíticas nas concentrações de 7,5; 15,0; 30,0; 60,0; 120,0; 150,0 e 300,0 mg.L<sup>-1</sup>, diluídas em água purificada com pH 3 acidificada com ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ) e em triplicata cada concentração. E depois adicionadas em vials de 1,5 mL.

As fases móveis foram metanol e água purificada com pH 3 acidificada com ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ). A água acidificada purificada foi filtrada em sistema a vácuo e depois desgaseificada em banho ultrassônico por 25 min a 35 °C.

### 3.2.3 Amostras

As amostras foram provenientes do reator de fermentação contínua anaeróbia para a produção de biogás (Figura 5), mantido até a temperatura de 40 °C. Devido ao alto teor de sólidos nas amostras, as mesmas foram centrifugadas durante 10 minutos e filtradas em filtro de seringa PES, diâmetro de 25 mm e poro 0,45  $\mu m$ . É possível observar na Figura 8 as amostras depois de centrifugadas e filtradas.

Para realizar a injeção no HPLC, após centrifugar e filtrar as amostras, foi ajustado o pH com ácido fosfórico até pH 3 e transferidas para os vials de 1,5 mL (sem insert). As amostras analisadas no HPLC foram do 11° mês de operação, em que a concentração de lodo flotado foi superior a 80% (o longo período de operação é devido o reator ter apresentado instabilidade ao decorrer do tempo).

### 3.2.4 Testes de extração realizados com as amostras do reator anaeróbio

Sendo assim, mesmo que a cromatografia líquida permite análise direta, foram testados diferentes tratamentos com as amostras para observar o perfil cromatográfico das mesmas e analisar a necessidade ou não de uma etapa de extração para minimizar as impurezas. Os tratamentos realizados foram descritos na Tabela 3.

TABELA 3 - TESTES REALIZADOS PARA ANALISAR O PERFIL CROMATOGRÁFICO DAS AMOSTRAS DO REATOR ANAERÓBIO

<b>Tratamentos</b>	
<b>Tratamento 1</b>	Amostra centrifugada e filtrada (pH 3);
<b>Tratamento 2</b>	Amostra com fortificação dos AOVs;
<b>Tratamento 3</b>	Microextração líquido-líquido utilizando éter etílico e acetonitrila;
<b>Tratamento 4</b>	Microextração líquido-líquido com fortificação dos AOVs utilizando éter etílico e acetonitrila.

FONTE: A autora (2022).

NOTA: A microextração líquido-líquido para o HPLC foi realizada conforme o Fluxograma 1 (descrito em 3.3.2), sem a adição do padrão interno e o pH foi ajustado com ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ).

### 3.3 CROMATOGRAFIA GASOSA (CG)

#### 3.3.1 Instrumentação

O equipamento utilizado para a pesquisa foi do Laboratório de Análise Instrumental e Controle de Qualidade da Universidade Federal do Paraná (UFPR) - Setor Palotina.

Na técnica de cromatografia gasosa (CG) o equipamento utilizado foi da Thermo Scientific Trace 1310, com detector FID (Ionização de chama), modo de injeção automático e sistema de aquisição de dados Chromeleon® Version 7.1.2.1478 (Figura 7). Coluna do tipo capilar ZB-WAXplus, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, injeção de 1,0 µL de amostra, vazão de 1,0 mL/min de nitrogênio. Sistema de gases: hidrogênio, ar sintético e nitrogênio. E na Tabela 4 é apresentado o sistema de temperatura, com tempo de corrida de 17,93 min.

FIGURA 7 – CROMATÓGRAFO GASOSO (CG)



FONTE: A autora (2022).

TABELA 4 – SISTEMA DE AQUECIMENTO PARA O CG

	Razão (°C/min)	Temperatura (°C)	Tempo de espera (min)
<b>Início</b>	-	40,0	1,0
<b>1</b>	20,0	60,0	1,0
<b>2</b>	50,0	115,0	3,0
<b>3</b>	10,0	140,0	0,0
<b>4</b>	30,0	240,0	5,0

FONTE: A autora (2022).

### 3.3.2 Preparo das soluções padrões

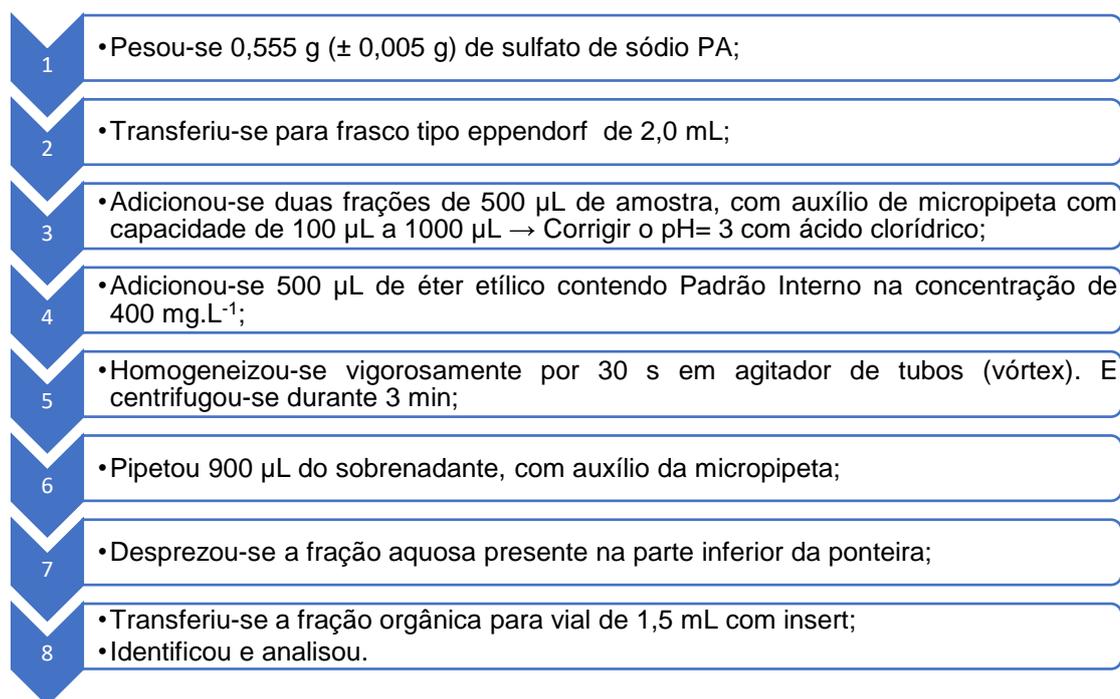
Seguiu-se a metodologia proposta por Pavini (2017) para a determinação dos AOVs por cromatografia gasosa.

As soluções estoque individuais dos ácidos foram preparadas nas concentrações de 5000 mg.L<sup>-1</sup> para o ácido capróico e 10 000 mg.L<sup>-1</sup> para os ácidos acético, propiônico, butírico, valérico, isovalérico, láctico e fórmico, diluídas em água purificada.

Foi utilizado como padrão interno o ácido crotônico e como solvente, o éter etílico. Foi preparado uma solução estoque de 4000 mg.L<sup>-1</sup> e depois fez-se a diluição para 400 mg.L<sup>-1</sup>, para ser utilizado na etapa da microextração líquido-líquido, conforme o Fluxograma 1.

As soluções da mistura dos oito AOVs para a construção da curva analítica foram obtidas a partir da diluição das soluções estoque de 5000 e 10000 mg.L<sup>-1</sup>. As concentrações escolhidas foram divididas em curva baixa e curva alta. Assim, as concentrações da curva baixa foram 18; 36; 60; 90; 120 e 200 mg.L<sup>-1</sup>. E as da curva alta 200; 400; 600; 800 e 1000 mg.L<sup>-1</sup>. Diluídas em água purificada e injetadas em triplicata. Após isso, parte para a etapa de microextração líquido-líquido, apresentado no Fluxograma 1.

## FLUXOGRAMA 1 – PROCESSO DE MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO PARA O CG



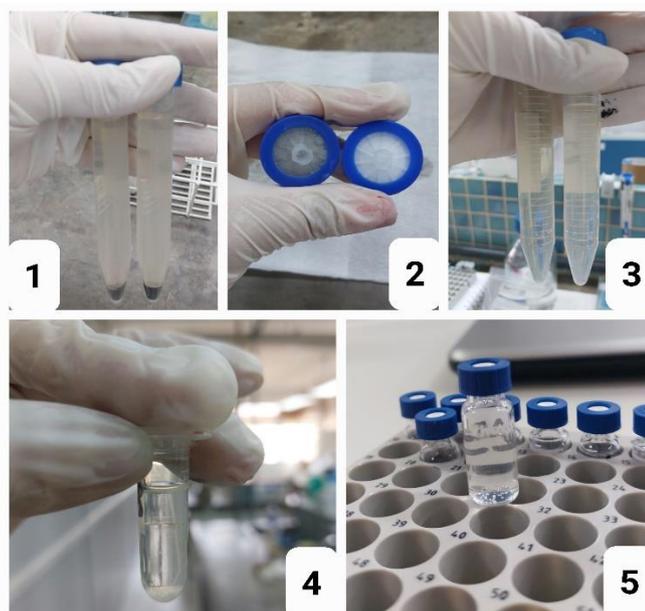
FONTE: A autora (2022).

### 3.3.3 Amostras

As amostras foram provenientes do reator de fermentação contínua anaeróbia para a produção de biogás (Figura 5), mantido até a temperatura de 40 °C. Devido ao alto teor de sólidos nas amostras, as mesmas foram centrifugadas durante 10 minutos e filtradas em filtro de seringa PES, diâmetro de 25 mm e poro 0,45  $\mu$ m. Foram analisadas 23 amostras do reator anaeróbio entre o 3° e 4° mês do início de operação do reator.

Para injetar no CG, após centrifugadas e filtradas, as amostras passaram pelo processo de microextração líquido-líquido, conforme o Fluxograma 1 e transferidas para os vials de 1,5 mL com insert. Na Figura 8 é apresentada as amostras do reator depois de centrifugadas e filtradas e, após a microextração líquido-líquido.

FIGURA 8 - AMOSTRAS: CENTRIFUGADAS (1); FILTRADAS (2 E 3); APÓS MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO PARA INJETAR NO CG (4) E VIALS COM AS AMOSTRAS (5)



FONTE: A autora (2022).

### 3.4 LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)

O Limite de detecção (LD) é a menor quantidade de uma substância que pode ser detectada pelo método. E o Limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade da substância que pode ser medida pelo método. Sendo assim, os LD e LQ podem ser calculados pelo método visual, relação sinal-ruído e baseado em parâmetros da curva analítica (PENTEADO, 2012).

Neste trabalho utilizou-se os parâmetros da curva analítica para calcular os LD e LQ, a partir das Equações 1 e 2.

$$LD = 3,3 \frac{s}{a} \quad \text{Equação 1}$$

$$LQ = 10 \frac{s}{a} \quad \text{Equação 2}$$

Onde:  $s$  = desvio padrão do intercepto;  
 $a$  = coeficiente angular da reta.

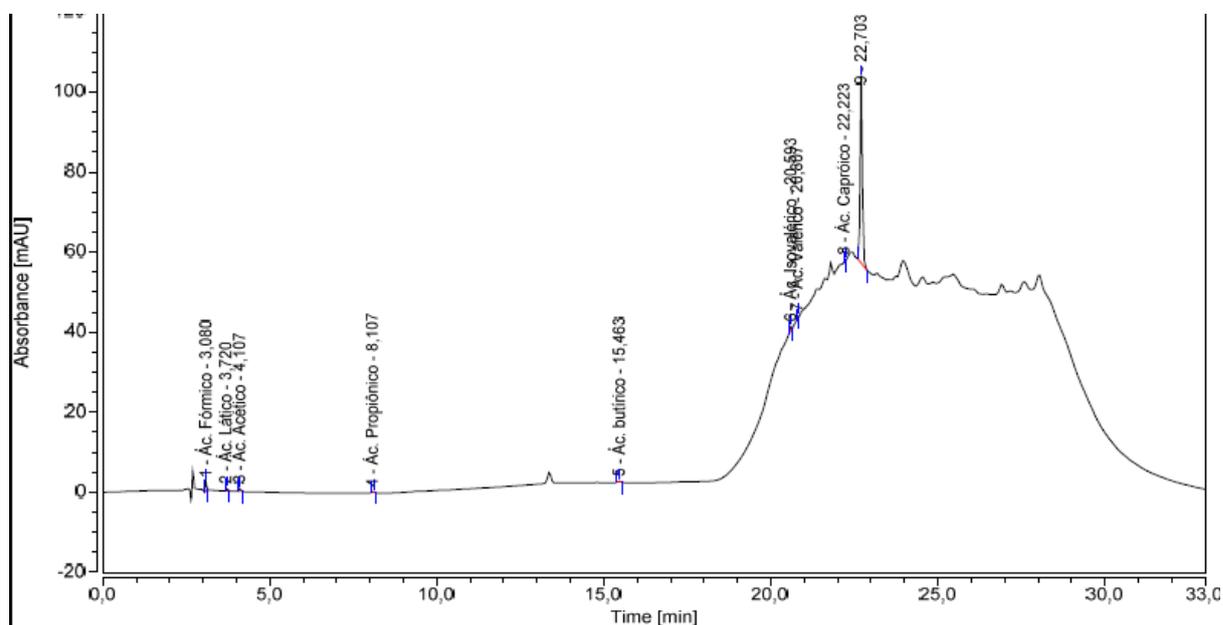
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

#### 4.1.1 Curva analítica – HPLC

Os cromatogramas das soluções padrões da curva analítica (7,5 a 300 mg.L<sup>-1</sup>) apresentaram boa separação e foi possível identificar os picos de todos os AOVs. Nas Figuras 9 a 12 pode-se observar os cromatogramas das soluções padrões de 7,5, 120,0 e 300,0 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente (a concentração de 300,0 mg.L<sup>-1</sup> foi dividida em duas soluções padrões).

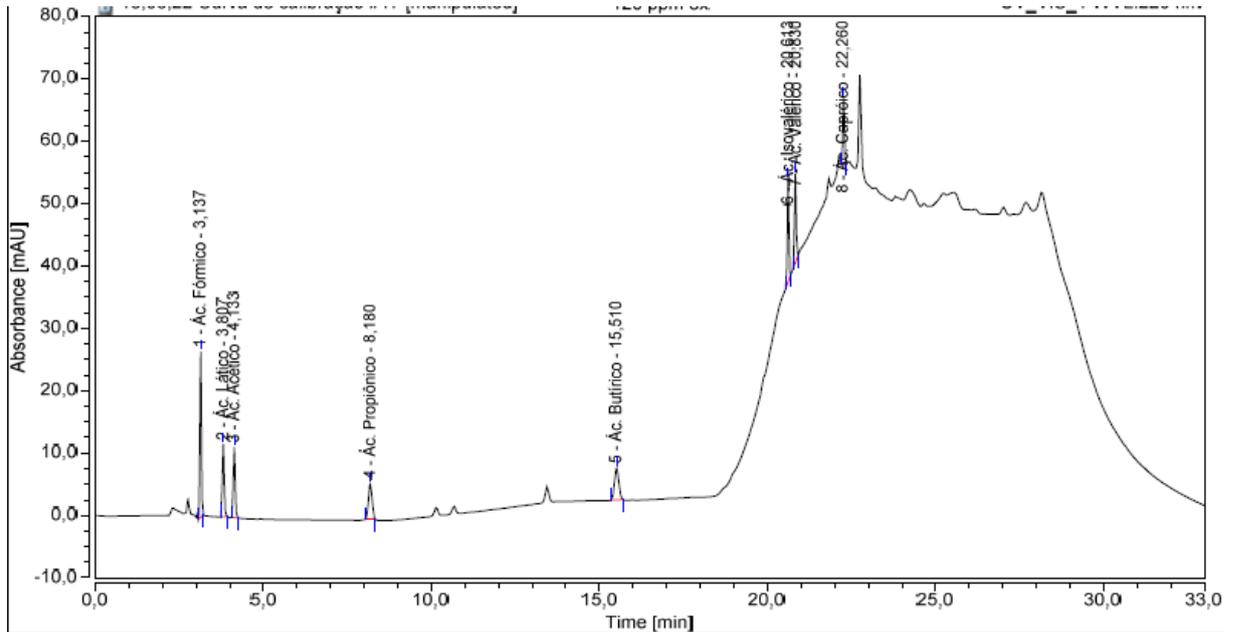
FIGURA 3 - CROMATOGRAMA DA SOLUÇÃO PADRÃO DE 7,5 mg.L<sup>-1</sup> DOS AOVs



FONTE: A autora (2022).

Tempo de retenção: 3,080 min ácido fórmico; 3,720 min ácido láctico; 4,107 min ácido acético; 8,107 min ácido propiônico; 15,463 min ácido butírico; 20,593 min ácido isovalérico; 20,807 min ácido valérico e 22,223 min ácido caprónico.

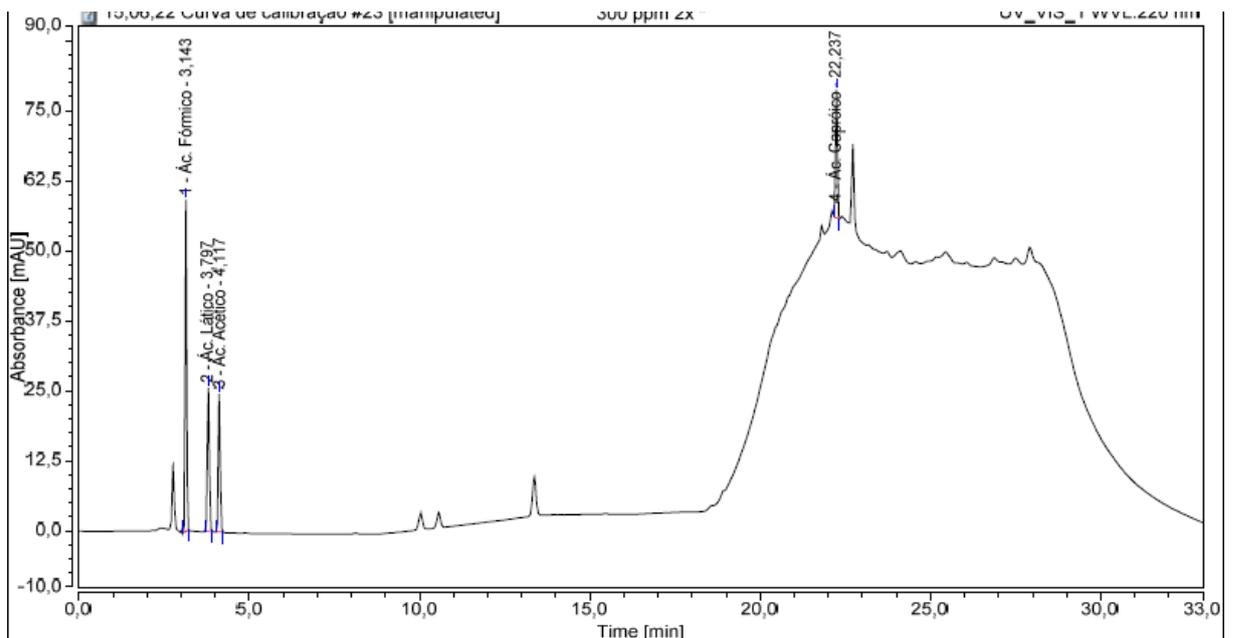
Área: 0,098 ácido fórmico; 0,031 ácido láctico; 0,038 ácido acético; 0,012 ácido propiônico; 0,032 ácido butírico; 0,050 ácido isovalérico; 0,034 ácido valérico e 0,014 ácido caprónico.

FIGURA 10 – CROMATOGRAMA DA SOLUÇÃO PADRÃO DE 120,0 mg.L<sup>-1</sup> DOS AOVs

FONTE: A autora (2022).

NOTA: Tempo de retenção: 3,137 min ácido fórmico; 3,807 min ácido láctico; 4,133 min ácido acético; 8,180 min ácido propiônico; 15,510 min ácido butírico; 20,613 min ácido isovalérico; 20,830 min ácido valérico e 22,260 ácido capríco.

Área: 1,257 ácido fórmico; 0,744 ácido láctico; 0,733 ácido acético; 0,709 ácido propiônico; 0,772 ácido butírico; 0,859 ácido isovalérico; 0,746 ácido valérico e 0,640 ácido capríco.

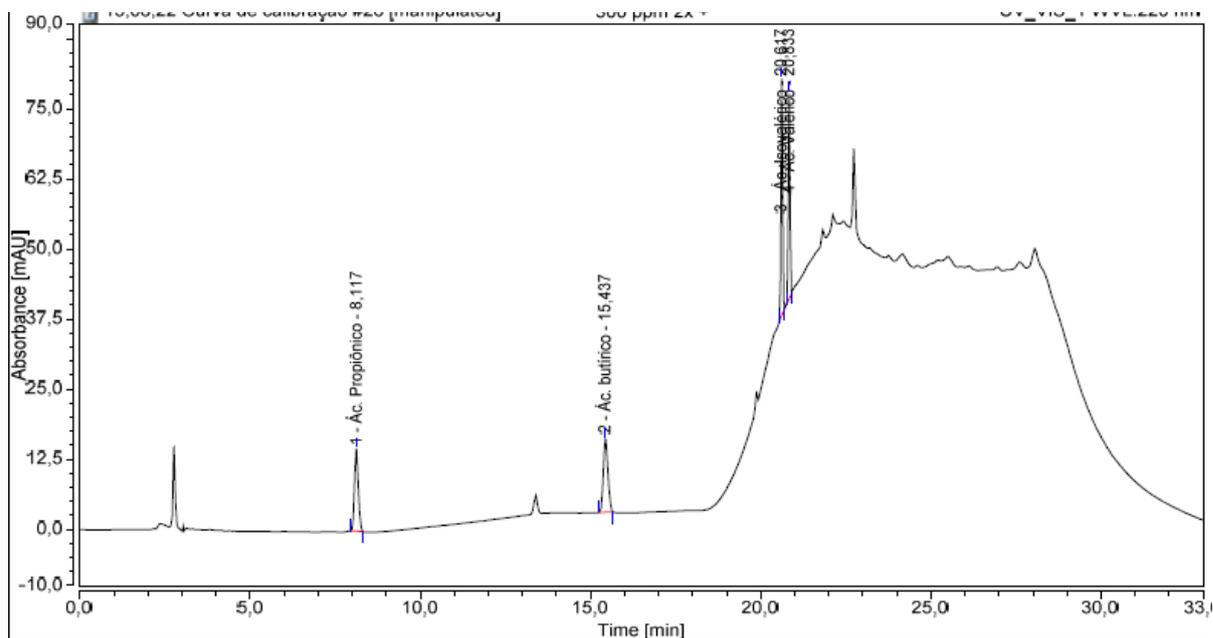
FIGURA 11– CROMATOGRAMA DA SOLUÇÃO PADRÃO DE 300,0 mg.L<sup>-1</sup> COM OS ÁCIDOS FÓRMICO, LÁCTICO, ACÉTICO E CAPRÍCO

FONTE: A autora (2022).

NOTA: Tempo de retenção: 3,143 min ácido fórmico; 3,797 min ácido láctico; 4,117 min ácido acético e 22,237 min ácido capríco.

Área: 2,793 ácido fórmico; 1,608 ácido láctico; 1,595 ácido acético e 1,386 ácido capríco.

FIGURA 12 – CROMATOGRAMA DA SOLUÇÃO PADRÃO DE 300,0 mg.L<sup>-1</sup> COM OS ÁCIDOS PROPIÔNICO, BUTÍRICO, ISOVALÉRICO E VALÉRICO



FONTE: A autora (2022).

NOTA: Tempo de retenção: 8,117 min ácido propiônico; 15,437 min ácido butírico; 20,617 min ácido isovalérico e 20,833 min ácido valérico.

Área: 1,857 ácido propiônico; 2,024 ácido butírico; 2,222 ácido isovalérico e 1,960 ácido valérico.

Na Tabela 5 é apresentada as curvas analíticas na faixa de concentração de 7,5 a 300 mg.L<sup>-1</sup>, que foram baseadas no método dos mínimos quadrados, juntamente com os limites de detecção e quantificação. Os coeficientes de correlação linear ( $r^2$ ) foram superiores a 0,98, evidenciando a ocorrência de linearidade. Além disso, as áreas dos picos foram proporcionais conforme o aumento da concentração.

TABELA 5 – EQUAÇÃO DA RETA, COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO LINEAR (R<sup>2</sup>), LIMITE DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA

<i>Analito:</i>	<i>Curva analítica (7,5 a 300 mg.L<sup>-1</sup>)</i>	<i>Limite detecção (LD) (mg.L<sup>-1</sup>)</i>	<i>Limite quantificação (LQ) (mg.L<sup>-1</sup>)</i>	<i>Desvio padrão</i>
<i>Ácido fórmico</i>	$y=0,0098x + 0,052$ $r^2 = 0,9889$	1,30	3,93	±0,950
<i>Ácido láctico</i>	$y=0,0058x + 0,0193$ $r^2 = 0,9928$	0,69	2,09	±0,563
<i>Ácido acético</i>	$y=0,0058x + 0,0201$ $r^2 = 0,9938$	0,61	1,85	±0,560
<i>Ácido propiônico</i>	$y=0,006x - 0,0308$ $r^2 = 0,9983$	0,20	0,62	±0,617
<i>Ácido butírico</i>	$y=0,0069x - 0,0385$ $r^2 = 0,9985$	0,23	0,70	±0,667
<i>Ácido isovalérico</i>	$y=0,0074x - 0,0036$ $r^2 = 0,999$	0,62	1,89	±0,719
<i>Ácido valérico</i>	$y=0,0067x - 0,019$ $r^2 = 0,9987$	0,57	1,73	±0,643
<i>Ácido capróico</i>	$y=0,0052x - 0,0061$ $r^2 = 0,9916$	0,91	2,76	±0,500

FONTE: A autora (2022).

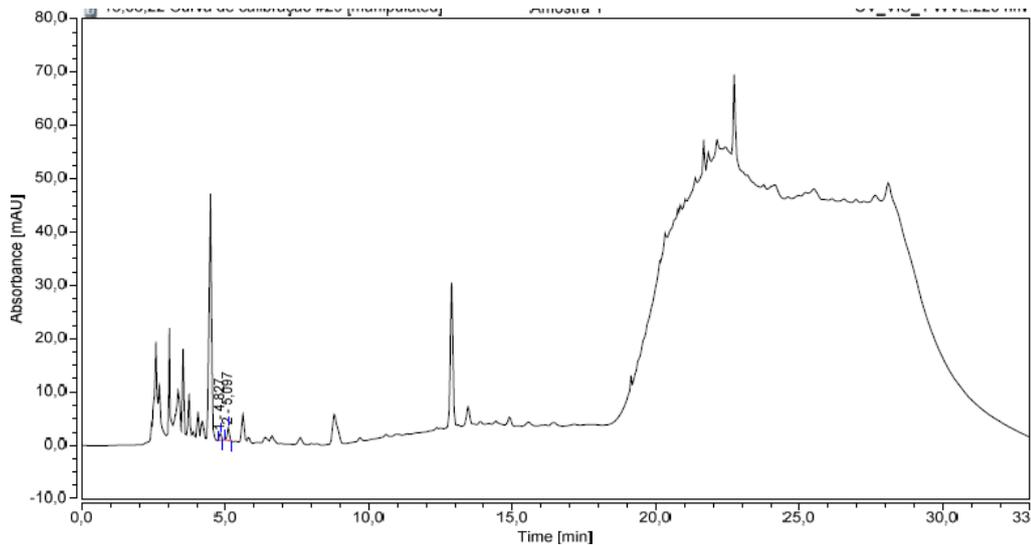
NOTA: A equação da reta é representada por  $y = ax + b$ , sendo “a” o coeficiente angular, “b” coeficiente linear, “x” a concentração e “y” a área.

#### 4.1.2 Amostras do reator anaeróbio

Foram realizados os testes com amostras provenientes do reator anaeróbio, citados na Tabela 3, a fim de analisar o perfil cromatográfico e a necessidade de uma etapa de extração, visto que amostras de reatores anaeróbios apresentam muitos interferentes, afetando a eficiência da separação. Os quatro tratamentos foram realizados com a mesma amostra.

A Figura 13 representa o cromatograma do Tratamento 1: amostra centrifugada e filtrada, no qual pode-se observar que apresentou impurezas e não foi possível identificar os picos dos AOVs, sendo confirmados através dos espectros de absorção na região do ultravioleta (UV) e pelos tempos de retenção que não foram compatíveis.

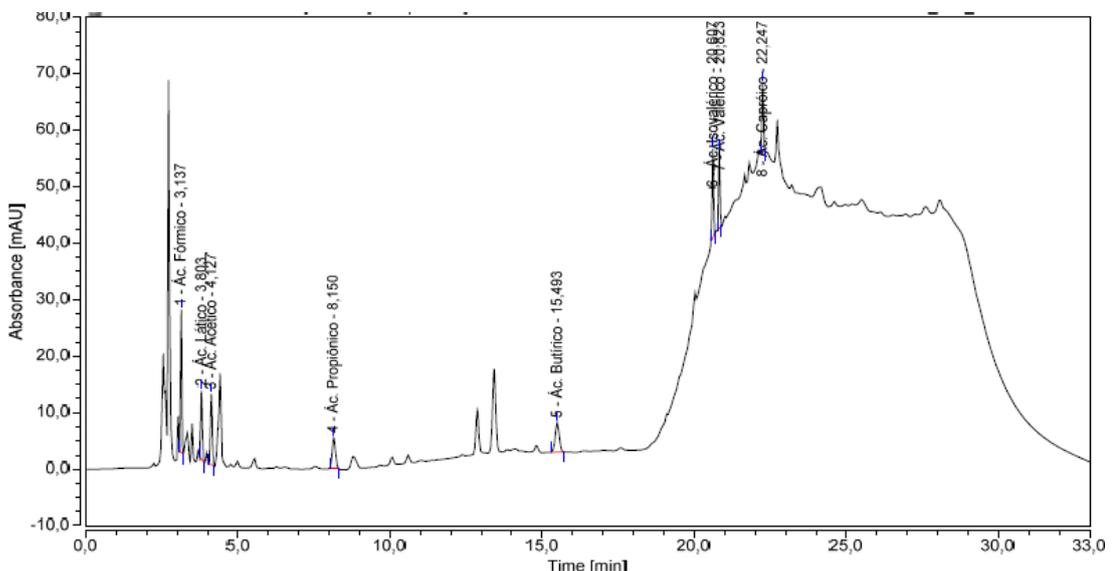
FIGURA 13 – CROMATOGRAMA DO TRATAMENTO 1: AMOSTRA CENTRIFUGADA E FILTRADA



FONTE: A autora (2022).

A respeito do Tratamento 2, a amostra (centrifugada e filtrada) foi fortificada com a mistura dos padrões de AOVs na concentração de  $120 \text{ mg.L}^{-1}$ , conforme a Figura 14, pode-se observar que também apresentou impurezas, porém foi possível identificar a presença dos picos dos AOVs dos padrões adicionados.

FIGURA 14 – CROMATOGRAMA DO TRATAMENTO 2: AMOSTRA COM FORTIFICAÇÃO DE AOVs NA CONCENTRAÇÃO DE  $120 \text{ mg.L}^{-1}$

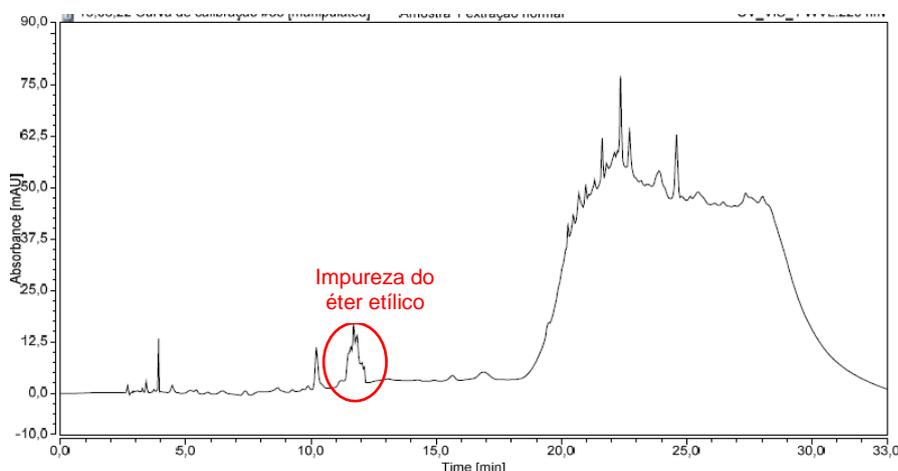


FONTE: A autora (2022).

NOTA: Tempos de retenção: ácido fórmico 3,137 min; ácido láctico 3,803 min; ácido acético 4,127 min; ácido propiônico 8,150 min; ácido butírico 15,493 min; ácido isovalérico 20,607 min; ácido valérico 20,823 e ácido capróico 22,247 min.

Nas Figuras 15 e 16, apresentam-se os cromatogramas do Tratamento 3: microextração líquido-líquido da amostra utilizando como solventes de extração éter etílico e acetonitrila. Conforme os cromatogramas, teve a minimização das impurezas, porém não foi observado a presença dos picos dos AOVs.

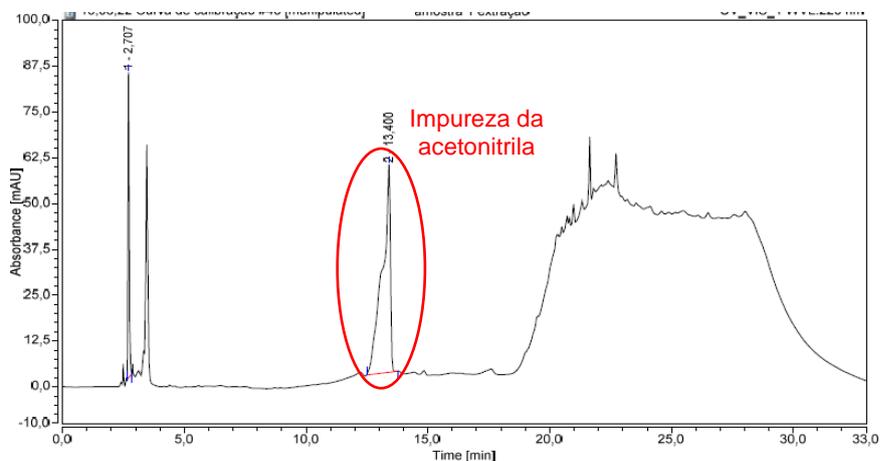
FIGURA 15 – CROMATOGRAMA DO TRATAMENTO 3: AMOSTRA REALIZADA A MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO COM ÉTER ETÍLICO



FONTE: A autora (2022).

NOTA: Foi injetado no equipamento o padrão do éter etílico, por isso pode-se confirmar que o pico em destaque é uma impureza do solvente de extração (éter etílico).

FIGURA 16 – CROMATOGRAMA DO TRATAMENTO 3: AMOSTRA REALIZADA A MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO COM ACETONITRILA

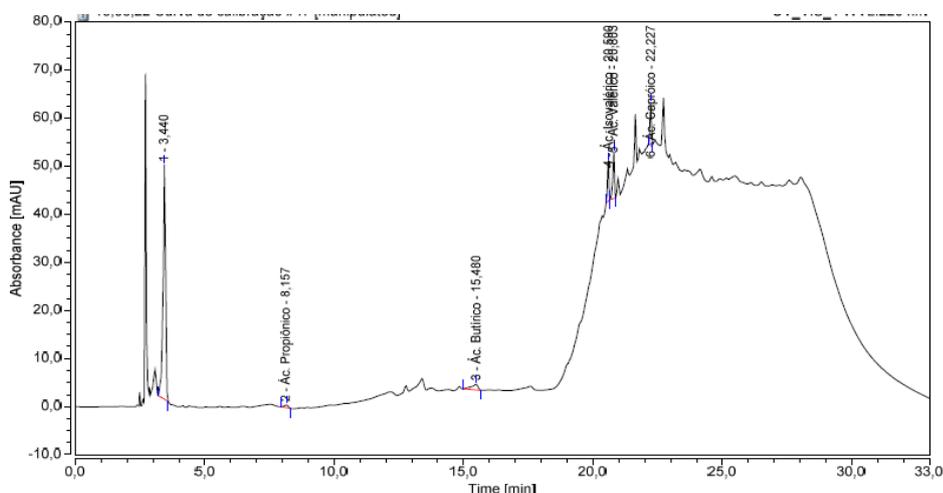


FONTE: A autora (2022).

NOTA: Foi injetado no equipamento o padrão da acetonitrila, por isso pode-se confirmar que o pico em destaque é uma impureza da acetonitrila (solvente de extração).

E na Figura 17, apresenta-se o cromatograma do Tratamento 4: microextração líquido-líquido com fortificação de AOVs, na concentração de 60 mg.L<sup>-1</sup>, utilizando acetonitrila como solvente de extração. No qual apresentou minimização das impurezas e foi possível identificar os picos dos seguintes AOVs: propiônico, butírico, isovalérico, valérico e caprónico.

FIGURA 17 - CROMATOGRAMA DO TRATAMENTO 4: AMOSTRA COM FORTIFICAÇÃO DE AOVs NA CONCENTRAÇÃO DE 60 mg.L<sup>-1</sup> E REALIZADA A MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO COM ACETONITRILA



FONTE: A autora (2022).

NOTA: Tempos de retenção: ácido propiônico 8,157 min; ácido butírico 15,480 min; ácido isovalérico 20,590 min; ácido valérico 20,803 min e ácido caprónico 22,227 min.

Sendo assim, evidencia-se que a seletividade da coluna foi influenciada por outras substâncias que interferem na determinação dos analitos, principalmente se os ácidos presentes na amostra apresentarem uma concentração baixa. Além disso, realizando a microextração líquido-líquido para minimizar “contaminações” não foi possível identificá-los, em contrapartida, nos testes (tratamentos 2 e 4) que foram adicionados os AOVs com concentração conhecida, foi possível observar os picos cromatográficos. Desta forma, a coluna (fase estacionária) não foi seletiva em relação a amostra, influenciando na retenção dos analitos e dificultando na análise dos mesmos. Ressaltando que os picos foram confirmados através dos espectros de absorção no UV.

Diante disso, uma hipótese por não ter identificado os AOVs poderia ser que as amostras não continham os analitos, pois nas amostras com fortificação dos padrões de AOVs foi possível observar os picos dos mesmos (Figuras 14 e 17). Porém, o

biorreator estava produzindo biogás com concentrações favoráveis de metano e permaneceu estável.

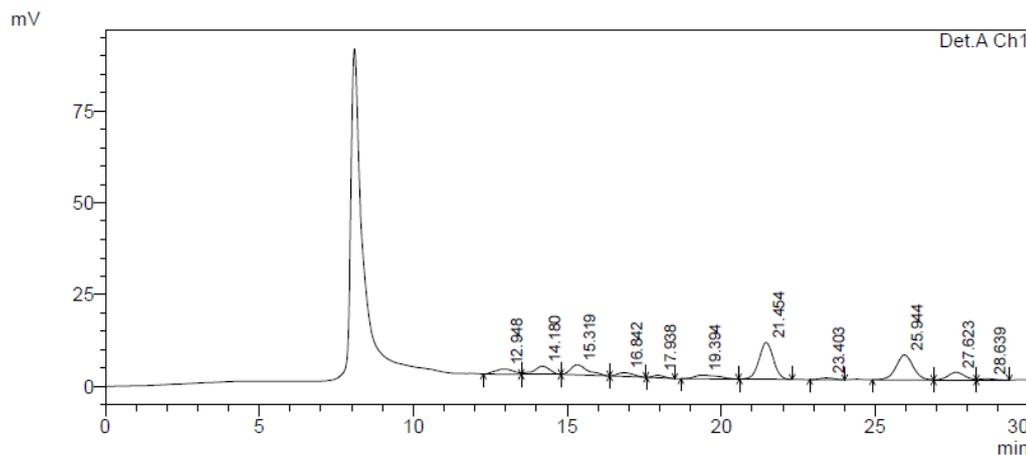
Diante disso, foram enviadas amostras do biorreator para serem analisadas no Laboratório de Análises Agro-Ambientais, localizado na UNIOESTE (Cascavel, PR) e assim, confirmar se realmente contêm os AOVs, visto que foram detectados os AOVs nos padrões, mas não nas amostras do biorreator.

O cromatógrafo utilizado na UNIOESTE emprega Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) SHIMADZU Prominence LC-20A, equipado com bomba LC-20AT, injeção automática SIL-20AHT, forno CTO-20A e três detectores ligados em série: detecção por fluorescência RF-10AXL, detector por UV-Vis com arranjo de diodos SPD-20A e por índice de refração RID-10A, coluna do tipo troca iônica e a fase móvel é uma solução de ácido sulfúrico 0,005 M, baseado na metodologia de Penteado (2012). Os AOVs foram detectados pelo detector arranjo de diodos SPD-20A. E as amostras foram as mesmas testadas para os Tratamentos de 1 a 4 (Tabela 3)

Neste contexto, dos trabalhos publicados sobre desenvolvimento e validação de métodos cromatográficos empregando cromatografia líquida na quantificação de AOVs, a maioria utilizaram colunas de troca iônica com detecção no ultravioleta (UV) e por índice de refração (IR) (CERQUEIRA et al, 2011).

Na Figura 18, é apresentado o cromatograma obtido a partir do HPLC da UNIOESTE (Cascavel, PR), sendo comprovado pelo equipamento que as amostras contêm os AOVs. Os picos detectados não foram nomeados com os analitos de interesse, porém, conforme informações fornecidas, os picos representados são de AOVs, mesmo que não foram especificados no cromatograma (mensagem eletrônica por Kátia Fagnani, discente de doutorado da UNIOESTE, 2022).

FIGURA 18 – CROMATOGRAMA DA AMOSTRA DO REATOR ANAERÓBIO ANALISADA NA UNIOESTE (CASCAVEL, PR)



FONTE: Cedido por Kátia Fagnani (discente de doutorado da UNIOESTE - Cascavel) (2022).

Sendo assim, a coluna de fase reversa RP C18 ACE não foi eficiente e seletiva na determinação de AOVs nas amostras analisadas do reator anaeróbio, principalmente em concentrações baixas, visto que o detector arranjo de diodos apresenta elevada sensibilidade e estabilidade, o que permite detectar menores concentrações do analito. Desta forma, a coluna não é a mais apropriada para a determinação de AOVs em amostras complexas, porém em amostras com menos interferentes pode-se obter resultados mais favoráveis.

Diante disso, as colunas de troca iônica são as mais apropriadas para a identificação de ácidos orgânicos, a Bio-Rad Laboratories (Brasil) descreve que a coluna de troca iônica é utilizada para análise de carboidratos em solução com ácidos carboxílicos, ácidos graxos voláteis, ácidos graxos de cadeia curta, álcoois, cetonas e metabólitos neutros, além de ser ideal para ácidos orgânicos, monitoramento de fermentação e análise de fluídos biológicos. Entretanto, essas colunas possuem valores elevados, comparadas a outros tipos de colunas utilizadas para o mesmo fim. Por isso, têm-se o desenvolvimento de métodos cromatográficos utilizando outros tipos de colunas, mesmo apresentando menor seletividade e eficiência que as colunas de troca iônica.

Sendo assim, uma alternativa seria otimizar a metodologia utilizada ou optar pela coluna de troca iônica, que é a mais apropriada para quantificar os AOVs.

## 4.2 CROMATOGRAFIA GASOSA (CG)

### 4.2.1 Curva analítica - CG

Em cromatografia gasosa é comum utilizar o método do padrão interno na quantificação de substâncias, obtendo mais precisão e minimizando as incertezas geradas pelo equipamento. Segundo Foresti *et al* (2005) o método é utilizado nas amostras para fazer a correção de algum desvio que pode ocorrer na análise, além de servir como fator de normalização. Desta forma, o padrão interno tem que ser semelhante aos compostos analisados, quanto as propriedades químicas, tempo de retenção próximo das substâncias a serem analisadas, não deve interferir na análise e ser distinguível cromatograficamente. Por isso, a construção da curva analítica foi baseada no método dos mínimos quadrados utilizando padrão interno.

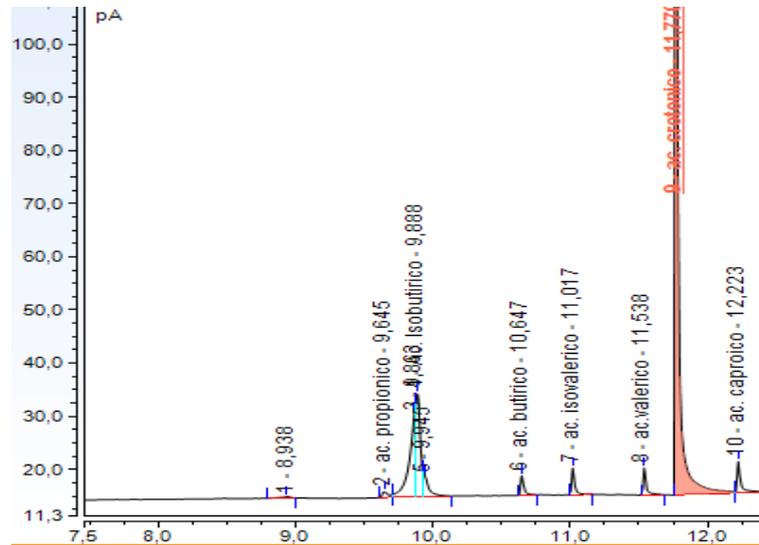
Sendo assim, os ácidos láctico e fórmico são de difícil detecção em cromatografia gasosa (CG) com detector de ionização em chama (FID) (MESQUITA, *et al*, 2013), sendo um problema evidenciado quando se utiliza CG – FID para identificá-los. Diante disso, não foram detectados em nenhuma das concentrações da curva.

Para plotar os gráficos e obter as equações da reta de cada AOVs, ao invés de comparar a área dos picos das substâncias a serem analisadas com a área dos padrões, são comparados os Fatores de Resposta (FR). Ou seja, o FR é a razão da área do ácido pela área do padrão interno, em uma mesma injeção ( $FR = \text{área do ácido} / \text{área do padrão interno}$ ). Como o padrão interno tem a função de corrigir algum desvio no momento da análise, o Fator de Resposta ajuda a minimizar o erro. Desta forma, o gráfico é plotado com FR no eixo y e as concentrações no eixo x (FORESTI *et al*, 2005).

Deste modo, pode-se observar os cromatogramas das soluções padrões nas concentrações de 18 mg.L<sup>-1</sup>, 200 mg.L<sup>-1</sup> e 800 mg.L<sup>-1</sup> nas Figuras 19, 20 e 21, respectivamente. Sendo assim, observa-se que os picos cromatográficos obtiveram uma boa separação, proporcionando uma identificação mais precisa dos AOVs. Além disso, foi possível identificar os seis ácidos orgânicos voláteis em todos os pontos da curva analítica, tendo como ordem de saída: 1) ácido acético, 2) ácido propiônico; 3) ácido butírico; 4) ácido isovalérico; 5) ácido valérico e 6) ácido capróico. E o ácido isobutírico que aparece no cromatograma, é uma contaminação do éter etílico, visto que foi injetado o padrão do éter etílico. Sendo assim, seu pico é desconsiderado na

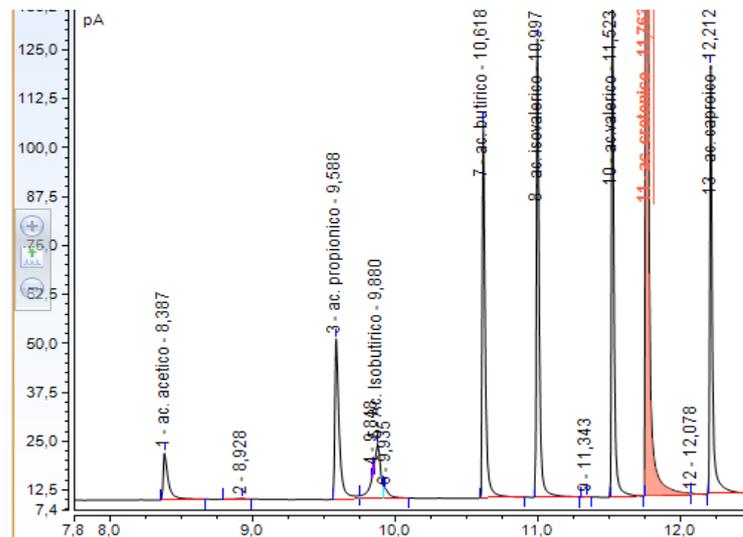
identificação dos ácidos, ele é identificado pelo software devido a análises anteriores realizadas no equipamento condizer com o mesmo tempo de retenção.

FIGURA 19 – CROMATOGRAMA DA CURVA DE BAIXA CONCENTRAÇÃO: 18 mg.L<sup>-1</sup>

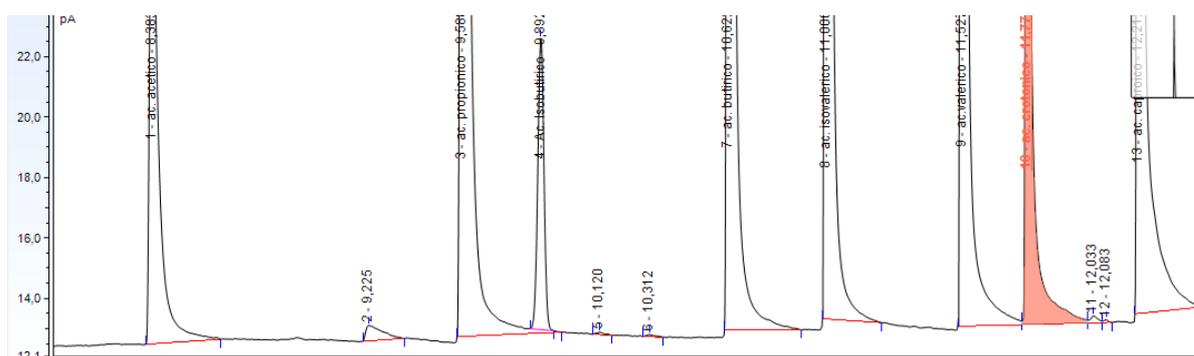


FONTE: A autora (2022).

FIGURA 4 – CROMATOGRAMA DA CURVA DE BAIXA CONCENTRAÇÃO: 200 mg.L<sup>-1</sup>



FONTE: A autora (2022).

FIGURA 21- CROMATOGRAMA DA CURVA DE ALTA CONCENTRAÇÃO: 800 mg.L<sup>-1</sup>

FONTE: A autora (2022).

Para obter as equações da reta, foram utilizadas as médias das razões das áreas (Fator de Resposta). A unidade do FR é pA\*min (conforme o software) e da concentração é mg.L<sup>-1</sup> (ou ppm). Deste modo, todos os gráficos apresentaram FR crescentes em relação as suas concentrações e boa linearidade. Nas Tabelas 6 e 7 são apresentados os LD e LQ de cada ácido orgânico juntamente com a equação da reta e o coeficiente de correlação.

TABELA 6 - EQUAÇÃO DA RETA, COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO LINEAR (R<sup>2</sup>), LIMITE DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA CURVA BAIXA

<i>Analito:</i>	<i>Curva analítica de baixa concentração (18 a 200 mg.L<sup>-1</sup>)</i>	<i>Limite de detecção (LD) (mg.L<sup>-1</sup>)</i>	<i>Limite de quantificação (LQ) (mg.L<sup>-1</sup>)</i>	<i>Desvio padrão</i>
<i>Ácido acético</i>	$y = 0,0004x - 0,0093$ $r^2 = 0,9802$	0,052	0,17	±0,0212
<i>Ácido propiônico</i>	$y = 0,0011x - 0,0016$ $r^2 = 0,9947$	0,056	0,18	±0,0605
<i>Ácido butírico</i>	$y = 0,0017x - 0,0016$ $r^2 = 0,9941$	0,065	0,21	±0,0936
<i>Ácido isovalérico</i>	$y = 0,0019x - 0,0007$ $r^2 = 0,9956$	0,056	0,18	±0,1062
<i>Ácido valérico</i>	$y = 0,0018x - 0,0022$ $r^2 = 0,9905$	0,11	0,37	±0,1030

Continua na próxima página

Ácido capróico	$y = 0,0017x + 0,0179$ $r^2 = 0,9925$	0,10	0,35	$\pm 0,0926$
----------------	--	------	------	--------------

FONTE: A autora (2022).

NOTA: A equação da reta é representada por  $y = ax + b$ , sendo “a” o coeficiente angular, “b” coeficiente linear, “x” a concentração e “y” o Fator de Resposta (ou área).

TABELA 7 - EQUAÇÃO DA RETA, COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO LINEAR ( $R^2$ ), LIMITE DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA CURVA ALTA

Analito:	Curva analítica de alta concentração (200 a 1000 $mg.L^{-1}$ )	Limite detecção (LD) ( $mg.L^{-1}$ )	Limite quantificação (LQ) ( $mg.L^{-1}$ )	Desvio padrão
Ácido acético	$y = 0,0009x - 0,0541$ $r^2 = 0,9992$	2,56	8,54	$\pm 0,2627$
Ácido propiônico	$y = 0,0023x + 0,1147$ $r^2 = 0,9835$	8,92	29,76	$\pm 0,6524$
Ácido butírico	$y = 0,0031x + 0,173$ $r^2 = 0,9891$	7,05	23,50	$\pm 0,8909$
Ácido isovalérico	$y = 0,0035x + 0,2272$ $r^2 = 0,9877$	8,41	28,05	$\pm 0,9920$
Ácido valérico	$y = 0,0036x + 0,1459$ $r^2 = 0,9938$	5,09	16,99	$\pm 1,0232$
Ácido capróico	$y = 0,0033x + 0,3816$ $r^2 = 0,9946$	5,00	16,69	$\pm 0,9451$

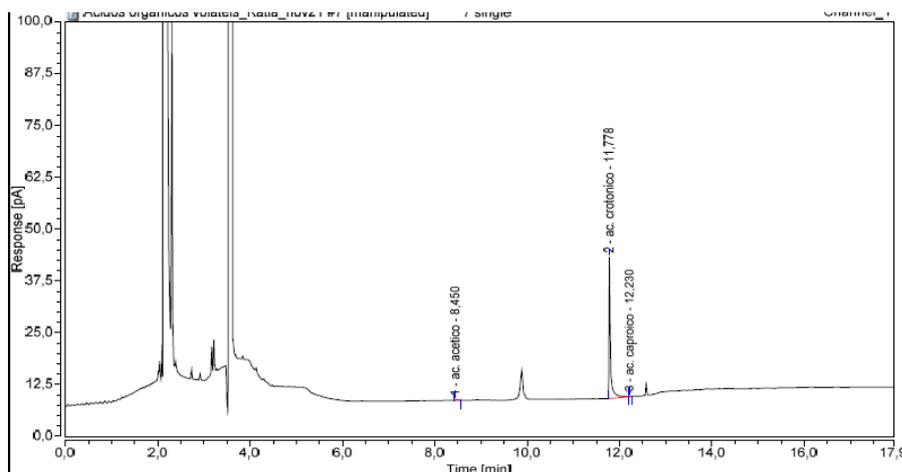
FONTE: A autora (2022).

NOTA: A equação da reta é representada por  $y = ax + b$ , sendo “a” o coeficiente angular, “b” coeficiente linear, “x” a concentração e “y” o Fator de Resposta (ou área).

#### 4.2.2 Amostras do reator anaeróbio

Após a obtenção das curvas analíticas para o cálculo das concentrações, fez-se a identificação dos AOVs das amostras do reator anaeróbio. Os cromatogramas a seguir são de três amostras do reator que foram escolhidas para exemplificar.

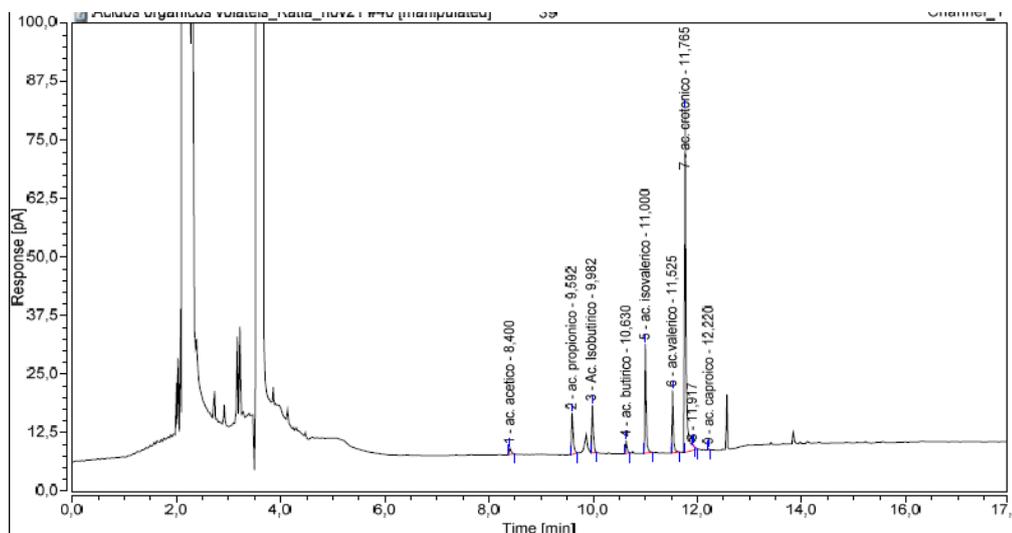
FIGURA 22 – CROMATOGRAMA 1: AMOSTRA DO REATOR ANAERÓBIO



FONTE: A autora (2022).

NOTA: Tempos de retenção: 8,450 min ácido acético; 11,778 min ácido crotonico (padrão interno) e 12,230 min ácido caprótico. Área: 0,014 ácido acético; 1,130 ácido crotonico e 0,005 ácido caprótico.

FIGURA 23 – CROMATOGRAMA 2: AMOSTRA DO REATOR ANAERÓBIO

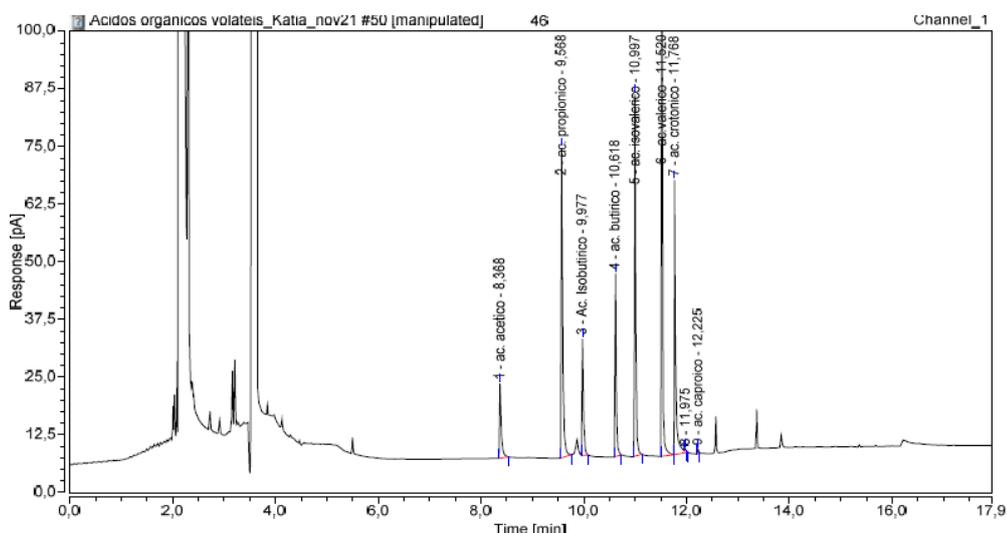


FONTE: A autora (2022).

NOTA: Tempos de retenção: 8,400 min ácido acético; 9,592 min ácido propiônico; 10,630 min ácido butírico; 11,000 min ácido isovalérico; 11,525 min ácido valérico; 11,765 min ácido crotonico (padrão interno) e 12,220 min ácido caprótico.

Área: 0,054 ácido acético; 0,315 ácido propiônico; 0,075 ácido butírico; 0,648 ácido isovalérico; 0,317 ácido valérico; 1,908 ácido crotonico e 0,004 ácido caprótico.

FIGURA 24 – CROMATOGRAMA 3: AMOSTRA DO REATOR ANAERÓBIO



FONTE: A autora (2022).

NOTA: Tempos de retenção: 8,368 min ácido acético; 9,568 min ácido propiônico; 10,618 min ácido butírico; 10,997 min ácido isovalérico; 11,52 min ácido valérico; 11,768 min ácido crotonico (padrão interno) e 12,225 min ácido caprílico.

Área: 0,632 ácido acético; 2,317 ácido propiônico; 0,980 ácido butírico; 2,053 ácido isovalérico; 2,216 ácido valérico; 1,643 ácido crotonico e 0,020 ácido caprílico.

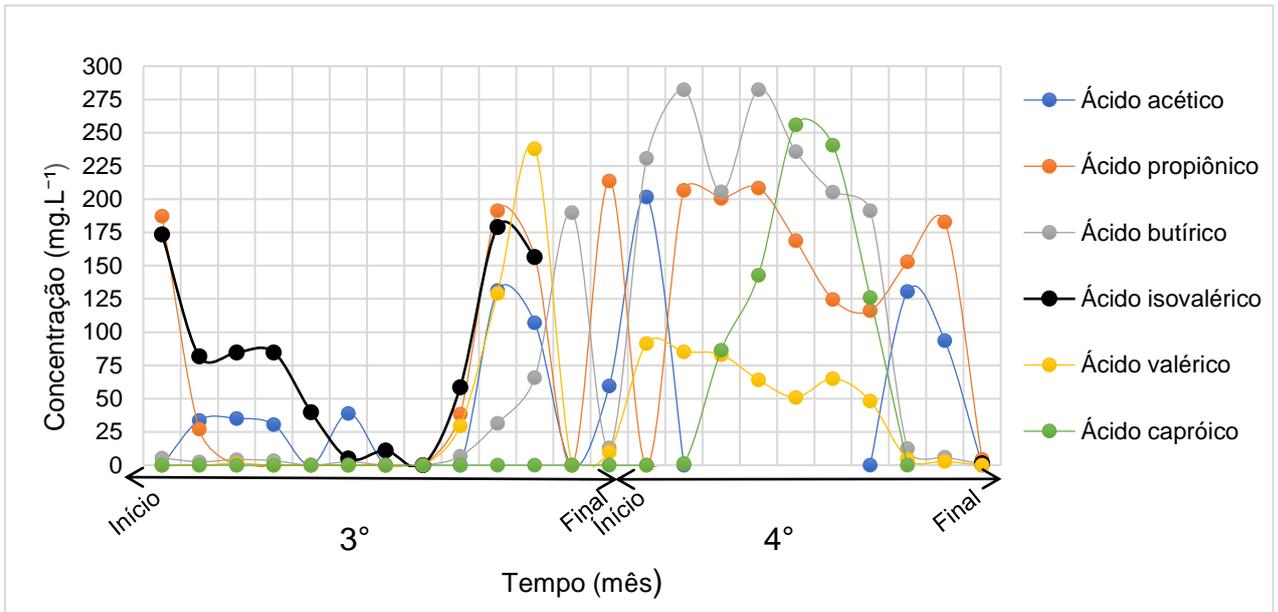
Conforme os cromatogramas apresentados, pode-se observar que no primeiro cromatograma (Figura 22) não foram identificados todos os AOVs, apenas os ácidos acético e caprílico e as áreas dos picos foram baixas, consequentemente concentrações baixas. No segundo cromatograma (Figura 23), foram identificados todos os ácidos orgânicos que foram padronizados, além de apresentarem concentrações mais altas. Em relação ao terceiro cromatograma (Figura 24), todos os ácidos também foram identificados, evidenciando concentrações maiores que o cromatograma anterior.

Nas Figuras 25 e 26 foram plotadas as concentrações dos AOVs quantificados em 23 amostras do reator anaeróbio. As amostras escolhidas foram dos períodos iniciais após a inoculação do reator, do 3º e 4º mês, quando o reator começou a apresentar estabilidade na produção de biogás. Em algumas amostras não foram identificados todos os ácidos. Quanto ao ácido caprílico, apresentou concentrações baixíssimas, sendo inferiores ao limite de detecção em relação a algumas amostras. Os ácidos butírico e isovalérico foram identificados na maioria das amostras analisadas.

As concentrações de AOVs nas amostras apresentaram os seguintes intervalos, o ácido acético apresentou concentrações entre 30,5 a 2900 mg.L<sup>-1</sup>; o

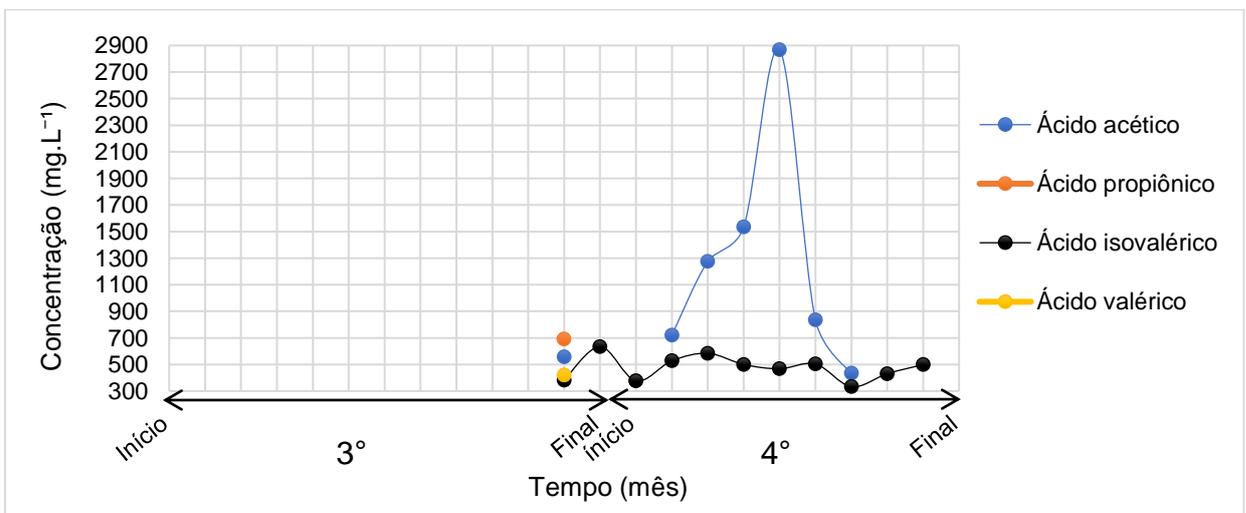
propiónico de 4,30 a 692 mg.L<sup>-1</sup> ; o butírico de 0,94 a 282,4 mg.L<sup>-1</sup> ; isovalérico de 1,45 a 634,6 mg.L<sup>-1</sup>; valérico de 1,37 a 420,25 mg.L<sup>-1</sup> e o capríco foi quantificado em seis do total das amostras analisadas, tendo como valor mínimo de concentração 1,32 mg.L<sup>-1</sup> e 256,0 mg.L<sup>-1</sup> o valor máximo.

FIGURA 25 – GRÁFICO DA CONCENTRAÇÃO DE AOVs CORRESPONDENTE AO 3º E 4º MÊS DE OPERAÇÃO (FAIXA DE CONCENTRAÇÃO: 0 a 300 mg.L<sup>-1</sup> )



FONTE: A autora (2022).

FIGURA 26 - GRÁFICO DA CONCENTRAÇÃO DE AOVs CORRESPONDENTE AO 3º E 4º MÊS DE OPERAÇÃO (FAIXA DE CONCENTRAÇÃO: 300 a 2900 mg.L<sup>-1</sup> )



FONTE: A autora (2022).

Conforme pode-se observar nos gráficos (Figuras 25 e 26), durante o período analisado as concentrações dos ácidos prevaleceram inferiores a  $300 \text{ mg.L}^{-1}$ , sendo que no quarto mês de operação, as concentrações e a formação dos produtos intermediários (AOVs) foram superiores comparada ao mês anterior. E os ácidos acético, propiônico, isovalérico e valérico apresentaram concentrações superiores a  $300 \text{ mg.L}^{-1}$  no quarto mês de operação, sendo que o ácido acético apresentou o maior limite de concentração em uma das amostras.

Os AOVs não apresentaram comportamento definido, comparada com a produção de biogás, tendo concentrações elevadas e baixas ao longo do período. Porém, a distribuição não é similar visto que a configuração do reator, parâmetros de operação e as rotas metabólicas dos microrganismos influenciam na formação desses produtos intermediários.

Entretanto, a partir dos resultados obtidos, é possível monitorar a estabilidade do reator, além de ser um indicativo da produção de biogás.

Portanto, entre as duas técnicas cromatográficas utilizadas, a cromatografia gasosa foi a que apresentou resultados positivos na identificação e quantificação dos ácidos orgânicos voláteis, sendo possível aplicar a curva analítica para identificar os analitos de interesse.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Durante o processo fermentativo são gerados os ácidos orgânicos voláteis (AOVs) que são um dos fatores mais importantes na operação e controle de reatores anaeróbios, pois a concentração desses ácidos permite analisar condições de estabilidade e instabilidade no reator.

Sendo assim, em relação aos resultados obtidos com a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) os cromatogramas das soluções padrões apresentaram boa separação e foi possível identificar os picos de todos os AOVs. E as curvas analíticas obtiveram boa linearidade ( $r^2 > 0,98$ ). Porém, os cromatogramas das amostras do biorreator apresentaram muitos interferentes, não sendo possível identificar os picos dos ácidos orgânicos voláteis, mesmo analisando os espectros de absorção na região UV dos picos eluídos. E como a coluna apresentou problemas na identificação devido aos interferentes da matriz da amostra, não foi possível aplicar o método na determinação dos AOVs.

Em relação a cromatografia gasosa, foi realizada a curva analítica dos AOVs e calculado os limites de detecção e quantificação, obtendo  $r^2 > 0,98$ . As concentrações das amostras do reator apresentaram os seguintes valores: o ácido acético apresentou concentrações entre 30,5 a 2900 mg.L<sup>-1</sup>; o propiônico de 4,30 a 692 mg.L<sup>-1</sup>; o butírico de 0,94 a 282 mg.L<sup>-1</sup>; isovalérico de 1,45 a 634,6 mg.L<sup>-1</sup>; valérico de 1,37 a 420,25 mg.L<sup>-1</sup> e o capríico em algumas amostras as concentrações foram inferiores ao LD.

Deste modo, entre as duas técnicas cromatográficas, a cromatografia gasosa foi a que apresentou resultados positivos na identificação e quantificação dos AOVs, sendo possível aplicar a curva analítica para identificá-los. E em relação a cromatografia líquida, uma alternativa seria otimizar a metodologia utilizada ou optar pela coluna de troca iônica, sendo a mais apropriada para identificar os ácidos orgânicos voláteis, visto que no HPLC foi possível identificar todos os analitos analisados.

## REFERÊNCIAS

ANEEL (Brasil). Atlas de energia elétrica do Brasil. Brasília: **Agência Nacional de Energia Elétrica**, 3 ed, 236 p, 2008.

Disponível em:

<[https://www.aneel.gov.br/livros/-/asset\\_publisher/PxpKsZ8YdPpl/content/atlas-de-energia-eletrica-do-bras-1/656835?inheritRedirect=false](https://www.aneel.gov.br/livros/-/asset_publisher/PxpKsZ8YdPpl/content/atlas-de-energia-eletrica-do-bras-1/656835?inheritRedirect=false)>.

ARAÚJO, A. P. C. **Produção de biogás a partir de resíduos orgânicos utilizando biodigestor anaeróbio**. Monografia. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 32 p, 2017.

AKUTSU, Y.; LEE, D.; LI, Y.; NOIKE, T. Hydrogen production potentials and fermentative characteristics of various substrates with diferente heat-pretreated natural microflora. **Elsevier**, 2009. Disponível em: software Harzing's Publish.

AQUINO, S. F de; CHERNICHARO, C. A. L. Acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGVs) em reatores anaeróbios sob estresse: Causas e estratégias de controle. **Revista Eng Sanit Ambient**. v 10, n 2, 152-161 p, 2005.

BRASIL. EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA. Atlas da Eficiência Energética Brasil 2021. Relatório de Indicadores. **Ministério de Minas e Energia**. 2022.

Disponível em:

<https://www.epe.gov.br/pt/56dição56s565656-dados-abertospublicacoes/56dição56-energetico-nacional-na>

BRASIL. EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA. Balanço Energético Nacional 2022 (Ano base 2021). Relatório síntese. **Ministério de Minas e Energia**. 2022.

Disponível em:

<https://www.epe.gov.br/pt/56dição56s565656-dados-abertospublicacoes/56dição56-energetico-nacional-na>

BERGER, J. S. **Quantificação de proteína microbiana em biodigestor utilizado no tratamento de efluente de amidonaria**. Monografia. Universidade Federal do Paraná,

32p, 2013. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/35166/JUSSARA%20SILVA%20BERGER%20%20QUANTIFICACAO%20DE%20PROTEINA%20MICROBIANA%20EM%20BIODIGESTOR%20UTILIZADO%20NO%20TRATAMENT.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

BIO-RAD LABORATORIES. Coluna de Troca Iônica, 2022. Disponível em:

<https://www.bio-rad.com/pt-br/sku/1250140-aminex-hpx-87h-column?ID=1250140>

CERQUEIRA, M. B. R. *et al*. Validação de método para determinação de ácidos orgânicos voláteis em efluentes de reatores anaeróbios empregando cromatografia líquida. **Revista Química Nova**. v 34, n 1, 156-159 p, 2011. Disponível em: [http://quimicanova.s bq.org.br/detalhe\\_artigo.asp?id=4389](http://quimicanova.s bq.org.br/detalhe_artigo.asp?id=4389)

FLORES, G. A. **Produção de biogás de resíduo de lodo ativado proveniente do tratamento de esgoto sanitário**. Dissertação. Universidade do Vale do Rio dos Sinos, São Leopoldo, RS, 79 f, 2019.

FONSECA, B. C. **Produção de hidrogênio por fermentação por um novo isolado de *Clostridium beijerinckii***. Dissertação. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 109 p, 2016.

FORESTI, E.; ZAIAT, M.; MORAES, E.M. *et al.* 2005. **Métodos de análises físico-químicas de rotina de água residuárias tratadas biologicamente**. Universidade de São Paulo, SP, 2005.

GHIMIRE, A. *et al.* A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products. **Elsevier Applied Energy** , 73–95 p, 2015.

KILIKIAN, B. V.; PESSOA JR, A. Purificação de produtos biotecnológicos: operações e processos com aplicação industrial. **Editores Blucher**, 2020. Disponível em: Minha Biblioteca Integrada UFPR.

KIM, D.; KIM, M. Thermophilic fermentative hydrogen production from various sources by anaerobic mixed cultures. **Elsevier**, 2011. Disponível em: software Harzing's Publish.

LONG, J.H. *et al.* Anaerobic co-digestion of fat, oil, and grease (FOG): A review of gas production and process limitations. **Elsevier**. Process Safety and Environmental Protection 90, 231–245 p, 2012.

MAINTINGUER, S. I. *et al.* **Glycerol as a Raw Material for Hydrogen Production**. INTECH: Biofuels – Status and Perspective, 2015.

MATOS, S. P. de. Operações Unitárias – Fundamentos, Transformações e Aplicações dos Fenômenos Físicos e Químicos. **Editores Saraiva**, 2015. Disponível em: Minha Biblioteca Integrada UFPR.

MORAES, J.E.; DUARTE, K.M.R.; PAULINO, V.T. Cromatografia gasosa na determinação de ácidos graxos voláteis de materiais ensilados. **PUBVET**, Londrina, v 5, n 29, ed. 176, art.1186, 2011. Disponível em:  
[https://web.archive.org/web/20180721025749id\\_/http://www.pubvet.com.br/uploads/e72827282a5d9e4dfafc272bedbae11a.pdf](https://web.archive.org/web/20180721025749id_/http://www.pubvet.com.br/uploads/e72827282a5d9e4dfafc272bedbae11a.pdf)

MESQUITA, P. L. *et al.* Validação de método de cromatografia líquida para a determinação de sete ácidos graxos voláteis intermediários da digestão anaeróbia. **Revista Eng Sanit Ambient**. v 18, n 4, 295-302 p, 2013. Disponível em:  
<https://www.scielo.br/j/esa/a/Yr6Dnz9tvSncqyw6cMD7rYw/?format=html&lang=pt&st=op=prprevio>

PAVINI, W.D. **Determinação de compostos orgânicos voláteis gerados em processos biológicos de produção de hidrogênio usando LLME-GC-FID**. Dissertação. Universidade Estadual Paulista. 107 f. Araraquara, 2017.

PENTEADO, E.D. **Influência da origem e do pré-tratamento do inóculo na produção de hidrogênio a partir de água residuárias em biorreatores anaeróbios**. Dissertação. Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 137 p, SP, 2012.

RIBAS, M.M; MORAES, E.M.; FORESTI, E. Avaliação da acurácia de diversos métodos para determinação de ácidos graxos voláteis e alcalinidade a bicarbonato para monitoramento de reatores anaeróbios. **Eng. Sanit. Ambiental**, v 12, n 3, 240-246 p, 2007.

Disponível em: <https://www.scielo.br/j/esa/a/3mHzGTJ3vHM3kJY6YzCrmjR/?lang=pt&format=pdf>

SÁ, L.R.V. *et al.* Produção de hidrogênio via fermentação anaeróbia – Aspectos gerais e possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais brasileiros. **Revista Química Nova**. v 37, n 5, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20140138>

SÁ, L.R.V.; CAMMAROTA, M.C.; OLIVEIRA, T.C.; OLIVEIRA, E.M.M; MATOS, A.; FERREIRA-LEITÃO, V.S. Pentoses, hexoses and glycerin as substrates for biohydrogen production: Na approach for Brazilian biofuel integration. **Elsevier**, 2013. Disponível em: software Harzing's Publish.

SALVATERRA, D. M. V. **Produção de Biogás a partir de Ácidos Orgânicos provenientes de um biorreator de “Dark Fermentation”**. Dissertação. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 72 p, 2019. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10362/94783>

SILVA, B. G. *et al.* Influência da carga aplicada de xilose e de nutrientes, em reator anaeróbio de leito fixo operado em bateladas sequenciais para produção de hidrogênio e ácidos orgânicos voláteis. **ResearchGate**. 2012. DOI: 10.13140/2.1.1604.4804. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/266317208\\_Influencia\\_da\\_carga\\_aplicada\\_de\\_xilose\\_e\\_de\\_nutrientes\\_em\\_reator\\_anaerobio\\_de\\_leito\\_fixo\\_operado\\_em\\_bateladas\\_sequenciais\\_para\\_producao\\_de\\_hidrogenio\\_e\\_acidos\\_organicos\\_volateis](https://www.researchgate.net/publication/266317208_Influencia_da_carga_aplicada_de_xilose_e_de_nutrientes_em_reator_anaerobio_de_leito_fixo_operado_em_bateladas_sequenciais_para_producao_de_hidrogenio_e_acidos_organicos_volateis)

SILVA, D.G. *et al.* **Desenvolvimento de método analítico por CLAE -DAD para identificação de AOVs em biorreatores de produção de hidrogênio**. I Simpósio Paranaense de Hidrogênio, 17-18 p, 2017. Disponível em: <https://docplayer.com.br/121359866-Anais-i-simposio-paranaense-de-hidrogenio-issn.html>

SOARES, J.F. **Produção de hidrogênio a partir da fermentação anaeróbia de hidrolisados de resíduos agroindustriais**. Tese. Universidade Federal de Santa Maria, 95 p, RS, 2019.

SOUZA, I.T. **Produção de hidrogênio por fermentação anaeróbia: enriquecimento nutricional e influência da luminosidade**. Dissertação. Universidade Federal de Uberlândia, 77 p, MG, 2017.

SKOOG; WEST; HOLLER; CROUCH. Fundamentos de Química Analítica. São Paulo (SP): **Editora Thomson**. Tradução da 8ª ed. Norte-americana, 2006. Disponível em: Minha Biblioteca Integrada UFPR.

RODRIGUES, R. M. M.; CEBALLOS, B. S. O de; LOPES, W. S. Validação de método para determinação de ácidos graxos voláteis em efluentes de biorreatores anaeróbios por meio de cromatografia gasosa. **Revista DAE**. n 215, v 67, 2019. DOI: 10.4322/dae.2019.009. Disponível em: [http://revistadae.com.br/artigos/artigo\\_edicao\\_215\\_n\\_1759.pdf](http://revistadae.com.br/artigos/artigo_edicao_215_n_1759.pdf)