



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA CIVIL E AMBIENTAL
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL

FRANCYELLE KAROLYNNE VIEIRA MACHADO

**INTEGRAÇÃO DE PROCESSOS ANAERÓBIO E AERÓBIO PARA CONVERSÃO
DE BIOMASSA DE MICROALGAS, VINHAÇA E GLICEROL EM BIOPOLÍMEROS**

RECIFE
2025



CARACTERIZAÇÃO E SIMULAÇÃO DE RESERVATÓRIOS, ENERGIAS RENOVÁVEIS
E BIOTECNOLOGIA AMBIENTAL

Apoio



Gestão



FRANCYELLE KAROLYNNE VIEIRA MACHADO

**INTEGRAÇÃO DE PROCESSOS ANAERÓBIO E AERÓBIO PARA CONVERSÃO
DE BIOMASSA DE MICROALGAS, VINHAÇA E GLICEROL EM BIOPOLÍMEROS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao curso de Engenharia Civil da Universidade
Federal de Pernambuco, como requisito parcial
para a obtenção do título de Bacharel em
Engenharia Civil.

Área de concentração: Tecnologia Ambiental

Orientador (a): Prof. Dr. Wanderli Rogério Moreira Leite

Coorientador (a): Prof. Dra. Maria de Lourdes Florencio dos Santos

RECIFE
2025

**Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE**

Machado, Francyelle Karolynne Vieira .

Integração de processos anaeróbio e aeróbio para conversão de biomassa de microalgas, vinhaça e glicerol em biopolímeros / Francyelle Karolynne Vieira Machado. - Recife, 2025.

65 p. : il., tab.

Orientador(a): Wanderli Rogério Moreira Leite

Coorientador(a): Maria de Lourdes Florencio dos Santos

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, Engenharia Civil - Bacharelado, 2025.

Inclui referências.

1. Ácidos Graxos Voláteis. 2. Polihidroxialcanoato. 3. Reator em Batelada Sequencial. I. Leite, Wanderli Rogério Moreira. (Orientação). II. Santos, Maria de Lourdes Florencio dos. (Coorientação). IV. Título.

620 CDD (22.ed.)

FRANCYELLE KAROLYNNE VIEIRA MACHADO

**INTEGRAÇÃO DE PROCESSOS ANAERÓBIO E AERÓBIO PARA CONVERSÃO
DE BIOMASSA DE MICROALGAS, VINHAÇA E GLICEROL EM BIOPOLÍMEROS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao curso de Engenharia Civil da Universidade
Federal de Pernambuco, como requisito parcial
para a obtenção do título de Bacharel em
Engenharia Civil.

Área de concentração: Tecnologia Ambiental

Aprovado em: 08/09/2025.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Wanderli Rogério Moreira Leite
(Orientador)

Prof. Dra. Maria de Lourdes Florencio dos Santos
(Coorientadora)

Profa. Dra. Shyrlane Torres Soares Veras
(Examinador)

Prof. Dr. Marcos Adriano Marques Pessôa Sales
(Examinador)

Aos meus queridos avós, Maria de Lourdes e Amaro Machado (in memoriam).

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Simone e Anderson, pela educação, pela disciplina e por todo o empenho que sempre tiveram para me proporcionar melhores condições de vida e me apoiar no caminho que escolhi seguir.

Aos meus irmãos, Francynne e Fellype, pela cumplicidade e pelo apoio constante. Aos meus avós, tios e primos por sempre estarem prontos a me ajudar e pela compreensão nos momentos em que não pude estar presente.

Aos meus orientadores, Wanderli Leite e Lourdinha Florencio, pelas oportunidades, pela disponibilidade, pelos ensinamentos, pelo incentivo e pela confiança que depositaram no meu trabalho.

Aos técnicos do LSA, Danúbia, Ronaldo e Iago, pelo auxílio durante a realização dos experimentos.

Aos amigos do LSA, especialmente Agnes, Dicla, Gisella e Acson, por toda a ajuda que me deram ao longo dos dias de trabalho no laboratório.

Aos amigos que tornaram essa jornada mais leve e alegre. Obrigada por todo o apoio, pelos momentos compartilhados, pelas conversas, pelas noites e madrugadas de estudo e pelos momentos de descontração. Sou grata por terem me acolhido nessa fase tão desafiadora, especialmente por estar fisicamente longe da minha família.

À Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – ANP e à Financiadora de Estudos e Projetos – FINEP, por meio do Programa de Formação de Recursos Humanos da ANP para o Setor de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – PRH-ANP/FINEP, suportado com recursos provenientes do investimento de empresas petrolíferas qualificadas na Cláusula de P, D&I da Resolução ANP Nº 50/2015. Em particular ao PRH 48.1 “Caracterização e Simulação de Reservatórios, Energias Renováveis e Biotecnologia Ambiental” (PROCESSO ANP Nº48610.201019/2019-38), sediado no Departamento de Energia Nuclear do Centro de Tecnologia e Geociências da UFPE, pelo apoio financeiro.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.
Muito obrigada!

RESUMO

Os polihidroxialcanoatos (PHA) são biopolímeros biodegradáveis, produzidos a partir de ácidos graxos voláteis, que são gerados durante a digestão anaeróbia de resíduos orgânicos. Esses biopolímeros oferecem uma alternativa sustentável em substituição aos plásticos derivados do petróleo, que tem como vantagem a redução do impacto ambiental e biodegradabilidade; também contribuindo com a eficiência energética, economia de recursos e uma maior diversificação da cadeia produtiva. A otimização da produção de polihidroxialcanoatos depende de uma série de parâmetros operacionais e tipo de substrato, tais fatores possuem influência direta na formação de composição de ácidos graxos voláteis (AGVs). A manipulação estratégica desses parâmetros permite a obtenção de polihidroxialcanoatos do tipo PHB e/ou PHV, adequando-os para uma ampla gama de aplicações, como em sacolas, embalagens de cosméticos, implantes médicos, entre outros. Nesse contexto, o uso de reatores em bateladas sequenciais com culturas microbianas mistas se destaca como uma estratégia eficiente, pois esse sistema, aliado ao substrato rico em AGVs, permite selecionar a biomassa mais adequada para o processo, com base em um padrão alternado de excesso e falta de substrato, onde se cria uma forte vantagem seletiva para os microrganismos. No processo anaeróbio, este trabalho investigou o impacto dos parâmetros de Tempo de Detenção Hidráulica (TDH), Carga Orgânica Volumétrica (COV) e pH; e da influência do tipo de substrato na produção de ácidos graxos voláteis. A concentração de AGVs teve máximo de $1259,98 \pm 511,23 \text{ mg AGV} \cdot \text{L}^{-1}$ quando teve como substratos uma codigestão de glicerol com biomassa algal, esta última após passar por um pré-tratamento térmico. Já no processo aeróbio, buscou-se promover o crescimento de microrganismos acumuladores de PHA, correlacionando a disponibilidade de AGVs no meio efluente com o teor de biopolímeros, de forma a avaliar o potencial de conversão da biomassa em biopolímero. Nesse sistema, obteve-se 5,55 mg de PHA, com teor de 0,19% ($\text{mg PHA} \cdot \text{mg SSV}^{-1}$). A melhor condição foi com alimentação por ácido acético puro, alcançando teor de 0,33% ($\text{mg PHA} \cdot \text{mg SSV}^{-1}$), que não é promissor em relação aos valores encontrados na literatura, que podem atingir mais de 60% sob condições otimizadas. Para que a proposta avance como produto, sugere-se priorizar substratos de baixo custo, na etapa anaeróbia, que gerem efluente ricos em acetato.

Palavras-chave: ácidos graxos voláteis, polihidroxialcanoato, reator em batelada sequencial.

ABSTRACT

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are biodegradable biopolymers produced from volatile fatty acids (VFAs), which are generated during the anaerobic digestion of organic waste. These biopolymers offer a sustainable alternative to petroleum-derived plastics, with advantages such as reduced environmental impact and biodegradability, as well as contributing to energy efficiency, resource savings, and greater diversification of the production chain. The optimization of polyhydroxyalkanoate production depends on several operational parameters and the type of substrate, which directly influence the formation and composition of volatile fatty acids (VFAs). Strategic manipulation of these parameters enables the production of PHB and/or PHV-type polyhydroxyalkanoates, making them suitable for a wide range of applications, such as shopping bags, cosmetic packaging, medical implants, among others. In this context, the use of sequencing batch reactors with mixed microbial cultures stands out as an efficient strategy, since this system, combined with VFA-rich substrates, allows for the selection of the most suitable biomass for the process, based on an alternating pattern of substrate excess and limitation, which creates a strong selective advantage for microorganisms. In the anaerobic process, this study investigated the impact of Hydraulic Retention Time (HRT), Volumetric Organic Loading Rate (OLR), and pH parameters, as well as the influence of substrate type on VFA production. The maximum VFA concentration obtained was 1259.98 ± 511.23 mg VFA·L⁻¹ using a co-digestion of glycerol and algal biomass, the latter previously subjected to thermal pretreatment. In the aerobic process, the aim was to promote the growth of PHA-accumulating microorganisms by correlating the availability of VFAs in the effluent with the biopolymer content, in order to assess the biomass-to-biopolymer conversion potential. In this system, 5.55 mg of PHA were obtained, with a content of 0.19% (mg PHA·mg VSS⁻¹). The best condition was achieved using pure acetic acid as the substrate, reaching a PHA content of 0.33% (mg PHA·mg VSS⁻¹), which is not promising compared to values commonly reported in the literature, which can exceed 60% under optimized conditions. For the proposal to advance toward a viable product, it is suggested to prioritize low-cost substrates in the anaerobic stage that generate effluents rich in acetate.

Keywords: volatile fatty acids, polyhydroxyalkanoates, sequencing batch reactor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema de digestão anaeróbia	17
Figura 2 - Microscopia eletrônica de células de <i>R. Eutropha</i> contendo PHAs	20
Figura 3 - Representação esquemática dos reatores RA (1) e RBS (2).....	25
Figura 4 - Reator Acidogênico	26
Figura 5 - Lagoa de Alta Taxa.....	27
Figura 6 - Reator de produção de microrganismos acumuladores de PHA	30
Figura 7 - Preparo do fermentado para alimentar o RBS	32
Figura 8 - Rotaria e nematoide no lodo ativado	38
Figura 9 - Produção de AGV's e monitoramento de pH por fase do RA.....	41
Figura 10 - Sólidos Suspensos Voláteis: FASE I (RBS).....	43
Figura 11 - Microorganismos encontrados na Fase I	44
Figura 12 - Oxigênio Dissolvido ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) - Fase I.....	45
Figura 13 - Microrganismos filamentosos.....	46
Figura 14 - Antes e depois déficit de biomassa e proliferação de bactérias filamentosas.....	46
Figura 15 - Sólidos Suspensos Voláteis: FASE II (RBS)	47
Figura 16 - Microrganismo Aeolosoma observado em amostra de lodo floculento	48
Figura 17 - Surgimento da Vorticella.....	49
Figura 18 - Oxigênio Dissolvido ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) - Fase II	49
Figura 19 - Sólidos Suspensos Voláteis: FASE III (RBS)	50
Figura 20 - Euplotes	51
Figura 21 - Alta incidência de rotaria e surgimento de nematoides	51
Figura 22 - Oxigênio Dissolvido ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) - Fase III	53
Figura 23 - Monitoramento do pH (Licor misto e Feed).....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Teores de PHA encontrados na literatura.....	23
Tabela 2 - Parâmetros operacionais do reator fermentador RA	28
Tabela 3 - Fases do ciclo operacional do RBS	30
Tabela 4 - Composição dos macro e micronutrientes.....	31
Tabela 5 - Condições cromatográficas para análise de AGVs	33
Tabela 6 - Condições cromatográficas para análise de PHAs	35
Tabela 7 - Caracterização do lodo ativado	37
Tabela 8 - Caracterização da vinhaça, biomassa algal e glicerina.....	39
Tabela 9 - Concentração de polímeros (PHB, PHH e PHA) obtida no reator.....	55

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Parâmetros para caracterização dos inóculos e substratos	32
Quadro 2 – Parâmetros para monitoramento dos reatores	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGV	Ácidos Graxos Voláteis
ANP	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
BERSO	Biorrefinaria Experimental de Resíduos Sólidos Orgânicos
COV	Carga Orgânica Volumétrica
C/N	Carbono/Nitrogênio
CMM	Cultura Microbiana Mista
CSTR	Reator de Tanque com Agitação Contínua
DA	Digestão Anaeróbia
DQOs	Demanda Química de Oxigênio solúvel
DQOt	Demanda Química de oxigênio total
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
F/F	Feast/Famine
FINEP	Financiadora de Estudos e Projetos
I/S	Inóculo/Substrato
LAT	Lagoa de Alta Taxa
LSA	Laboratório de Saneamento Ambiental
NaOH	Hidróxido de Sódio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NH ₃	Amônia
NTK	Nitrogênio Total Kjeldahl
ODS	Objetivos de Desenvolvimento Sustentável
ONU	Organização das Nações Unidas
ORP	Potencial de Oxirredução
PHA	Polihidroxialcanoato
PHB	Polihidroxibutirato
PRH	Programa de Formação de Recursos Humanos
ST	Sólidos Totais
SV	Sólidos Voláteis
TDH	Tempo de Detenção Hidráulica
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Justificativa	13
2 OBJETIVOS	14
2.1 Geral.....	14
2.2 Específicos	14
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
3.1 Substratos para fermentação acidogênica	15
3.2 Fermentação acidogênica.....	16
3.3 Produção de ácidos graxos voláteis	18
3.4 Produção de PHA.....	20
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4.1 Sistema experimental	25
4.1.1 Reator Acidogênico.....	26
4.1.2 Reator em Batelada Sequencial.....	29
4.2 Métodos analíticos	32
4.2.1 Determinação da concentração dos biopolímeros no lodo aeróbio	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1 Caracterização dos substratos e inóculos	37
5.1.1 Caracterização do inóculo do reator em batelada sequencial.....	37
5.1.2 Caracterização dos substratos do reator acidogênico	38
5.2 Monitoramento da produção de AGV no RA	39
5.3 Monitoramento das condições ambientais do RBS e produção de PHA	42
5.3.1 FASE I – Operação com alimentação exclusiva de ácido acético	42
5.3.2 FASE II – Transição de alimentação: ácido acético para fermentado do RA	45
5.3.3 FASE III – Operação com alimentação exclusiva de fermentado do RA	50
5.4 Discussão integrada	53
6 CONCLUSÃO	57
6.1 Sugestões para pesquisas futuras	57
8 REFERÊNCIAS	59

1 INTRODUÇÃO

O aumento da população humana e da economia global resultou em uma grande quantidade de resíduos gerados. A gestão eficaz de resíduos é essencial para reduzir danos ambientais e promover uma sociedade sustentável. Uma das estratégias mais promissoras nesse sentido é a recuperação de recursos, que não apenas contribui para a minimização de resíduos, mas também possibilita a transformação deles em produtos de valor agregado (LEE et al., 2014).

A digestão anaeróbia (DA) é um processo que envolve inúmeras reações (incluindo hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese), e tem um papel significativo no tratamento de águas residuais, especialmente as que contêm muita matéria orgânica. Apesar do status do metano como o principal produto da DA, estudos demonstraram que outros produtos químicos têm um impacto maior e uma variedade de usos em processos químicos e biológicos, incluindo hidrogênio e ácidos carboxílicos, que são gerados durante o estágio acidogênico da DA (SANCHEZ-LEDESMA et al., 2023).

Os ácidos graxos voláteis constituem um conjunto de ácidos carboxílicos que, por terem uma gama diversificada de usos, são classificados como produtos químicos de base. Atualmente, a fabricação comercial de AGVs ocorre a partir de fontes de combustível fóssil, porém, a fermentação acidogênica utilizando culturas microbianas mistas tem se tornado uma alternativa promissora para sua produção, podendo substituir os métodos tradicionais e favorecer a economia circular. Os AGVs têm um número limitado de átomos de carbono, os mais comumente feitos industrialmente são os ácidos acético, propiônico, butírico e valérico (VÁZQUEZ-FERNÁNDEZ et al., 2022). Estes AGVs produzidos podem servir como meio para geração de um produto de valor agregado chamado polihidroxialcanoato (PHA).

Os polihidroxialcanoatos são polímeros termoplásticos derivados do poliéster, que diversas bactérias acumulam quando cultivadas em condições de crescimento desbalanceadas, onde o carbono está presente em excesso em relação a outros nutrientes essenciais, como nitrogênio, fósforo, enxofre ou fatores de crescimento e apresentam características semelhantes às do polipropileno e polietileno, e já disponível comercialmente como um bioplástico totalmente biodegradável (CHEN & CHEN, 2010; MARANG et al., 2013). Nessas circunstâncias, o PHA é armazenado como uma reserva, fornecendo carbono e energia intracelular para uma variedade de microrganismos, incluindo as bactérias fotossintéticas (CHEN et al., 2011).

Nesse contexto, o presente estudo tem como objetivo avaliar a viabilidade e a eficiência da produção de biopolímeros por meio da codigestão de biomassa algal, vinhaça e glicerol. Para tanto, serão realizados a caracterização dos substratos e inóculos empregados, o monitoramento da produção de ácidos graxos voláteis (AGVs) e a otimização das condições operacionais que favoreçam o acúmulo de polihidroxialcanoatos (PHAs), com vistas ao desenvolvimento de um processo sustentável e tecnologicamente viável.

1.1 Justificativa

A maior parte dos plásticos comercializados é derivada do petróleo, e, por isso, o mercado de óleo e gás influencia diretamente o consumo e o custo final dos plásticos convencionais. Nessa perspectiva, os bioplásticos surgem como uma alternativa sustentável para reduzir a dependência dos petroplásticos e abrir novas possibilidades para o aproveitamento dos derivados de petróleo em outras cadeias produtivas. Além de serem mais eficientes em termos energéticos, os bioplásticos têm ganhado espaço em setores como o têxtil, agrícola, de transportes, bens de consumo e construção civil, impulsionados pela demanda por soluções que reduzam emissões de gases de efeito estufa. Dentro desse cenário, a produção de biopolímeros a partir de resíduos sólidos, a exemplo da biomassa algal, surge como uma proposta com o potencial de reduzir a necessidade de destinação de resíduos em aterros sanitários. Diante das preocupações ambientais com o acúmulo de plástico sintético, os plásticos biodegradáveis, como o PHA, têm sido pesquisados para substituir parcialmente os plásticos convencionais, por ser flexível, atóxico, e possibilitar diversas aplicações, como em sacolas, embalagens cosméticas, implantes médicos, entre outros. E a relevância científica da integração da rota anaeróbia com a rota aeróbia reside principalmente na viabilidade econômica e na sustentabilidade do processo de produção de PHA.

Além disso, os avanços na produção e utilização de biopolímeros contribuem diretamente para o alcance de diversos ODS estabelecidos pela ONU. Entre eles, destacam-se o ODS 6, que promove o acesso à água potável e saneamento; o ODS 9, que incentiva a indústria, inovação e infraestrutura; e o ODS 11, que busca criar cidades e comunidades mais sustentáveis. Outras metas também são favorecidas, como o ODS 12, voltado ao consumo e produção responsáveis; o ODS 13, que trata da ação contra a mudança global do clima; o ODS 14, que visa proteger a vida na água; e o ODS 15, relacionado à conservação da vida terrestre. Esses objetivos podem ser atendidos ao reduzir a geração de resíduos, diminuir as emissões de carbono e promover o desenvolvimento de alternativas biodegradáveis.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a viabilidade da integração entre as rotas anaeróbia e aeróbia para a produção de biopolímeros a partir da codigestão de biomassa algal e vinhaça, com foco na geração de ácidos graxos voláteis e seu aproveitamento para a síntese de polihidroxialcanoatos.

2.2 Específicos

- a. Caracterizar a biomassa algal, a vinhaça e os inóculos empregados, estabelecendo sua composição físico-química como base para a escolha das condições operacionais.
- b. Monitorar a produção e a composição de ácidos graxos voláteis gerados na codigestão, identificando aqueles com maior potencial para a síntese de polihidroxialcanoatos.
- c. Avaliar as condições que promovem o crescimento de microrganismos acumuladores de PHA em ambiente aeróbio, correlacionando a disponibilidade de AGVs com o teor de biopolímeros.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Substratos para fermentação acidogênica

As lagoas com microalgas para o tratamento de águas residuais foram introduzidas na Califórnia na década de 1950. Essa tecnologia utiliza lagoas rasas, com profundidade entre 0,3 m e 0,6 m, mantidas em constante agitação por rodas de pás. Nessas lagoas, bactérias e fitoplâncton crescem em simbiose. A interação entre as microalgas e as bactérias heterotróficas é essencial para o processo de tratamento das águas residuais, já que as bactérias degradam a matéria orgânica enquanto consomem o oxigênio produzido pelas microalgas por meio da fotossíntese. Similar ao lodo ativado em estações de tratamento de águas residuais convencionais, a biomassa das microalgas pode ser processada por digestão anaeróbica para gerar biogás e recuperar energia. Recentemente, têm sido investigados métodos de pré-tratamento físico, químico e biológico para desintegrar as células de microalgas, solubilizar o conteúdo orgânico e aumentar a eficiência e a extensão da digestão anaeróbica. Dentre esses, os pré-tratamentos térmicos são os mais estudados (PASSOS et al., 2014).

Estudos indicaram que a biomassa de algas com baixo teor de lipídios, ou resíduos de algas extraídas de lipídios, gera significativamente mais energia quando submetida à digestão anaeróbica do que quando utilizada para a produção de biodiesel. Além disso, a biomassa úmida pode ser utilizada diretamente na DA, eliminando a necessidade de secagem extensiva (SHARMA et al., 2023).

Um dos resíduos líquidos com elevado potencial para utilização em processos de codigestão com microalgas é a vinhaça, subproduto gerado nas etapas de produção de etanol. Esse efluente apresenta alta carga orgânica, além de conter expressivas concentrações de potássio e sulfatos, bem como características marcadamente ácidas e corrosivas. Entre as diferentes águas residuárias que podem ser tratadas por digestão anaeróbia, a vinhaça proveniente da cana-de-açúcar se destaca por ser o principal resíduo líquido do setor sucroalcooleiro e por possuir considerável valor energético. Essa propriedade possibilita incrementar o balanço energético das usinas por meio da conversão do biogás produzido em eletricidade. Apesar desse potencial, ainda existem desafios técnicos a serem superados para viabilizar o aproveitamento otimizado da vinhaça em larga escala, sobretudo em sistemas anaeróbios submetidos a elevadas cargas orgânicas e a tempos de retenção hidráulica reduzidos (FUESS et al., 2017).

Sob a perspectiva macromolecular, a vinhaça caracteriza-se por apresentar uma elevada fração de carboidratos orgânicos, correspondendo a cerca de 72% de sua composição. Além disso, contém concentrações significativas de diversos macronutrientes e apresenta um pH naturalmente ácido. Apesar dessas características favoráveis, há uma escassez de pesquisas voltadas ao aproveitamento da vinhaça de cana-de-açúcar como co-substrato em processos de digestão anaeróbia de microalgas (JANKE, 2015).

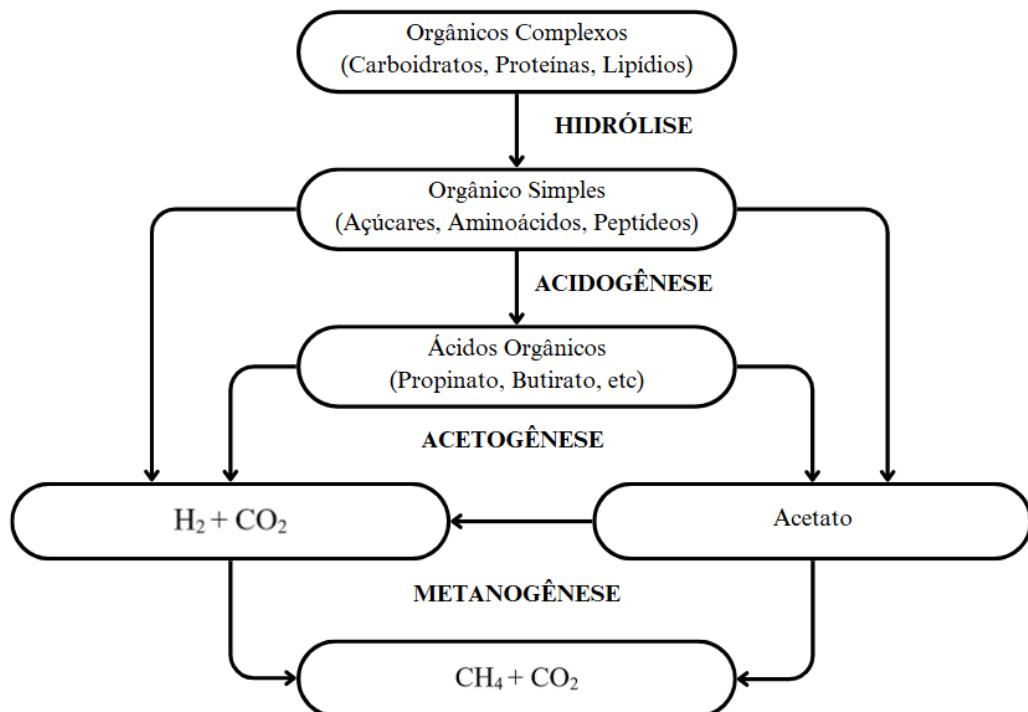
Tais avanços podem ser obtidos por meio da adoção de sistemas de digestão anaeróbia, nos quais a matéria orgânica complexa contida na vinhaça é inicialmente submetida a condições favoráveis à sua hidrólise, promovendo a quebra das macromoléculas. Na etapa subsequente, as frações residuais de carboidratos são direcionadas para a fase acidogênica, onde podem ser transformadas em bio-hidrogênio e ácidos graxos voláteis (FUESS et al., 2017).

Um outro substrato de grande potencial para processos biotecnológicos é o glicerol, que tem sido amplamente utilizado em diferentes aplicações envolvendo digestão anaeróbia, como a produção de hidrogênio e de ácidos graxos voláteis (SILVA, 2020). O termo “glicerol” refere-se especificamente ao composto químico puro 1,2,3-propanetriol, enquanto os produtos comerciais derivados são denominados glicerina. A classificação da glicerina varia conforme o teor de glicerol presente, além de atributos como coloração, odor e nível de impurezas. Já a glicerina bruta — frequentemente chamada de glicerol bruto — corresponde ao resíduo gerado como subproduto durante o processo de produção de biodiesel (CUSTÓDIO et al., 2022).

3.2 Fermentação acidogênica

A produção de AGVs a partir de resíduos é um processo anaeróbio que envolve as etapas de hidrólise e acidogênese ou fermentação acidogênica (**Figura 1**). Durante a hidrólise, os polímeros orgânicos complexos nos resíduos são quebrados em monômeros mais simples por enzimas secretadas por microrganismos hidrolíticos. Em seguida, os monômeros gerados são fermentados, principalmente por bactérias acidogênicas, produzindo AGVs como ácidos acético, propiônico e butírico. É comum que as etapas de hidrólise e acidogênese ocorram simultaneamente em um único reator anaeróbico. Nos últimos anos, muitos esforços foram dedicados a otimizar a produção de AGVs utilizando diferentes tipos de resíduos e ajustando as condições de operação do reator anaeróbico. É agora reconhecido que o controle adequado do processo pode influenciar o tipo de AGV produzido, o que é crucial para o desempenho de aplicações subsequentes, como a produção de polihidroxialcanoatos (LEE et al., 2014).

Figura 1 - Esquema de digestão anaeróbia



Fonte: adaptado de Chernicharo (1997)

Na fermentação anaeróbia (FA), compostos orgânicos simples, como monossacarídeos, ácidos graxos de cadeia longa, glicerol e aminoácidos, resultantes da hidrólise de materiais complexos, são metabolizados pelas células através de metabolismo fermentativo, gerando ácidos orgânicos, especialmente ácidos graxos de cadeia curta. A FA é realizada por um grupo diversificado de bactérias acidogênicas e envolve reações de oxidação-redução, cujas atividades são influenciadas por mudanças nas condições ambientais, sulfeto de hidrogênio e formação de novas células bacterianas (SANCHEZ-LEDESMA et al., 2023).

Embora a maioria dos estudos sobre a produção de PHAs por culturas mistas envolvam a seleção de culturas e o acúmulo de PHA em duas etapas separadas, poucos relatam o uso de um processo de três etapas, em que a fermentação anaeróbica precede as etapas de seleção e acúmulo de polímero (ALBUQUERQUE et al., 2010).

A fermentação acidogênica converte o conteúdo orgânico solúvel em ácidos graxos voláteis. Durante esse processo, a hidrólise e a acidificação do substrato em condições anaeróbicas resultam na produção de ácidos graxos de cadeia curta (C₂-C₅). Uma parte da demanda química de oxigênio (DQO) solúvel é consumida para o crescimento e manutenção celular, enquanto uma grande quantidade é convertida em produtos de fermentação (JAYAKRISHNAN et al., 2021).

Nos últimos anos, pesquisadores têm investigado como diversos parâmetros operacionais afetam a produção de ácidos graxos voláteis (AGVs), como a composição do substrato, pH, temperatura, taxa de carga orgânica volumétrica (COV) e tempo de retenção hidráulica (TRH). Esses fatores impactam as etapas da digestão anaeróbica e podem influenciar a produção de AGVs, hidrogênio e metano, tornando essencial entender sua influência para otimizar o acúmulo de AGVs (VÁZQUEZ-FERNÁNDEZ et al., 2022).

Os microrganismos acidogênicos podem ser inibidos em ambientes com pH muito baixo (< 5,0) ou extremamente alcalinos (> 12,0). Além disso, o pH também afeta a eficiência da etapa de hidrólise, que depende da complexidade do substrato. Portanto, o pH ideal para hidrólise varia conforme o tipo de substrato utilizado (VÁZQUEZ-FERNÁNDEZ et al., 2022).

A temperatura também é um parâmetro importante, pois influencia as taxas metabólicas, as atividades enzimáticas e o crescimento dos microrganismos. A temperatura ideal para otimizar o rendimento de AGVs depende tanto da composição microbiana quanto da composição orgânica do resíduo. Diversos estudos avaliaram a produção de AGVs a partir de diferentes substratos em faixas de temperatura como: psicrofílicas (4–20 °C), mesofílicas (20–50 °C), termofílicas (50–60 °C) e hipertermofílicas (60–80 °C) (VÁZQUEZ-FERNÁNDEZ et al., 2022).

A COV ideal depende mais da complexidade dos componentes do resíduo do que da proporção das frações (carboidratos, proteínas, lipídios) presentes. Quando se trabalha com substratos complexos, como resíduos de lodo ativado ou carboidratos complexos, o estágio de hidrólise tende a ser o limitante da taxa, exigindo TDH maiores para a fermentação. Portanto, é necessário manter a COV baixa para evitar o acúmulo de componentes não hidrolisados, que aumentariam a viscosidade do caldo, prejudicando a produção de AGVs devido a limitações na transferência de massa (VÁZQUEZ-FERNÁNDEZ et al., 2022). Há uma correlação direta entre a carga orgânica utilizada e os AGVs gerados, onde os AGVs crescem com o aumento da carga orgânica aplicada devido à maior oferta de carbono que pode ser fermentado (JAYAKRISHNAN et al., 2021).

3.3 Produção de ácidos graxos voláteis

A maior parte da bioprodução de AGVs por fermentação utiliza substratos puros, como glicose, xilose ou glicerol. Embora o uso de fontes de carbono puras proporcione altos rendimentos e produtividades, o custo desses substratos é elevado, o que aumenta o custo global do processo. Para reduzir os custos e tornar o processo fermentativo competitivo em

comparação com os baseados em combustíveis fósseis, diferentes tipos de resíduos têm sido propostos como substratos alternativos. Além disso, o uso de resíduos para a bioprodução de AGVs contribui para a economia circular e evita o uso de matérias-primas comestíveis na produção de produtos químicos (VÁZQUEZ-FERNÁNDEZ et al., 2022).

Um parâmetro importante para avaliar o impacto da composição do substrato no rendimento da produção de AGVs é a relação Carbono/Nitrogênio (C/N). Carboidratos e lipídios tendem a aumentar essa relação, pois possuem maior teor de carbono do que de nitrogênio, enquanto as proteínas, por conterem mais nitrogênio, diminuem a relação C/N. Para garantir que os nutrientes estejam equilibrados para a manutenção e crescimento das bactérias, uma relação C/N ótima é necessária em qualquer processo de digestão anaeróbica. Uma relação C/N baixa pode causar a liberação de amônia livre ou amônio, o que inibe a acidogênese. A faixa ideal de C/N para digestão anaeróbica é entre 20 e 30 (VÁZQUEZ-FERNÁNDEZ et al., 2022).

A fermentação acidogênica desempenha um papel fundamental na conversão da matéria orgânica solúvel em AGVs. Em condições anaeróbicas, a hidrólise e a subsequente acidificação do substrato resultam na síntese de ácidos graxos de cadeia curta (C2-C5). Nesse processo, uma porção de DQO solúvel é alocada para a manutenção e o crescimento das células microbianas. Contudo, uma parcela significativa dessa DQO solúvel é direcionada para a formação dos produtos de fermentação, ou seja, os próprios AGVs (JAYAKRISHNAN et al., 2021).

Os carboidratos são facilmente hidrolisados em glicose pelas enzimas microbianas, que estão prontamente disponíveis para a glicólise e fermentação, sendo convertidas em ácidos graxos voláteis e bio-hidrogênio. A composição dos AGVs varia de acordo com as condições, e foi observado que, em temperaturas mais altas, a proporção entre C2:C3:C4 pode ser 6:1:3 ou 7:1:2. O conteúdo biodegradável dos substratos líquidos é estimado pela demanda de oxigênio de carbono (DQO) e pela demanda biológica de oxigênio (DBO), enquanto, para resíduos sólidos, também são utilizados sólidos voláteis e sólidos suspensos voláteis (DAHIYA et al., 2023).

O ácido acético é tipicamente obtido pela carbonilação do metanol, seguido por processos adicionais como a oxidação catalítica do acetaldeído, etileno ou butano; ele atua como um intermediário central na digestão anaeróbia e tende a se acumular durante processos de fermentação e prontamente ser convertido por microalgas em acetato. O ácido propiônico, por sua vez, é geralmente produzido como subproduto da produção de ácido acético ou por

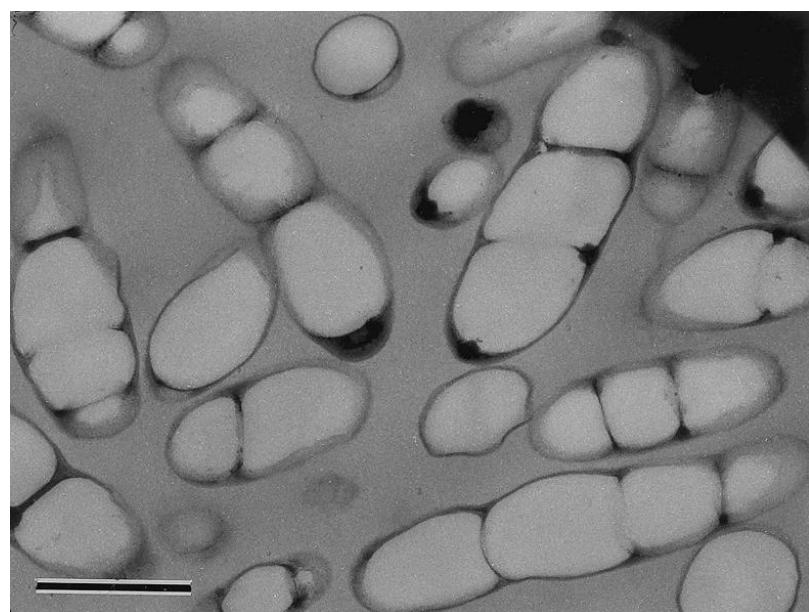
meio da hidroxicarboxilação do etileno na presença de catalisadores de ródio ou carbonila de níquel. Já o ácido butírico é produzido por oxidação do butiraldeído ou sintetizado pela oxossíntese do propileno derivado do petróleo bruto (VÁZQUEZ-FERNÁNDEZ et al., 2022; CHALIMA et al., 2017).

3.4 Produção de PHA

Os PHAs são poliésteres lineares acumulados por microrganismos procarióticos como grânulos de reserva de energia e carbono. Eles têm atraído grande interesse industrial como uma alternativa ecológica aos plásticos não biodegradáveis, devido às suas propriedades mecânicas e ambientais. (ANDREOLLI et al., 2022).

A primeira observação de grânulos de PHAs em células bacterianas (*Figura 2*) foi feita por Beijerinck, em 1888, mas sua composição como sendo constituídos por um material desconhecido na forma de homopolíesteres do ácido 3-hidroxibutírico, ao qual deu o nome de PHB, se deu mais tarde, em 1926, por Lemoigne (COSTA, 2011).

Figura 2 - Microscopia eletrônica de células de *R. Eutropha* contendo PHAs



A barra representa 0,5 μ m Fonte: Sudesh et al. (2000)

Os PHAs podem ser classificados em três categorias, com base no tamanho das cadeias de carbono de suas unidades monoméricas: cadeias curtas (scl-PHAs), médias (mcl-PHAs) e longas (lcl-PHAs), cada uma com propriedades únicas. Eles são compostos por 10^3 a 10^4

monômeros e podem ser produzidos por uma ampla gama de microrganismos procarióticos. Eles se acumulam no citoplasma das células microbianas na forma de grânulos, formando corpos de inclusão esféricos, insolúveis em água, com diâmetros entre 0,2 e 0,5 µm. Os ácidos graxos de cadeia longa favorecem a produção de mcl-PHA, enquanto ácidos graxos de cadeia curta ou ácidos graxos voláteis na faixa C2-C5 são metabolizados em scl-PHA. Os AGVs de números pares geram PHAs com maior teor de hidroxibutirato (HB), enquanto os de números ímpares geram PHAs com maior conteúdo de hidroxivalerato (HV) (SUDESH et al., 2000).

Pesquisas recentes sobre diferentes tipos de PHA estão evidenciando materiais com variados potenciais de aplicação. Embora muitos PHAs tenham sido identificados, apenas quatro são produzidos em grande escala para exploração comercial: o poli[(R)-3-hidroxibutirato] (PHB), o poli[(R)-3-hidroxibutirato-co-(R)-3-hidroxivalerato] (PHBV), o poli[(R)-3-hidroxibutirato-co-4-hidroxibutirato] (P3HB4HB) e o poli[(R)-3-hidroxibutirato-co-(R)-3-hidroxihexanoato] (PHBHHx) (CHEN & CHEN, 2010). O PHA já está comercialmente disponível como bioplástico totalmente biodegradável (MARANG et al., 2013). Alguns dos nomes comerciais de biopolímeros disponíveis no mercado incluem BIOCYCLE® (PHB), ENMATTM e BIOMER® (PHB/PHBV) (CHEN & CHEN, 2010).

O PHB, um exemplo de scl-PHA, é altamente cristalino, rígido e quebradiço, mas suas propriedades podem ser melhoradas com a incorporação de 3-hidroxivalerato (3HV) na cadeia polimérica. O PHB possui resistência à tração de 40 MPa e módulo de elasticidade de 3500 MPa. Embora suas propriedades mecânicas e físicas sejam semelhantes ao polipropileno, sua fragilidade limita algumas aplicações. No entanto, copolímeros compostos por dois ou mais tipos de monômeros podem apresentar propriedades de elasticidade e resistência à tração variadas, dependendo da composição, permitindo o desenvolvimento de materiais duráveis e é uma estratégia comum para melhorar as propriedades mecânicas dos PHAs, como flexibilidade e resistência; como o PHBV, formado pela combinação de 3-hidroxibutirato e 3-hidroxivalerato, que por oferecer maior flexibilidade, torna-os ideais para aplicações médicas e industriais (ANDREOLLI et al., 2022; JAYAKRISHNAN et al., 2021; MIN KIM et al., 2023).

A síntese de PHA bacteriana ocorre quando o crescimento celular é restrito, seja por fatores externos (como a falta de nutrientes ou acceptor de elétrons, como oxigênio, nitrogênio ou fósforo) ou internos. Durante a fase de fome, as células reduzem sua atividade a um mínimo, com uma queda na taxa de síntese enzimática e transcrição de RNA, onde o polímero acumulado é utilizado apenas como fonte de energia e carbono para o crescimento das células. Isso leva a uma limitação do crescimento na fase subsequente, devido à escassez de compostos

intracelulares necessários. Quando o substrato é fornecido em excesso, a adaptação fisiológica das células restaura as condições de crescimento e permite atingir altas taxas de crescimento, onde os microrganismos armazenam o substrato como polímero. Durante essa adaptação, o substrato é direcionado para o armazenamento do polímero (ALBUQUERQUE et al., 2010).

Estudos indicam que ácidos como acetato e butirato promovem a formação de PHB de alta eficiência, enquanto a combinação de propionato com acetato favorece a produção de copolímeros como P(HB-co-HV). Foi comprovado que o homopolímero de P(3HB) é produzido a partir de n-alcanoatos com números de carbono pares, enquanto o copolímero P(3HB-co-3HV) é produzido a partir de n-alcanoatos com números ímpares de carbono (ZHANG et al., 2014).

O lodo ativado gerado durante o tratamento de efluentes pode ser utilizado como um potencial reservatório de culturas mistas para a síntese de PHAs. Existem duas formas de lodo no processo de tratamento de águas residuais: o lodo primário e o lodo secundário. O lodo ativado de resíduos geralmente contém várias comunidades bacterianas, como *Proteobacteria*, *Actinobacteria* e *Cytophaga-Flavobacteria*. A proporção entre essas espécies pode variar dependendo do processo de tratamento e das pressões seletivas impostas durante o processo. Estudos mostram que é possível produzir PHA diretamente a partir do lodo ativado de resíduos de estações de tratamento de águas residuais (MUNIR & JAMIL, 2020).

A capacidade do lodo ativado, proveniente de estações de tratamento de águas residuais, para produzir polihidroxialcanoatos, aumenta progressivamente por meio de mecanismos como adaptação fisiológica, seleção e enriquecimento. A rapidez com que o lodo ativado se adapta e atinge uma alta resposta de armazenamento de PHA é um fator crucial tanto para o projeto e operação do processo quanto para o seu controle, especialmente considerando possíveis perturbações durante o estado estacionário (VALENTINO et al., 2014).

A seleção da biomassa é frequentemente obtida por meio de um padrão alternado de excesso e falta de substrato em um reator de batelada sequencial. Esse padrão cria uma forte vantagem seletiva para os microrganismos, incentivando-os a converter o substrato em PHA na fase de abundância. O PHA armazenado é então reutilizado na fase lenta seguinte, o que favorece o crescimento celular. A literatura existente apoia a ideia de que a preferência pelo armazenamento de PHA está fortemente associada a este mecanismo de seleção (VALENTINO et al., 2014; DIONISI et al., 2004).

Sabe-se que os microrganismos que armazenam substrato durante a fase inicial de banquete têm uma vantagem competitiva, pois podem usar o polímero armazenado como fonte

interna de carbono durante a fase de escassez, além da composição do PHA pode ser controlada aumentando a quantidade de substrato para obter a composição de monômero desejada. Isso pode tornar o processo competitivo em relação à produção de PHA com culturas puras, pois economiza custos com condições estéreis e pode ser realizado com substratos ricos em nutrientes, como muitos resíduos orgânicos (LI et al., 2021; VALENTINO et al., 2014).

Nos últimos anos, a produção de misturas de scl-PHA e mcl-PHA por culturas bacterianas puras tem sido explorada, onde podem ser produzidos a partir de cepas bacterianas utilizando fontes de carbono caras, como glicose ou sacarose, que representam até 40% do custo total de produção, mas esse processo requer uma desinfecção rigorosa, o que resulta em altos custos, sendo assim, a busca por processos mais econômicos para a produção de PHA inclui o uso de culturas mistas, usando ácidos graxos voláteis (AGVs) derivados de resíduos orgânicos, o que reduz os custos de produção. Essas populações microbianas, com composição desconhecida, são selecionadas por condições operacionais impostas ao sistema biológico. Oferecendo vantagens como a ausência de esterilização e adaptação a águas residuais, o que reduz custos de energia e equipamentos. A seleção de culturas com alta capacidade de armazenamento de PHA é crucial para a eficácia desses processos, como observado nos elevados teores de PHA encontrados na literatura (**Tabela 1**) (ALBUQUERQUE et al., 2010; ANDREOLLI et al., 2022; ZHAO et al., 2021).

Tabela 1 - Teores de PHA encontrados na literatura

Substrato	Inóculo	Teor de PHA (%)	Referência
Melaço de açúcar fermentado	Lodo ativado	66	SIVAGURUNATHAN, 2018
Glicerol bruto fermentado	Lodo anaeróbio + Lodo aeróbio	76	BURNIOL-FIGOLS, 2018
Ácido acético	Lodo ativado	40	BEUN, 2004
Ácido acético	Lodo ativado	78,5	SERAFIM, 2004
Ácido acético	Lodo ativado	89	JOHNSON, 2009

Fonte: a autora (2025)

As CMMs apresentam vantagens importantes em relação às culturas puras, como a eliminação da necessidade de esterilização dos reatores e a redução dos custos com energia, tornando o processo mais economicamente viável. A produção de PHAs nesse modelo segue uma série de etapas distintas: fermentação acidogênica de resíduos, enriquecimento do lodo ativado, acúmulo de polímeros pelos microrganismos e extração do biopolímero. Essa

estratégia, baseada na seleção natural, assegura que apenas os microrganismos com a capacidade de acumular carbono se destaquem, resultando em um sistema robusto, eficiente e altamente adaptável (ALBUQUERQUE et al., 2007a; JAYAKRISHNAN et al., 2021; VALENTINO et al., 2018).

Porém, a grande disparidade de custos entre os PHAs e os plásticos derivados do petróleo representa um desafio significativo para a substituição desses últimos por esses biopolímeros. Em 2020, a produção global de plásticos atingiu 386 milhões de toneladas (KIM, et al., 2023), comparado com 200 milhões em 2002. Projeções indicam que o mercado de bioplásticos poderá alcançar um valor de 6,73 bilhões de dólares até 2025. Além disso, espera-se que o mercado de PHAs cresça aproximadamente 14% até 2025, consolidando-se como um dos segmentos de maior crescimento no mercado de bioplásticos. Contudo, o custo de produção dos PHAs (entre 4.000 a 15.000 dólares por tonelada) é significativamente mais alto que o dos plásticos sintéticos (entre 1.000 a 1.500 dólares por tonelada) (SARATALE et al., 2021).

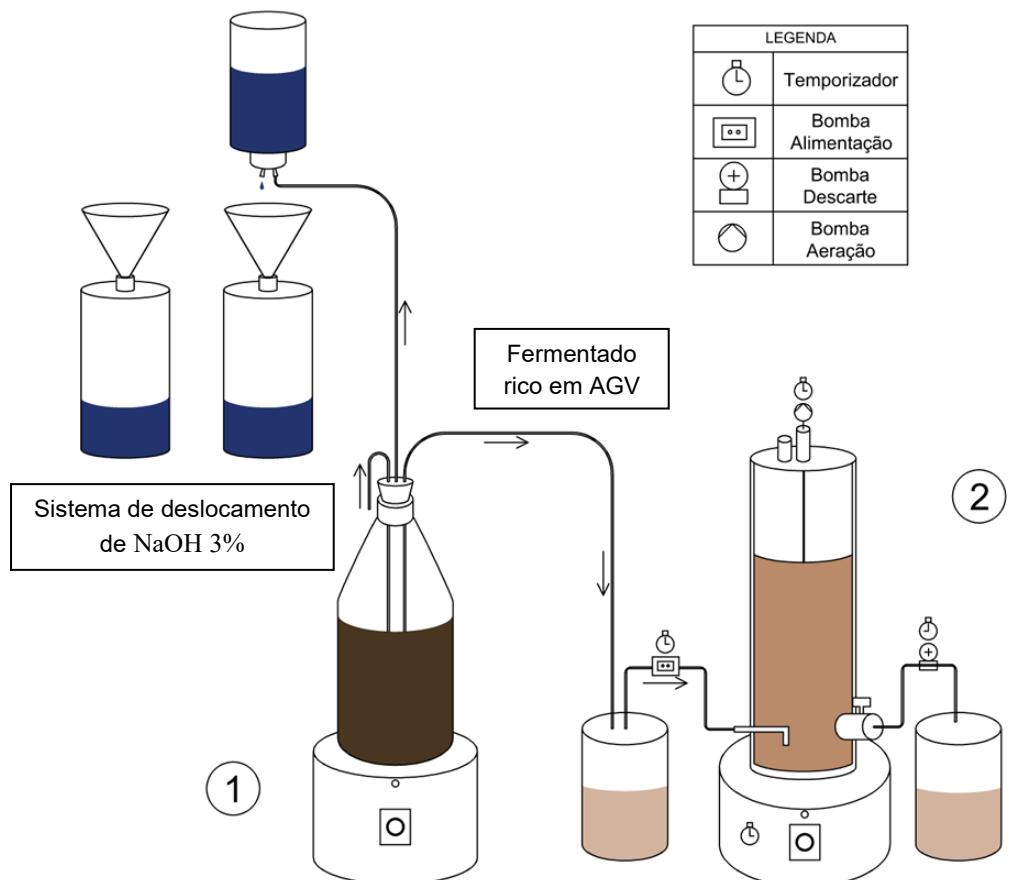
4 MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Laboratório de Saneamento Ambiental (LSA), situado no Centro de Tecnologia e Geociências (CTG) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), em Recife, Pernambuco, Brasil. O experimento anaeróbio teve um período de 548 dias e o experimento aeróbio por um período de 71 dias, que iniciou quando o anaeróbio estava com 477 dias de operação.

4.1 Sistema experimental

O sistema experimental (**Figura 3**) é composto por dois reatores; um reator acidogênico (RA), onde ocorreu a fermentação e foi produzido um efluente rico em AGV, que após filtrado e diluído, foi utilizado como substrato do reator em batelada sequencial (RBS), para produção de PHA, em regime de abundância/escassez.

Figura 3 - Representação esquemática dos reatores RA (1) e RBS (2)



Fonte: a autora (2025)

No sistema anaeróbio, o reator possuía mangueiras acopladas que permitiam a medição do gás, a alimentação com o afluente e a retirada do fermentado efluente. No sistema aeróbio, por sua vez, tanto a entrada do afluente quanto a descarga do efluente eram realizadas por meio de bombeamento, o que possibilitou a automação do processo e garantiu a operação contínua dos ciclos ao longo de 24 horas por dia.

4.1.1 Reator Acidogênico

A etapa anaeróbia foi realizada no RA (**Figura 4**), onde ocorreram as fases hidrolítica e acidogênica. O reator foi construído em vidro, dotado de volume útil de 1,8 litros e operado em regime de mistura completa (CSTR) realizado por agitador magnético. Nas condições operacionais do RA, o TDH variou no intervalo de 2 e 4 dias, já a COV variou de 5,62 a 11,25 kg DQO.m⁻³.d⁻¹, temperatura 30±2 °C, alimentação semicontínua, isto é, uma vez ao dia, 5 dias na semana. A medição da produção quantitativa de gás ocorreu por deslocamento de fluido (NaOH 3%), através da gravimetria, onde uma garrafa invertida foi conectada ao reator através de uma mangueira cristal transparente (**Figura 3**), conforme Aquino et al. (2007).

Figura 4 - Reator Acidogênico



Fonte: a autora (2025)

A adição de solução NaOH (1N) foi necessária para controlar o pH do meio reacional entre 5,0 e 6,5, contribuindo para a eficiência da acidogênese e favorecendo a produção de ácidos graxos voláteis. Outro fator relevante para a otimização da fase acidogênica é a temperatura, pois sua elevação intensifica a concentração e a diversidade de produtos solúveis, o que pode levar à inibição da metanogênese devido ao acúmulo excessivo de AGVs.

A biomassa algal foi coletada a cada 15 dias em uma Lagoa de Alta Taxa (LAT) escala piloto (**Figura 5**), utilizada para pós-tratamento de esgoto sanitário de um reator UASB, localizado na Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) Mangueira, no município de Recife, Pernambuco. Durante a coleta, foi utilizada uma peneira de aço inoxidável com abertura de 0,250 mm para concentração da biomassa. Em seguida, a amostra foi lavada com água deionizada e armazenada a 4 °C, para posterior caracterização e utilização nos experimentos.

Figura 5 - Lagoa de Alta Taxa



Fonte: SILVA (2022)

A vinhaça foi coletada em uma usina de produção de açúcar e etanol a partir de cana-de-açúcar, localizada no município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco. Após a coleta, a vinhaça foi armazenada a -20 °C, até sua caracterização e utilização nos experimentos

O glicerol foi obtido na BERSO, localizada no Departamento de Energia Nuclear (DEN) da Universidade Federal de Pernambuco, campus Recife. Com o objetivo de reduzir impurezas e aumentar a concentração de glicerol na amostra, foi realizado um pré-tratamento químico para purificação, baseado em Hu et al., (2012). Nesse processo, ácido clorídrico concentrado foi adicionado à glicerina até que o pH do meio atingisse 3,0. Em seguida, a glicerina acidificada permaneceu em repouso por 24 horas em um funil de separação para a divisão das fases. Após essa etapa, a fração com maior teor de glicerol foi coletada e armazenada a 4 °C até sua caracterização e posterior utilização nos testes.

O RA teve seu período operacional dividido por fases (**Tabela 2**), onde diferenciaram-se entre si por seus substratos e parâmetros como tempo de detenção hidráulica (TDH) e carga orgânica volumétrica (COV). A vinhaça, além de substrato da primeira fase, também foi a responsável pela autoinoculação do reator.

Tabela 2 - Parâmetros operacionais do reator fermentador RA

Fase	Período (d)	Substrato	TDH (d)	COV (kgDQO.m ⁻³ .d ⁻¹)
I	0 – 71	Vinhaça	4	5,625
II	72 – 202	Vinhaça e Biomassa Algal	4	5,625
IIIA	203 – 240	Vinhaça e Biomassa Algal PT ¹	4	5,625
IIIB	241 – 309	Vinhaça e Biomassa Algal PT ¹	3	5,625
IIIC	310 – 373	Vinhaça e Biomassa Algal PT ¹	3	11,25
IID	374 – 446	Vinhaça e Biomassa Algal PT ¹	2	11,25
IVA	447 – 481	Glicerol e Biomassa Algal PT ¹	2	11,25
IVB	482 – 548	Glicerol e Biomassa Algal PT ¹	4	11,25

¹PT: Pré-tratamento. Fonte: a autora (2025)

Para o cálculo das condições operacionais, utilizou-se as **Equações (1) e (2)**.

$$TDH = \frac{V}{Q} \quad (1)$$

Onde:

V = Volume (m³);

Q = Vazão (m³.d⁻¹).

$$COV = \frac{Q}{V} \times S_0 \quad (2)$$

Onde:

Q = Vazão (m³.d⁻¹);

V = Volume (m³);

S₀ = Concentração inicial (kgDQO.m⁻³).

4.1.1.1 Pré tratamento térmico à biomassa algal

A partir da fase III, foi aplicado um pré-tratamento térmico à biomassa algal, de modo a aumentar a solubilidade do substrato e evitar limitações na hidrólise, com foco no estágio de acidogênese da digestão anaeróbia. O processo consistiu na introdução de 250 mL de biomassa microalgal em frascos de borossilicato de volume 500 mL. Em seguida, esses frascos foram submetidos à autoclave (Phoenix), com capacidade de 50 litros, pressão máxima de 3 kgf.cm⁻² a 120 °C por 40 minutos. Após o resfriamento até a temperatura ambiente, a biomassa microalgal pré-tratada foi caracterizada e armazenada a 4 °C. Essa condição proporcionou uma resposta mais eficiente para a solubilização da biomassa de microalgas durante a etapa de otimização do pré-tratamento.

4.1.2 Reator em Batelada Sequencial

A produção de microrganismos acumuladores de biopolímeros foi realizada em um reator em batelada sequencial (**Figura 6**), com volume útil de 2L, tempo de detenção hidráulica (TDH) de 2 dias, tempo de ciclo de 6 horas, COV de 1,25 gDQO.L⁻¹.d⁻¹, relação A/M de 0,313 gDQO.gSSV⁻¹.d⁻¹, operado em temperatura mesofílica. Cada batelada teve duração de 6 horas de ciclo, contém etapas de alimentação (19 minutos e 55 segundos), aeração (5 horas, 39 minutos e 55 segundos), sedimentação (20 minutos) e descarte do efluente (5 segundos).

Para alimentação do reator foi utilizada uma Bomba Dosadora Blackstone (BL20) de 20LPH (110V), Output: 18.3 L/H, 0.5bar; para o descarte do efluente foi utilizada uma Eletrobomba Universal da Brastemp Consul Drenagem 127V Original, Modelo:Bwl11a/Bwl09a; para introdução de bolhas de ar usou-se um Compressor de ar para aquário da Boyou SC7500 220V 2x3L/min com 2 Saídas; para manter a mistura homogênea do licor misto, utilizou-se um agitador magnético; e para controlar os equipamentos de alimentação, descarte e mistura, um Temporizador Digital Bivolt 10A 2200W (GET02A-BR).

A COV, o TDH e o ciclo foram determinados de modo a selecionar uma biomassa com bons níveis de armazenamento de PHA em condições de alternância entre abundância e escassez de fonte de carbono. No tocante ao COV, a maioria das pesquisas realizadas se foca em intervalos menores de COV, cerca de 0,3 a 1,2 gDQOL⁻¹d⁻¹. A influência da duração do ciclo raramente é analisada como uma variável isolada, pois geralmente é ajustada em conjunto

com a COV ou o TDH, mas usualmente é tida como de 1 a 8 horas, o valor de 6 horas adotado se dá por ciclos mais curtos resultaram em melhor desempenho de armazenamento (VALENTINO et al., 2014).

Figura 6 - Reator de produção de microrganismos acumuladores de PHA



Fonte: a autora (2025)

O reator foi inoculado com lodo ativado proveniente de indústria de cerveja, e seus substratos variam com a fase de seu ciclo operacional (**Tabela 3**).

Tabela 3 - Fases do ciclo operacional do RBS

Fase	Período	Substrato
I	0 - 28	Ácido Acético
II	29 - 44	Ácido Acético + AGV ¹
III	45 - 71	AGV ¹

¹AGV proveniente do reator acidogênico. Fonte: a autora (2025)

Na fase I foi utilizado como substrato uma solução de ácido acético glacial, e como complemento da solução, fonte de macronutrientes e micronutrientes (**Tabela 4**) foram utilizadas de acordo com Huang et al. (2015). Os macronutrientes foram adicionados ao sistema de forma individualizada. Já para os micronutrientes, uma solução concentrada era preparada previamente e mantida sob refrigeração a 4°C, dessa solução, 1 mL era dosado para cada litro de afluente.

Utilizou-se 4,51 mL de solução de ácido acético puro por ciclo para atender a COV de 2,5 gDQO.L⁻¹, considerando o procedimento a seguir, com os dados obtidos no rótulo do produto químico. Sabendo-se que em 1g ácido acético, tem-se 1,067 gDQO, 2,500 gDQO serão obtidos em 2,343 g ácido acético.L⁻¹. De modo a saber a quantidade de solução de ácido acético a ser, foi considerada uma pureza de 99% e densidade de 1,05 g.mL⁻¹, onde 4,686 g ácido acético equivalem a 4,733 g ou 4,51 mL de solução por ciclo.

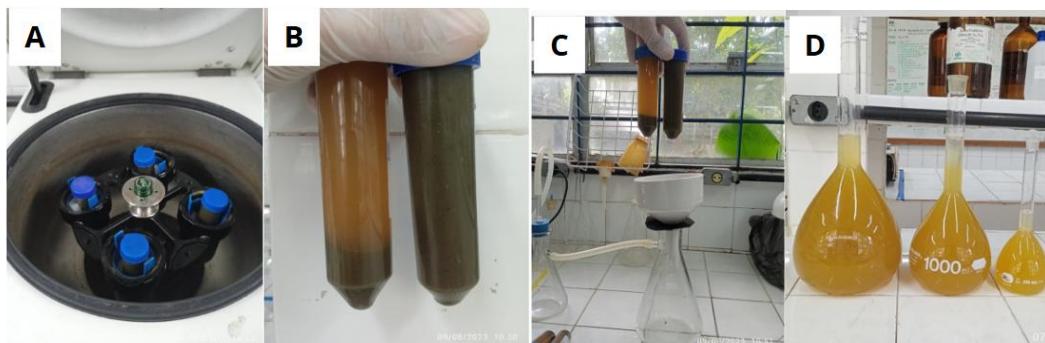
Tabela 4 - Composição dos macro e micronutrientes

Nutriente	Massa (g)
Micronutrientes	
Boro (Bo)	0,05
Zinco (Zn)	0,05
Cobre (Cu)	0,038
Manganês (Mn)	0,05
Molibdênio (Mo)	0,05
Alumínio (Al)	0,05
Cobalto (Co)	0,0635
Níquel (Ni)	0,05
Macronutrientes	
Cloreto de amônio (NH ₄ Cl)	0,2867
Fosfato monopotássico (KH ₂ PO ₄)	0,044
Cloreto de Cálcio (CaCl ₂)	0,0033
Sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO ₄ .7H ₂ O)	0,0033
Sulfato de ferro heptahidratado (FeSO ₄ .7H ₂ O)	0,0015

Fonte: Adaptado de Huang et al. (2015)

Na fase II a solução de ácido acético foi combinada a solução de AGV proveniente do reator acidogênico, e na fase III, foi utilizada apenas a solução de AGV, que antes de utilizado, foi filtrado em papel de filtro qualitativo e diluído em função da DQO do fermentado. e centrifugado a 3500 RPM por 5 minutos (**Figura 7**). Em ambas as fases o fermentado foi preparado de forma que a solução final obtivesse 2,5 gDQO/L.

Figura 7 - Preparo do fermentado para alimentar o RBS



A. Centrifugação; B. Pellet formado; C. Filtragem a vácuo; D. Diluição do afluente.

Fonte: a autora (2025)

4.2 Métodos analíticos

As análises físico-químicas realizadas para caracterizar os inóculos e substratos seguiram a metodologia Standard Methods (**Quadro 1**).

Quadro 1 - Parâmetros para caracterização dos inóculos e substratos

Parâmetros	Referências Metodológicas
pH	Eletrométrico (4500-H ⁺ B)
Ácidos Graxos Voláteis (mg.L ⁻¹)	SM 6610B
Demandânia Química de Oxigênio (gO ₂ .L ⁻¹)	Colorimétrico (5220D)
Nitrogênio total kjeldahl (mg.L ⁻¹)	Titulométrico (4500-NTK B)
Nitrogênio amoniacial (mg.L ⁻¹)	Titulométrico (4500-NH ₃ B)
Índice Volumétrico de Lodo (mL.g ⁻¹)	Gravimétrico (2710 D)
Série de sólidos (mg.L ⁻¹)	Gravimétrico (2540 B.; D.; E)
Microscopia	Microscopia Óptica

Fonte: a autora (2025)

O efluente fermentado do RA foi coletado para medição de pH e potencial de oxirredução (ORP) cinco vezes por semana e para análises de DQO, DQOs, sólidos totais, nitrogênio amoniacial, alcalinidade, AGVs três vezes por semana. A separação das amostras para análise microbiológica (extração de DNA) foi feita uma vez por semana. O monitoramento físico-químico foi realizado semanalmente (**Quadro 2**).

Quadro 2 – Parâmetros para monitoramento dos reatores

Parâmetros	Referências Metodológicas
pH	Eletrométrico (4500-H ⁺ B)
Ácidos Graxos Voláteis	SM 6610B
Demandas Químicas de Oxigênio (solúvel)	Colorimétrico (5220D)
Amônia (N-NH ₄ ⁺)	Titulométrico (4500-NH ₃ B)
Alcalinidade parcial	SM 2320B
Fosfato	SM 4500C
Oxigênio dissolvido (mg.L ⁻¹)	Eletroquímico (4500-O G)
Temperatura (°C)	Termometria (2550 B)
Índice Volumétrico de Lodo (mL.g ⁻¹)	Gravimétrico (2710 D)
Sólidos suspensos voláteis (mg.L ⁻¹)	Gravimétrico (2540 D)
Microscopia	Microscopia Óptica

Fonte: a autora (2025)

A quantificação de AGVs (ácidos graxos voláteis) foi realizada através de cromatografia. Foi utilizado um cromatógrafo gasoso com detecção por ionização de chama (GC-FID) da Agilent Technologies 7890A, com coluna J&W GC Column DB-WAXERT 122 7332; 260 °C; 30 m 250 µm x 0,25 µm. Os ácidos analisados e seus respectivos limites mínimos de detecção de concentração foram: acético ($4,99 \text{ mg.L}^{-1}$), propiônico ($4,74 \text{ mg.L}^{-1}$), isobutírico ($4,43 \text{ mg.L}^{-1}$), butírico ($4,6 \text{ mg.L}^{-1}$), isovalélico ($4,35 \text{ mg.L}^{-1}$), valérico ($4,61 \text{ mg.L}^{-1}$) e capróico ($4,43 \text{ mg.L}^{-1}$). As condições do método estão descritas na **Tabela 5**.

Tabela 5 - Condições cromatográficas para análise de AGVs

Parâmetros CG-FID	Valores
Modo de injeção	Split 1:10
Volume de injeção (µL)	2,0
Temperatura do injetor (°C)	350
Gás de arraste	H ₂
Fluxo na coluna (mL.min ⁻¹)	1,0
Temperatura do forno (°C)	200
Temperatura do detector (°C)	300
Tempo de corrida (min)	10,7

Fonte: a autora (2025)

O acompanhamento do RBS foi feito através de análises de monitoramento (**Quadro 2**) de um ciclo completo, a partir de Standard Methods, através de análises de pH ao início da fase de excesso de substrato, oxigênio dissolvido durante toda a fase de excesso de substrato e sólidos suspensos voláteis, índice volumétrico de lodo e microscopia ao final da fase de excesso de substrato, essas análises permitiram avaliar o desempenho do reator, monitorar a biomassa

microbiana e identificar possíveis ajustes operacionais necessários para o processo. Também foi realizada uma análise pontual do potencial de recuperação do biopolímero, especificamente o PHB, ao final da fase de festa. Análise microscópica em amostras do licor misto realizada em com microscópio ótico (marca Leica[®], modelo MDE), com ampliações de 10x, 40x e 100x, complementou o monitoramento do reator.

O monitoramento do reator em bateladas sequenciais (RBS) foi conduzido por meio da observação de um ciclo por dia. As medições de pH e temperatura foram realizadas no início de cada ciclo, especificamente no momento inicial da alimentação do reator, com o objetivo de registrar as condições iniciais do sistema. O monitoramento do oxigênio dissolvido (OD) teve seu início quando o substrato foi introduzido no reator, marcando o início da alimentação e fase de festa, e acompanhado até o final do período de festa, caracterizado pela redução nos níveis de oxigênio dissolvido, indicando a estabilização das condições aeróbias. Para as análises de SSV, IVL (IVL 30 para todas as análises) e microscopia, uma fração do licor misto foi coletada ao final do período de festa. Essa estratégia foi adotada para evitar interferências nas demais análises realizadas durante o ciclo do reator.

A microscopia óptica foi utilizada como uma ferramenta qualitativa na análise, de modo a observar e avaliar os micro-organismos presentes, identificar problemas no sistema, ajustar condições operacionais e otimizar o desempenho. Para isso, uma alíquota do efluente do RBS foi retirada e preparada para observação. Nesta análise são observadas a morfologia dos flocos de lodo, avaliando o tamanho, forma e estrutura dos flocos, que indica a eficiência da sedimentação. Também a população microbiana, como a presença de protozoários (ciliados, flagelados, amebas), que são bioindicadores que refletem a qualidade do tratamento; os rotíferos, que indica se o efluente está estabilizado; os filamentos, pois a presença excessiva de bactérias filamentosas pode causar problemas como dificuldade de sedimentação.

4.2.1 Determinação da concentração dos biopolímeros no lodo aeróbio

Para a análise de PHA, foi empregado um método de identificação e quantificação por cromatografia gasosa acoplada a um detector de ionização em chama (GC-FID) para três polihidroxialcanoatos: poli-hidroxi butirato (PHB), poli-hidroxi-valerato (PHV) e poli hidroxi-hexanoato (PHH); conforme Comeau et al. (1988) e Oehmen et al. (2005). A quantificação dos 3 PHAs por GC-FID é realizada após convertê-los a ésteres metílicos por meio de sua esterificação em meio de ácido sulfúrico (H_2SO_4) e metanol (MeOH) a alta temperatura.

Neste método a amostra dever ser colocada em tubo de Falcon de 50 mL e centrifugada para remover o máximo possível do excesso de água, após remover o excesso de água do lodo, liofilizá-lo no concentrador de amostras e transferir $0,0300 \pm 0,0001$ g dos sólidos secos para um tubo de DQO. Após a liofilização e transferência do lodo para o tubo de DQO, é adicionado a este 2 mL de solução composta por metanol, 10% de H₂SO₄, 100 mg/L de ácido benzoico, 2 mL de clorofórmio; e então, deve-se colocar os frascos fechados no bloco digestor a temperatura de 1000°C por 3 horas e 30 minutos. Finalizada a digestão e com os frascos já em temperatura ambiente, deve-se adicionar 2 mL de água com resistividade de 18 MΩ.cm, agitar o frasco de DQO, em vórtex, por cerca de 5 minutos, aguardar a separação das fases orgânica e inorgânica, e transferir a fase orgânica (clorofórmio) para vials próprios para amostrador automático de cromatógrafo, que deve ser previamente filtrada em filtro com porosidade de 0,45 µm.

Após estes procedimentos, os vials são inseridos em um cromatógrafo a gás com injetor split acoplado a detector de ionização de chama, da Agilent Technologies 7890A, com coluna J&W GC Column DB-WAXERT 122 7332; 260°C; 30 m 250 µm x 0,25 µm. Na Tabela 6 são apresentados os valores dos parâmetros cromatográficos para a separação do PHB, PHV e PHH.

Tabela 6 - Condições cromatográficas para análise de PHAs

Parâmetros CG-FID	Valores
Modo de injeção	Split 15:1
Volume de injeção (µL)	1,0
Temperatura do injetor (°C)	300
Gás de arraste	H ₂
Fluxo na coluna (mL.min ⁻¹)	1,0
Temperatura do forno (°C)	210
Temperatura do detector (°C)	300

Fonte: a autora (2025)

O teor de PHA, descrito na **Equação (3)**, do lodo foi calculado como uma porcentagem de sólidos suspensos voláteis (SSV) com base em massa, onde SSV inclui biomassa ativa e PHA, segundo (ALBUQUERQUE et al., 2007).

$$PHA (\%) = \frac{PHA}{SSV} \times 100 \quad (3)$$

Onde:

PHA = Quantidade em massa de polihidroxialcanoato (mg);

SSV = Sólidos Suspensos Voláteis (mg).

Para a análise de PHA, as coletas foram realizadas em datas específicas, selecionadas de acordo com as variações na fonte de alimentação do RBS, e todas ocorreram ao final da fase de abundância, conforme descrito por Valentino et al. (2013). Para preservar as amostras até a análise, adicionaram-se cinco gotas de formaldeído a 37% para cada 15 mL de amostra, as quais foram armazenadas sob refrigeração a 4 °C.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo, serão apresentadas as análises e discussões dos resultados obtidos neste estudo.

5.1 Caracterização dos substratos e inóculos

5.1.1 Caracterização do inóculo do reator em batelada sequencial

As características do inóculo utilizado neste estudo em termos de sólidos totais, sólidos suspensos, DQO, pH e índice volumétrico de lodo (IVL), são encontradas na **Tabela 7**.

A caracterização do inóculo utilizado revelou sólidos suspensos totais de 2.866,67 mg.L⁻¹, 70% da fração total, indicando biomassa ativa suficiente para a degradação de substratos. O total de sólidos (4.226,67 mg.L⁻¹) apresentou aproximadamente 52% de sólidos voláteis, refletindo equilíbrio entre matéria orgânica e inorgânica. O índice volumétrico do lodo (282,56 mL.g⁻¹) reflete uma razoável capacidade de formação de flocos e sedimentação eficiente, compatível com operação estável do reator.

Tabela 7 - Caracterização do lodo ativado

Parâmetros	Valor
Sólidos suspensos totais (g SST/L)	2,866,67
Sólidos suspensos fixos (mg SSF/L)	861,11
Sólidos suspensos voláteis (mg SSV/L)	2005,56
SSV/SST (%)	69,96%
Sólidos totais (mg ST/L)	4226,67
Sólidos totais fixos (mg STF/L)	2010,00
Sólidos totais voláteis (mg STV/L)	2216,67
SV/ST (%)	52,44%
DQO (mg O ₂ .L ⁻¹)	2333,649
DQO solúvel (mg O ₂ .L ⁻¹)	257,735
Potencial hidrogeniônico (pH)	7,99
Índice volumétrico do lodo (mL/g)	282,560

Fonte: a autora (2025)

Foi feita uma microscopia do lodo durante sua caracterização e, durante a análise, foram identificados organismos metazoários significativos, como a rotaria e nematoides (**Figura 8**), cuja presença é característica de sistemas com elevada idade do lodo. Os rotíferos são bioindicadores de sistemas biologicamente estáveis e maduros, normalmente associados a tempos de retenção de lodo superiores a 15 dias. Estes organismos contribuem para a

clarificação do efluente através da predação de partículas finas e bactérias dispersas, de modo a melhorar as características de sedimentação do lodo ativado.

Paralelamente, a presença de nematoides reforça a condição de sistema com condições favoráveis e alto desempenho do sistema (HOFFMAN, 2001). Estes organismos atuam como consumidores secundários na cadeia trófica do lodo, alimentando-se de bactérias, protozoários e material orgânico particulado. A coexistência destes dois grupos de metazoários indica um ambiente operacional com baixa relação alimento/microrganismos (F/M) e tempo de retenção celular prolongado, condições típicas de sistemas bem estabilizados.

Estas observações microscópicas estão em perfeita concordância com os parâmetros operacionais monitorados, particularmente com o valor elevado de Índice Volumétrico do Lodo registrado na caracterização, de $282,56 \text{ mL.g}^{-1}$.

Figura 8 - Rotaria e nematoide no lodo ativado



a. Rotaria (200x); b. Nematoide (200x). Fonte: a autora (2025)

5.1.2 Caracterização dos substratos do reator acidogênico

A caracterização dos substratos foi realizada por meio de análises físico-químicas (**Tabela 8**), onde o desvio padrão reflete a variabilidade observada entre as triplicatas de cada amostra. Observou-se que o pH da biomassa algal, tanto na forma in natura quanto após o pré-tratamento, manteve-se próximo da neutralidade, condição favorável ao processo de digestão anaeróbia. Em contrapartida, a vinhaça e a glicerina apresentaram caráter mais ácido, demandando ajuste prévio de alcalinidade por meio da adição de bicarbonato de sódio antes de serem empregadas como substratos no reator. Ressalta-se ainda que o elevado teor de carbono da vinhaça resultou em uma relação C/N superior à observada para os demais substratos avaliados. A relação C/N da biomassa algal apresentou valores inferiores à faixa considerada ideal para processos de digestão anaeróbia — situada entre 20 e 30, conforme indicado por Vázquez-Fernández et al. (2022). Essa faixa é importante para garantir o fornecimento

adequado de nutrientes e minimizar riscos de inibição do processo. A elevada concentração de Nitrogênio Total Kjeldahl (NTK) observada está diretamente associada à própria composição das microalgas, caracterizadas por um elevado teor proteico.

Tabela 8 - Caracterização da vinhaça, biomassa algal e glicerina

Parâmetros	Biomassa algal	Biomassa algal PT	Vinhaça	Glicerina
pH	7,3±0,3	7,6±0,1	3,7±0,0	3,0±0,0
Teor de glicerol (% m/m)	NR ²	NR ²	NR ²	55
DQO total (gO ₂ .L ⁻¹)	46,0±13,5	52,0±23,1	27,0±2,5	1231±4,1
Nitrogênio total kjeldahl (mg.L ⁻¹)	1380±454	1138±214	239±123	ND ³
Nitrogênio amoniacal (mg.L ⁻¹)	100±2	NR ²	37±1	31198±1621
C/N ¹	14,2	21,5	48,8	NR ²
Sólidos totais (mg.L ⁻¹)	33,4±27,4	26,7±3,6	57,6±34,3	482,6±30,7
Sólidos voláteis (mg.L ⁻¹)	27,1±22,8	19,4±2,4	10,3±4,2	376,9±26,6
SV/ST (%)	81,1	72,7	17,9	78,1

¹C/N: COT/NTK. ²NR: Não Realizada. ³ND: Não Detectável. Fonte: a autora (2025)

No glicerol residual, realizou-se a análise do teor de glicerol, que apresentou valor de 40%. Sendo assim, foi aplicado um pré-tratamento para elevar este percentual, resultando em um aumento para 55%. Esse valor relativamente baixo pode estar relacionado às características da matéria-prima utilizada na produção do biodiesel, especialmente ao tipo de triglicerídeo presente no óleo vegetal, o que pode originar um glicerol bruto com presença significativa de água, sais, metanol e outros compostos orgânicos. De acordo com Quispe et al., (2013), o baixo percentual obtido pode estar associado às características da matéria-prima utilizada na produção do biodiesel, especialmente ao tipo de triglicerídeo presente no óleo vegetal, que tende a originar um glicerol bruto com elevada quantidade de impurezas, como água, sais, metanol e outros compostos orgânicos.

Observam-se, ainda, elevadas concentrações de DQO e, além de uma baixa concentração de NTK, possivelmente atribuídas ao conteúdo orgânico da glicerina.

5.2 Monitoramento da produção de AGV no RA

A Fase I (0–71 dias) utilizou exclusivamente vinhaça como substrato, com TDH de 4 dias e COV de 5,625 kgDQO.m⁻³.d⁻¹, e teve como resultado uma produção média de 1468,98 ± 971,71 mgAGVs.L⁻¹, com predominância do HAc (1030,70 mgAGVs.L⁻¹). Esta fase

apresentou inicialmente um pH baixo (média de 4,8), devido às características ácidas da vinhaça.

Na Fase II (72–202 dias), a adição de biomassa algal sem pré-tratamento ao substrato de vinhaça manteve o TDH em 4 dias e a mesma COV, porém a produção média de AGVs aumentou para $4777,29 \pm 1182,07$ mgAGVs·L⁻¹, com o HBut (1852,56 mgAGVs·L⁻¹) tornando-se o principal produto. Após a inserção da biomassa algal com caráter mais neutro, o pH apresentou leve aumento (média de 5,8) e manteve-se constante até sofrer outro aumento na fase seguinte.

A Fase III_A (203–240 dias, pH médio de 6,3) marcou a implementação do pré-tratamento térmico da biomassa algal, com o TDH e a COV inalterados. Nesse período, o perfil de ácidos graxos voláteis (AGVs) apresentou destaque para o ácido valérico (HVa), que atingiu 1.386,36 mgAGVs·L⁻¹, inserido em uma produção média total de $3.782,84 \pm 486,55$ mgAGVs·L⁻¹.

Na Fase III_B (241–309 dias, pH médio 5,1), a redução do TDH para 3 dias resultou em um aumento expressivo da produção média de AGVs, devido à alta cinética de hidrólise e conversão de compostos simples em AGVs, chegando a $5.000,52 \pm 827,48$ mgAGVs·L⁻¹. Nesse estágio, o ácido acético (HAc) retomou a predominância na composição, com concentração de 1.437,78 mgAGVs·L⁻¹. Esse melhor desempenho pode ser atribuído à composição química da vinhaça, já que a mesma tem presença de compostos biodegradáveis, como açúcares e álcoois, que demandam pouco tempo para serem convertidos em ácidos graxos voláteis (CHRISTOFOLLETTI et al., 2013).

A Fase III_C (310–373 dias, pH médio 5,5) foi caracterizada pelo incremento da COV para $11,25$ kgDQO·m⁻³·d⁻¹, o que levou à máxima produção observada em todo o experimento, de $13.003,08 \pm 1.599,47$ mgAGVs·L⁻¹. O HAc apresentou-se como principal componente, com 4.461,11 mgAGVs·L⁻¹. Na literatura, demonstra-se que valores baixos de COV favorecem a fase metanogênica da digestão anaeróbia, enquanto altas cargas promovem a acumulação de AGVs, resultando em inibição dos microrganismos metanogênicos (BOLZONELLA et al., 2018).

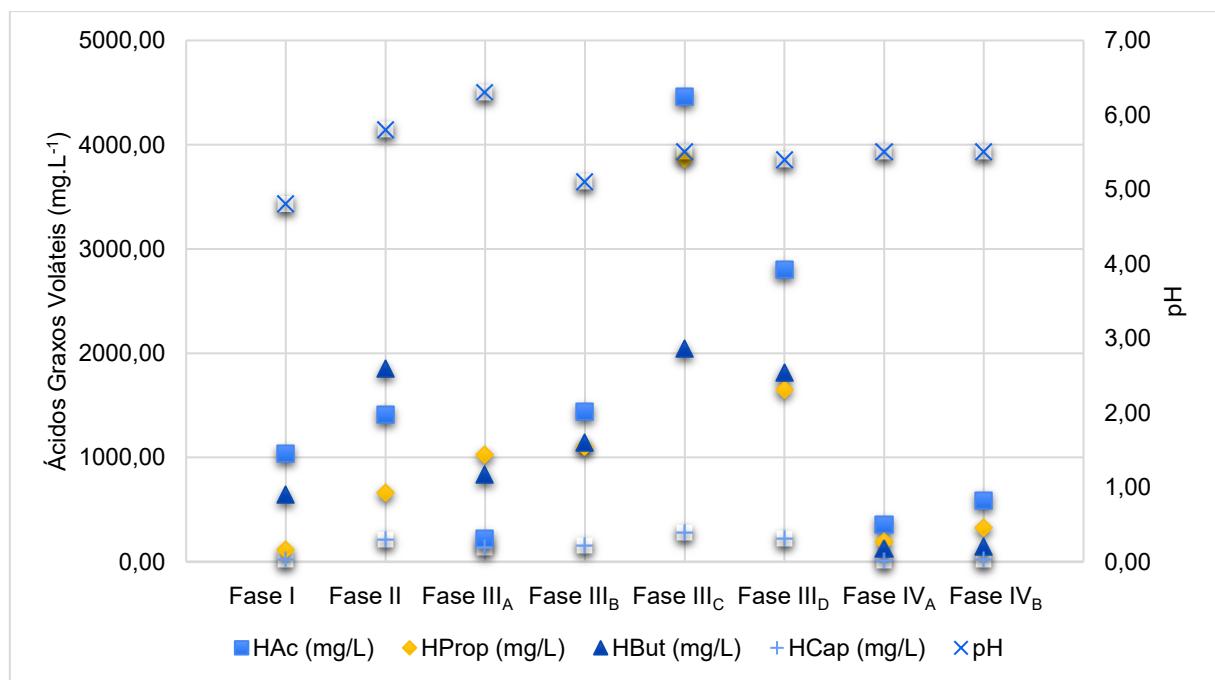
Na Fase III_D (374–446 dias, pH médio 5,4), a redução do TDH para 2 dias, mantendo-se a mesma COV, provocou queda na produção média de AGVs para $7.891,43 \pm 3.144,12$ mgAGVs·L⁻¹, embora o HAc permanecesse como ácido predominante (2.803,09 mgAGVs·L⁻¹). A diminuição do TDH refletiu em um tempo reacional insuficiente para

conversão do cosubstrato em AGV, observado na queda da produção média e na maior variabilidade entre os ácidos produzidos, como observa-se na **Figura 9**.

As Fases IV_A (447–481 dias) e IV_B (482–548 dias) representaram a transição para o uso de glicerol como substrato complementar à biomassa algal pré-tratada. Na Fase IV_A, com TDH de 2 dias e COV de 11,25 kgDQO·m⁻³·d⁻¹, a produção de AGVs reduziu-se drasticamente para $824,91 \pm 601,09$ mgAGVs·L⁻¹, com predominância de HAc (352,42 mgAGVs·L⁻¹), o que sugere impacto negativo da mudança de substrato. Na Fase IV_B, o aumento do TDH para 4 dias, proporcionou recuperação parcial, com produção média de $1.259,98 \pm 511,23$ mgAGVs·L⁻¹ e HAc dominante (590,76 mgAGVs·L⁻¹). No entanto, os valores não retornaram aos patamares anteriores, indicando possível inibição metabólica ou inadequação do glicerol como fonte principal de carbono. O pH médio da Fase IV foi de 5,5, compatível com condições acidogênicas.

Os valores médios de AGVs e pH correspondentes às fases descritas estão sintetizados na **Figura 9**.

Figura 9 - Produção de AGV's e monitoramento de pH por fase do RA



Fonte: a autora (2025)

No geral os ácidos acético, propiônico e butírico são os principais produtos quando a biomassa de microalgas é submetida à digestão anaeróbia (MAGDALENA et al., 2019).

O pH do reator de fermentação acidogênica afeta diretamente a composição dos ácidos graxos voláteis gerados, influenciando consequentemente a estrutura do biopolímero sintetizado. Dessa forma, é possível controlar as características do polímero produzido por meio do ajuste do pH operacional durante o processo fermentativo (ALBUQUERQUE et al., 2007). Nota-se essa influência no ajuste quando se analisa a relação entre o pH do reator e a produção dos ácidos graxos voláteis.

Observou-se que em condições mais ácidas (pH entre 4,8 e 5,5), houve dominância do HAc na composição dos AGVs. À medida que o pH foi elevado para 5,8, verificou-se uma mudança no perfil de produção, com predomínio do HBut. Por fim, em valores de pH mais elevados (a partir de 6,3), o HVa passou a dominar a composição dos ácidos graxos voláteis produzidos. Essa variação demonstra claramente como o controle do pH, paralelo aos substratos usados na codigestão, podem ser utilizados para direcionar seletivamente a produção de diferentes AGVs no sistema.

Conforme apontado por (DAHIYA et al., 2023), diferentes agentes tamponantes ou neutralizantes influenciam diretamente a formação de ácidos específicos e reforçam a capacidade de tamponamento. No caso do NaOH, utilizado para manter o pH do fermentador dentro das condições acidogênicas, com o aumento do pH devido a inserção de biomassa algal como substrato, há um favorecimento na produção de ácido acético.

5.3 Monitoramento das condições ambientais do RBS e produção de PHA

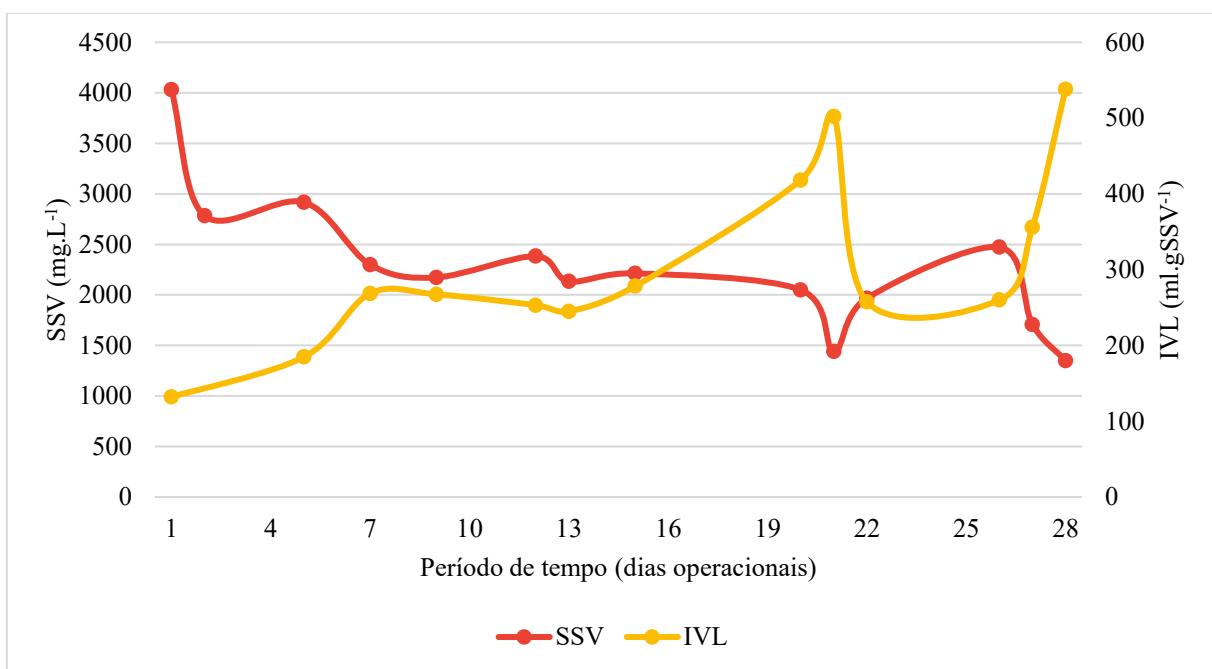
O estudo da produção de PHA foi dividido em três fases distintas, definidas conforme o tipo de substrato utilizado para alimentação do RBS em cada etapa. Essa divisão permitiu acompanhar e analisar as variações no desempenho do sistema e nas características microbiológicas em resposta às diferentes fontes de alimentação aplicadas ao longo do processo.

5.3.1 FASE I – Operação com alimentação exclusiva de ácido acético

Durante a fase I, com 28 dias de duração, houve períodos de idade do lodo muito alta, chegando a um IVL de 538,14 mL.g⁻¹ no fim deste período (**Figura 10**), que aliado a um decaimento da carga orgânica do reator, que apresentou concentrações elevadas no início do experimento, e reduziu progressivamente ao longo da fase.

Valores elevados de IVL 30 indicam piora na sedimentabilidade da biomassa, podendo refletir alterações na morfologia e na composição microbiana dos flocos. Picos acentuados desse índice estão frequentemente associados à proliferação excessiva de bactérias filamentosas, as quais aumentam o volume aparente dos flocos e dificultam sua compactação no decantador secundário. Essa condição, conhecida como lodo intumescido compromete a eficiência da separação entre a fração sólida e líquida, e pode resultar na perda de sólidos no efluente.

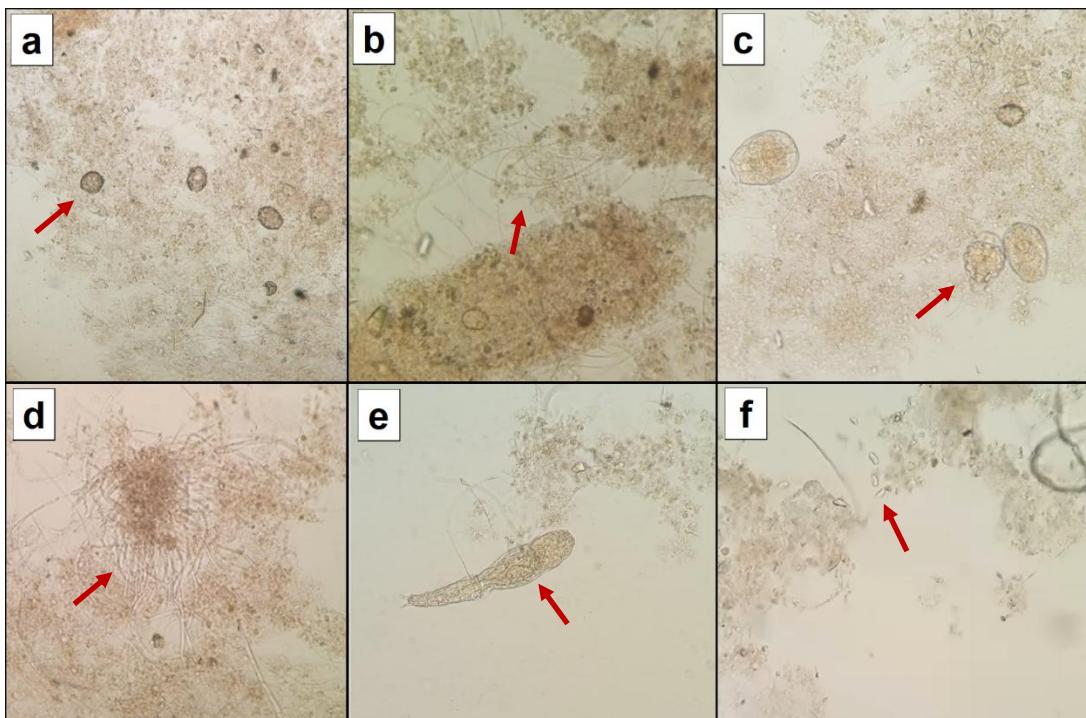
Figura 10 - Sólidos Suspensos Voláteis: FASE I (RBS)



Fonte: a autora (2025)

A comunidade microbiana desenvolvida sob essas condições apresentou uma composição característica, com predominância de organismos indicadores de estresse operacional: Cistos de Vorticella (formas de resistência), bactérias filamentosas do gênero Beggiatoa, protozoários testáceos (*Euglypha* sp. e *Arcella*), rotíferos (*Rotaria*) e bactérias filamentares (*Sphaerotilus*), conforme ilustrado na Figura 11. Comunidade típica de sistemas com elevado tempo de retenção celular e limitações na transferência de oxigênio.

Figura 11 - Microorganismos encontrados na Fase I



a. Cisto de *Vorticella* (200x); b. *Beggiatoa* (200x); c. *Arcella* (200x); d. *Sphaerotilus* (200x); e. *Rotatoria sp* (200x); f. *Euglypha* (200x). Fonte: a autora (2025)

Os picos observados nos valores de IVL indicam momentos de comprometimento da sedimentabilidade da biomassa, diretamente relacionados à intensificação do crescimento de bactérias filamentosas (**Figura 11 - b e d**), o que compromete a resistência dos flocos às forças de cisalhamento geradas pela aeração, originando estruturas menores, frágeis e de difícil sedimentação. Quando há um equilíbrio entre bactérias filamentosas e formadoras de flocos no lodo biológico, a separação da biomassa em relação ao efluente ocorre de maneira eficiente.

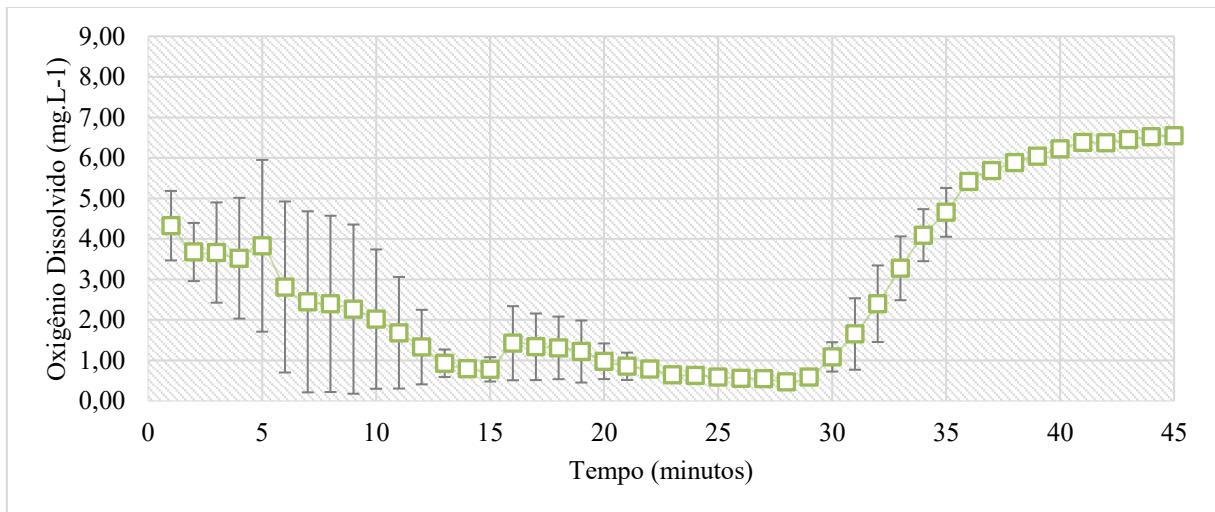
Portanto, a correlação entre os picos de IVL e a proliferação filamentosa evidencia a influência direta da composição microbiana na eficiência do processo de separação de sólidos e líquidos, e na estabilidade operacional do sistema.

Observou-se uma redução gradual nos valores de oxigênio dissolvido (**Figura 12**), indicando atividade microbiana intensa no consumo do ácido acético como fonte de carbono. Chegando ao OD mínimo ($0,47 \text{ mg.L}^{-1}$) em 28 minutos, essa diminuição reflete o metabolismo ativo das bactérias durante a fase de alimentação.

Posteriormente, com o esgotamento do substrato, os microrganismos passaram a mobilizar os estoques intracelulares de PHA como fonte energética, resultando em uma recuperação progressiva dos níveis de oxigênio dissolvido. Esse comportamento cíclico de consumo e recuperação do OD foi também observado nas Fases II e III, demonstrando um

padrão metabólico característico do sistema sob as condições operacionais estabelecidas. As barras de desvio refletem o comportamento da curva de OD, em resposta as condições operacionais, ao longo da fase estudada.

Figura 12 - Oxigênio Dissolvido ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) - Fase I



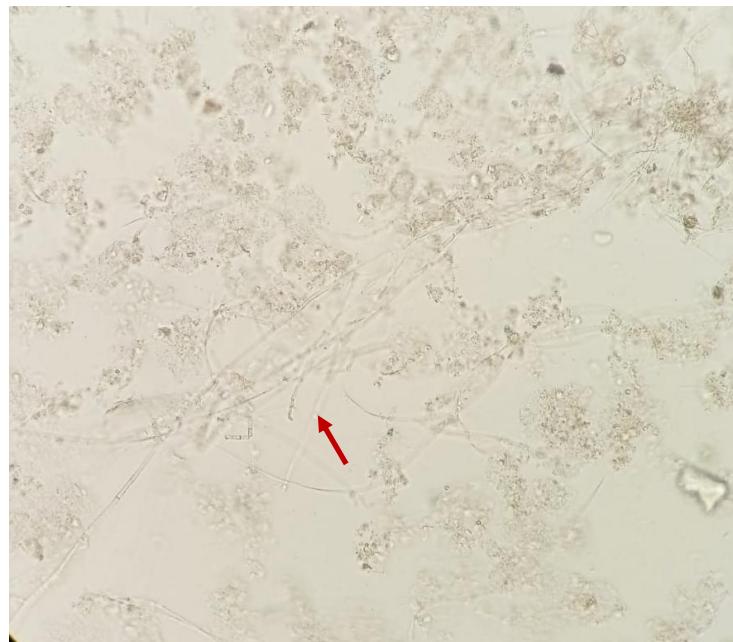
Fonte: a autora (2025)

A coleta para análise de PHA nesta fase foi realizada no dia operacional 28. Nessa ocasião, registrou-se teor de PHA de 8,97 mg, com $1.350,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de sólidos suspensos voláteis, com um teor de 0,33% de PHA, dos quais 0,28% correspondiam a PHB, e IVL de 538,1 $\text{mL}\cdot\text{gSSV}^{-1}$.

5.3.2 FASE II – Transição de alimentação: ácido acético para fermentado do RA

Durante a fase II, com 16 dias de duração, tendo início no dia operacional 29 e término no dia operacional 44. O reator experimentou um período crítico caracterizado por déficit de biomassa por consequência da proliferação de bactérias filamentosas (Figura 13). Observa-se claramente a condição de lodo intumescido, caracterizada pela predominância de flocos pequenos e formação média de fios com moderado desenvolvimento de estruturas filamentares. A presença dos filamentos em densidade moderada, visível na microscopia, acarreta em problemas de sedimentação observados durante esta fase operacional (Figura 14).

Figura 13 - Microrganismos filamentosos



Magnitude: 200x. Fonte: a autora (2025)

A imagem à esquerda mostra o reator após 15 minutos de sedimentação, enquanto a imagem à direita permite comparar processo, após o mesmo tempo de sedimentação, conforme evidenciado na análise na proveta. A condição foi resolvida através de ajustes na aeração.

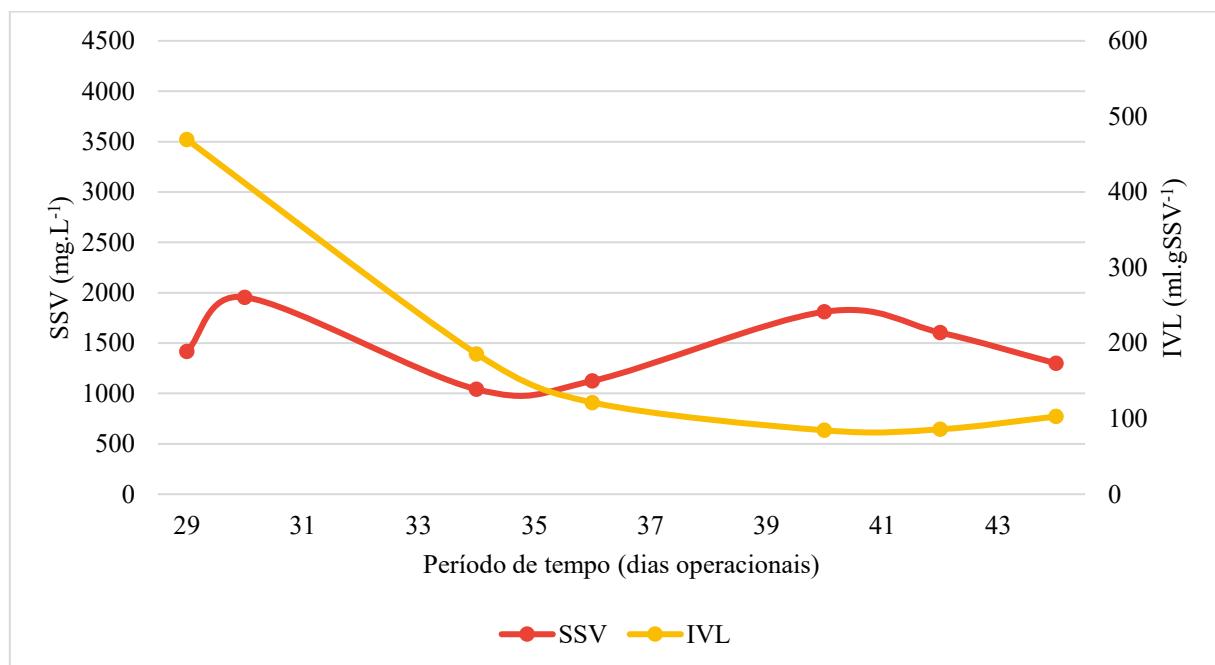
Figura 14 - Antes e depois déficit de biomassa e proliferação de bactérias filamentosas



Fonte: a autora (2025)

Ainda com a intensificação do crescimento de bactérias filamentosas, evidenciada pelo aumento do IVL, que atingiu $470 \text{ mL}\cdot\text{gSSV}^{-1}$, resultou em expressiva redução na concentração de sólidos suspensos voláteis, passando de $1955,56 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para $1041,67 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (**Figura 15**). A perda excessiva de biomassa representa um sério problema para a estabilidade do sistema de tratamento, pois compromete diretamente sua eficiência, já que quando a concentração de biomassa ativa cai abaixo dos níveis mínimos necessários, ocorre uma deterioração simultânea dos processos de nitrificação e das atividades heterotróficas, como observado por Hoffman (2004).

Figura 15 - Sólidos Suspensos Voláteis: FASE II (RBS)



Fonte: a autora (2025)

A redução nos sólidos suspensos voláteis em conjunto com uma elevada idade do lodo propiciou o desenvolvimento de Aeolosomas (**Figura 16**) – este que também aparece por um excesso de OD – e a predominância de Euglypha. Sendo assim, a presença do Aeolosoma não é desejável pois seu aparecimento é sinal de que o processo está desequilibrado, visto que ele se desenvolve quando há uma alta idade do lodo aliada a uma grande quantidade de matéria orgânica que não foi consumida pelas bactérias do lodo.

Segundo Hoffman et al. (2001), os sistemas de lodo ativado em condições normais de operação apresentam naturalmente microorganismos filamentosos em sua composição microbiana, e esses organismos desempenham um papel estrutural fundamental, atuando como arcabouço para a formação dos flocos biológicos. No entanto, quando presentes em excesso, os

filamentos comprometem significativamente a sedimentabilidade da biomassa, uma vez que sua estrutura alongada impede a compactação adequada dos flocos, resultando em arraste de material particulado para o efluente final.

Figura 16 - Microrganismo Aeolosoma observado em amostra de lodo floculento

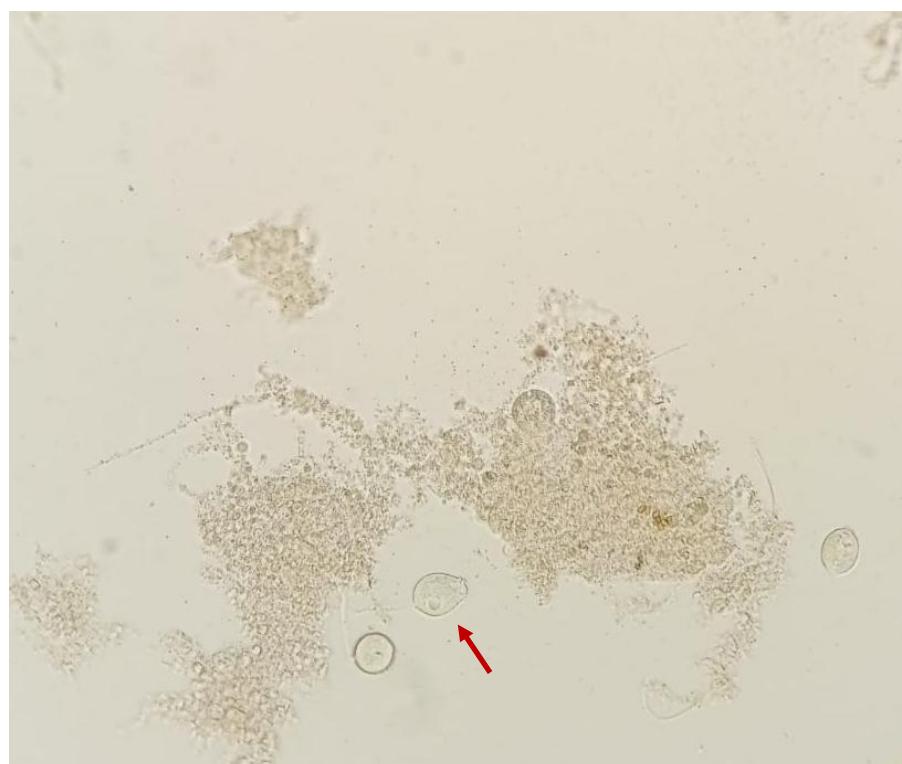


Magnitude: 200x. Fonte: a autora (2025)

O surgimento de Vorticella (**Figura 17**) está diretamente relacionado às condições de lodo intumescido, uma vez que este protozoário apresenta maior tolerância a ambientes com baixos níveis de oxigênio dissolvido.

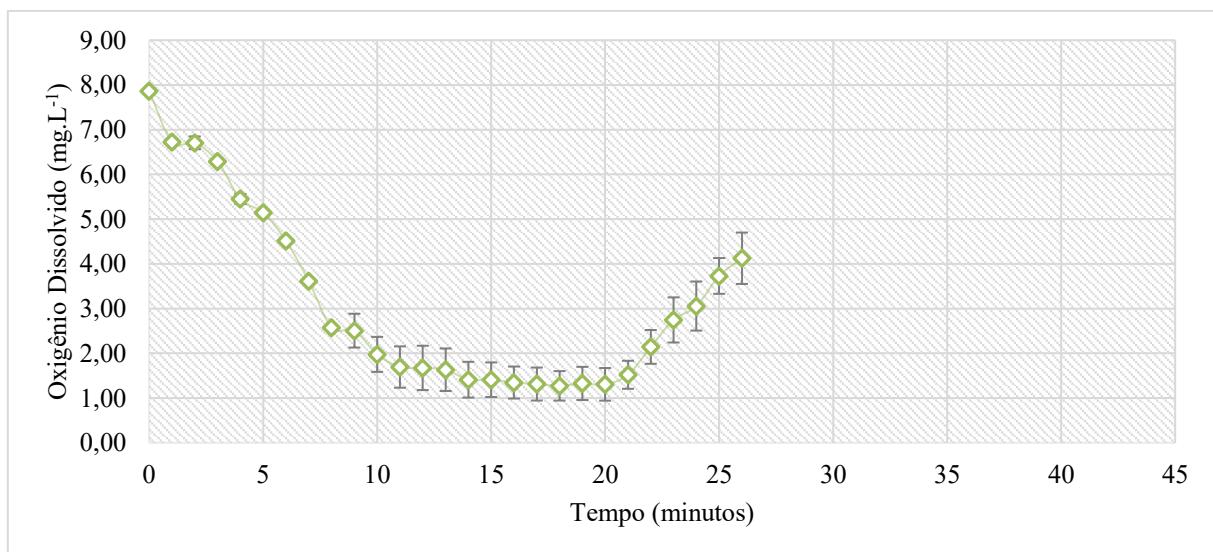
Desta fase operacional, registrou-se um valor mínimo de oxigênio dissolvido de 1,27 mg.L⁻¹ após apenas 18 minutos de processo (**Figura 18**) – um incremento de 35,7% na velocidade de consumo em comparação com a fase anterior. Esta redução significativa no tempo necessário para atingir o pico de demanda de oxigênio evidencia uma maior eficiência metabólica e adaptação ao regime de bateladas sequenciais, pois a biomassa demonstrou uma capacidade maior de consumo do substrato disponível, e que houve uma seleção de populações bacterianas com maior afinidade pelo ácido acético como fonte de carbono.

Figura 17 - Surgimento da Vorticella



Magnitude: 200x. Fonte: a autora (2025)

Figura 18 - Oxigênio Dissolvido ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) - Fase II

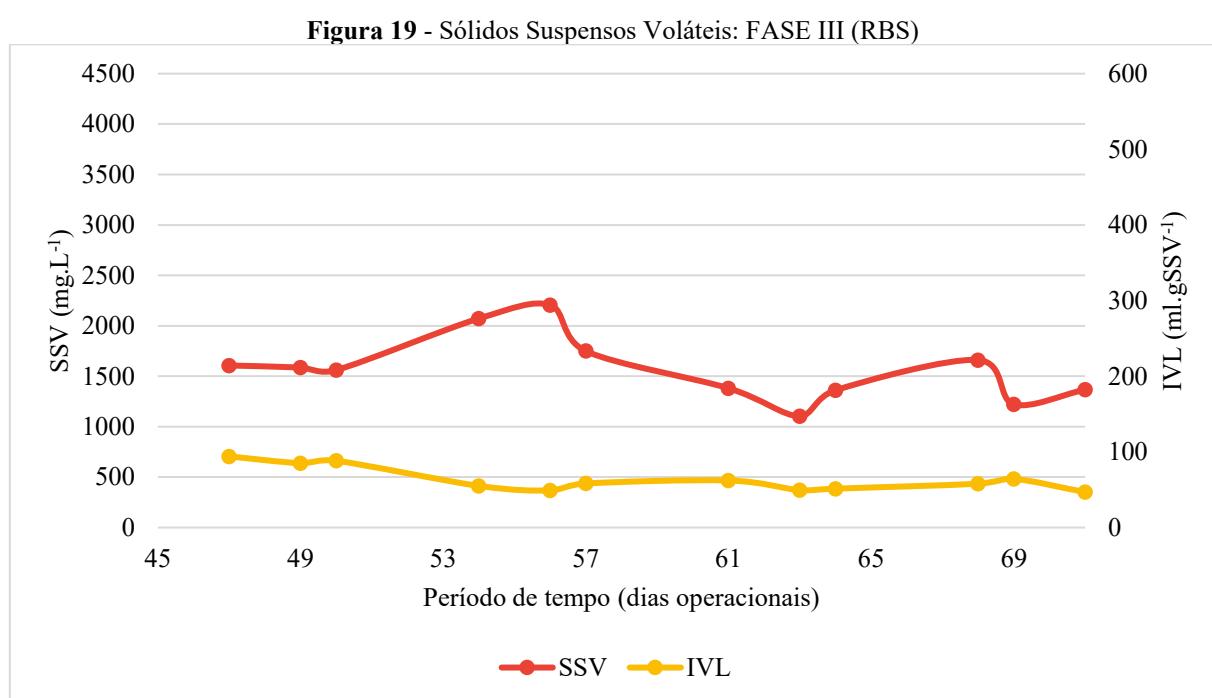


Fonte: a autora (2025)

Nesta fase, no dia operacional 42, retirou-se uma amostra para documentar a fase de transição da alimentação, que passou de ácido acético puro para o fermentado proveniente do reator RA. Nesse momento, o teor de PHA foi de 6,71 mg, com $1.604,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de sólidos suspensos voláteis, teor de 0,21% de PHA (0,18% de PHB) e IVL de $85,9 \text{ mL}\cdot\text{gSSV}^{-1}$.

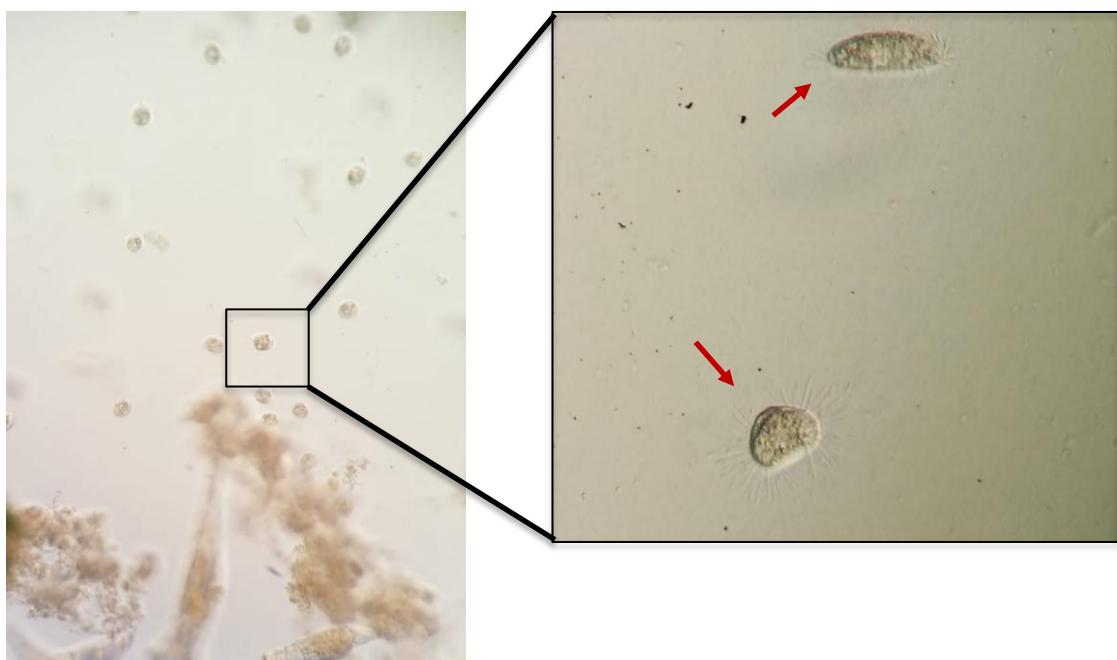
5.3.3 FASE III – Operação com alimentação exclusiva de fermentado do RA

As variações observadas nos valores de sólidos suspensos voláteis (Figura 19) indicam que o acúmulo de biomassa não se manteve de forma linear ou constante, apresentando oscilações ao longo do período monitorado. Essas flutuações estão associadas a alterações nas condições operacionais ou à própria dinâmica microbiológica do sistema, o que impacta diretamente a fração de biomassa ativa presente no meio reacional.



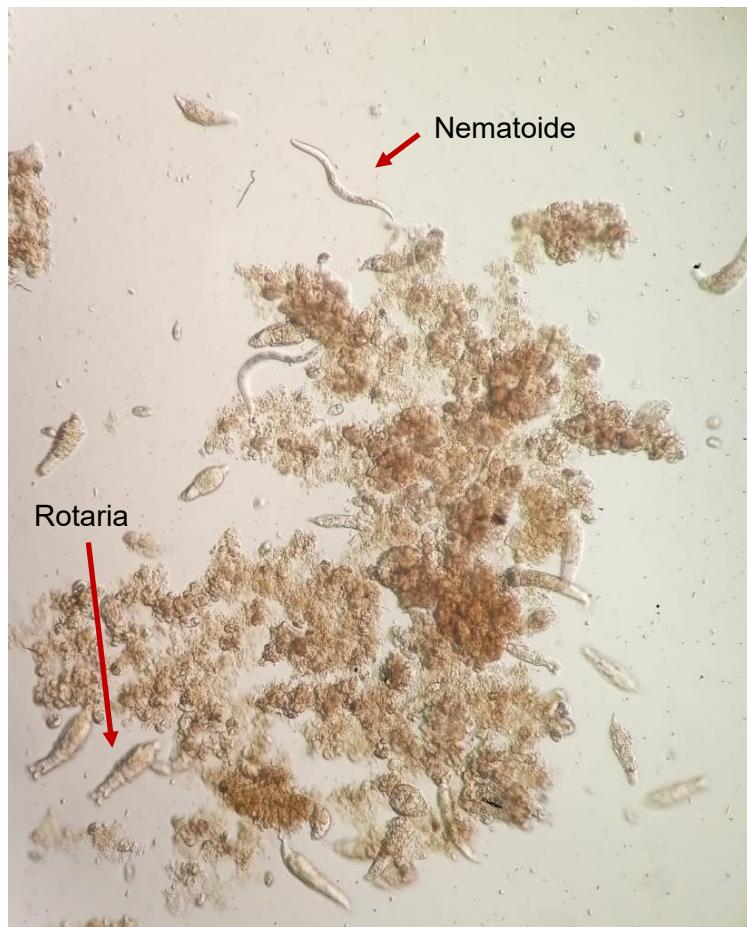
Esta fase evidenciou um sistema em avançado estágio de maturação e complexidade na estrutura microbiológica. A comunidade foi dominada por ciliados, particularmente Euplotes (Figura 20) – organismos especializados na predação de flocos – e Rotaria, acompanhados pelo surgimento de nematoides (Figura 21), que não eram vistos desde a caracterização da biomassa

Figura 20 - Euplates



Fonte: a autora (2025)

Figura 21 - Alta incidência de rotaria e surgimento de nematoides



Fonte: a autora (2025)

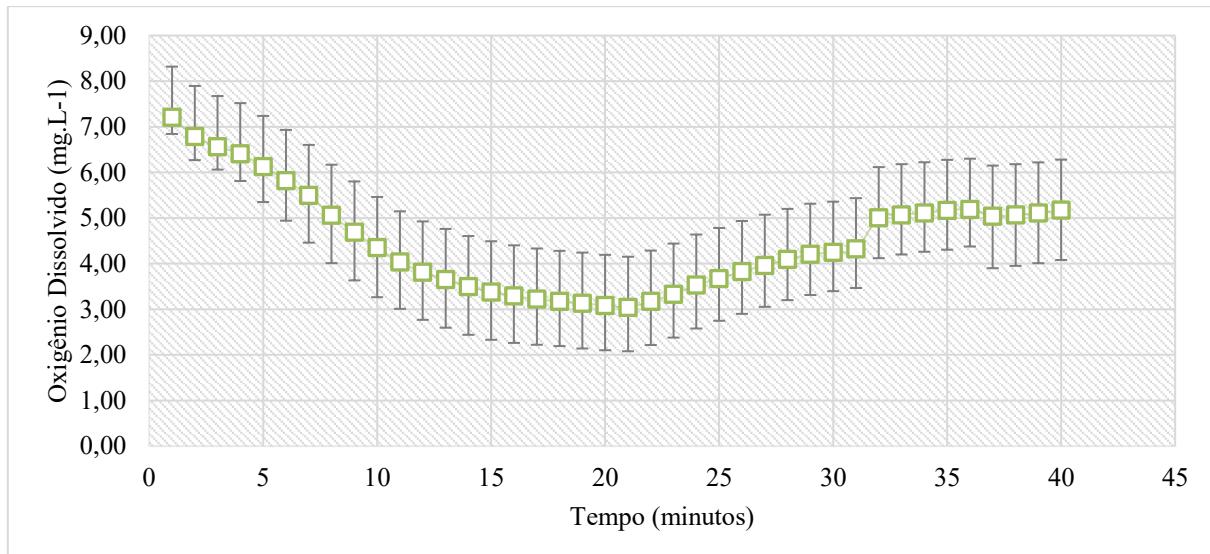
A presença destes microrganismos é um ótimo indicador de que o sistema atingiu seu ponto ótimo de operação. Euplotes, sendo ciliados especializados na predação de flocos, indicam a formação de biomassa bem estruturada e sedimentável, característica de sistemas com idade de lodo adequada e condições aeróbias estáveis. Sua dominância sugere um ambiente com excelente formação de flocos e eficiente remoção de matéria orgânica particulada.

Rotaria, por sua vez, são bioindicadores clássicos de sistemas com baixa carga orgânica e efluente de boa qualidade, sendo frequentemente associados a processos avançados de nitrificação. Sua presença em abundância corrobora a estabilidade do sistema e a eficiência no tratamento.

Os nematoides, embora menos numerosos, complementam esta análise ao representarem o topo da cadeia trófica no lodo ativado. Sua ocorrência, mesmo que esporádica, confirma um tempo de retenção celular prolongado e um estágio avançado de mineralização da matéria orgânica. Esta composição específica da comunidade biológica é típica de sistemas operando em condições ótimas, com boa oxigenação, carga orgânica balanceada e excelente formação de flocos biológicos.

Nesta fase, o sistema atingiu o valor mínimo de oxigênio dissolvido médio de 3,04 mg.L⁻¹ após 21 minutos de operação (Figura 22), apresentando um comportamento distinto das fases anteriores. Esse tempo intermediário de consumo, situado entre os 28 minutos da Fase I e os 18 minutos da Fase II, revela importantes aspectos da dinâmica microbiana estabelecida no reator. A manutenção do mesmo valor mínimo de OD nas três fases, apesar dos diferentes tempos de resposta, indica que a biomassa manteve sua capacidade metabólica básica, porém com eficiência variável em cada estágio operacional. As variações nos tempos de resposta refletem principalmente o grau de adaptação da biomassa às condições operacionais.

Figura 22 - Oxigênio Dissolvido (mg.L⁻¹) - Fase III



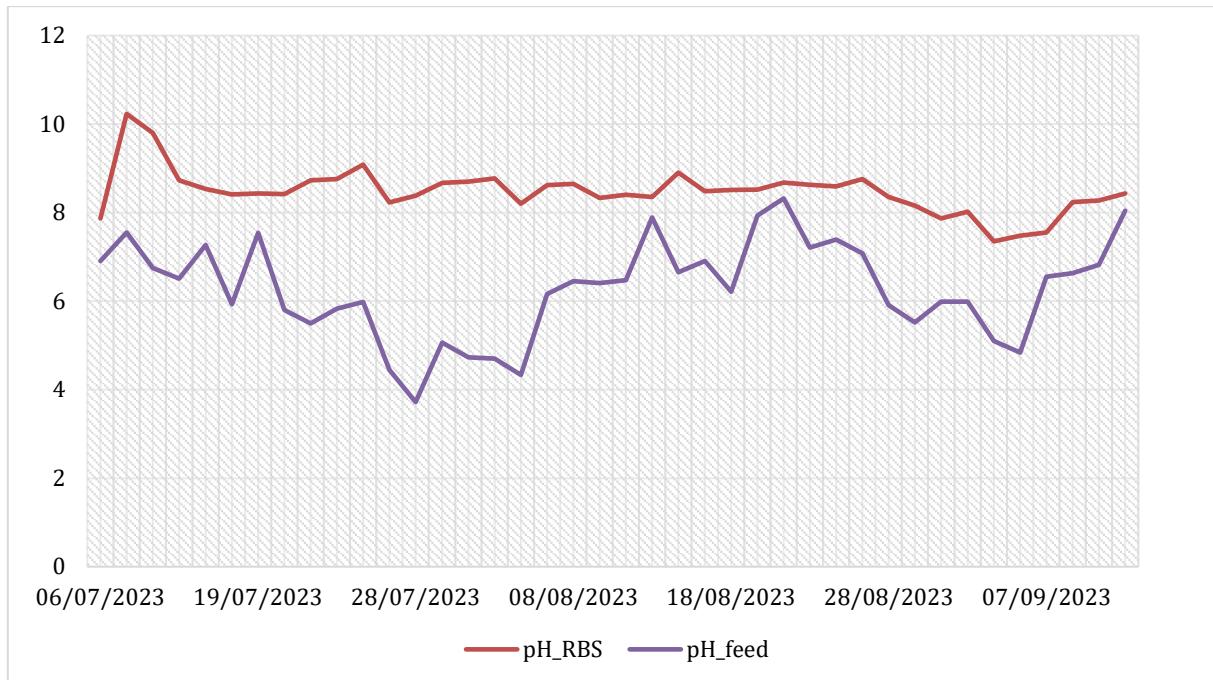
Fonte: a autora (2025)

Na Fase III as coletas para PHA foram realizadas nos dias operacionais 57, 64 e 71. Os teores de PHA observados foram de 6,40 mg (1.750,0 mg·L⁻¹ de sólidos suspensos voláteis, teor de 0,18% de PHA – 0,15% de PHB – e IVL de 58,2 mL·gSSV⁻¹), 5,75 mg (1.361,1 mg·L⁻¹ de sólidos suspensos voláteis, teor de 0,21% de PHA – 0,17% de PHB – e IVL de 51,4 mL·gSSV⁻¹) e 4,51 mg (1.366,7 mg·L⁻¹ de sólidos suspensos voláteis, teor de 0,17% de PHA – 0,13% de PHB – e IVL de 46,8 mL·gSSV⁻¹), respectivamente.

5.4 Discussão integrada

Com relação ao monitoramento do pH no RBS (Figura 23), observa-se que controlando o pH do substrato na faixa de 6 a 8, o pH do licor misto se mantém na faixa de 8, sendo esta a faixa ideal para o sistema. Existem microrganismos específicos envolvidos na degradação da matéria orgânica e na síntese de PHA e estes têm intervalos de pH ideais para o seu crescimento; valores demasiado baixos ou demasiado elevados podem inibir a atividade metabólica.

Figura 23 - Monitoramento do pH (Licor misto e Feed)



Fonte: a autora (2025)

As Fases I, II e III apresentaram razões entre a duração da fase de abundância e o comprimento total do ciclo de 0,11, 0,07 e 0,08 (h/h), respectivamente. Esses valores estão em concordância com os encontrados na literatura para sistemas similares, conforme observado por Valentino et al. (2018), quando se compara o uso de acetato sintético puro com fermentados complexos como substrato, verifica-se que a razão tende a ser maior no primeiro caso.

A maior parte do PHA acumulado consistiu em PHB, com produção residual de PHH e ausência significativa de PHV. Essa distribuição de homopolímeros corrobora os achados de Dionisi et al. (2004), que indicam que a formação do copolímero PHV é favorecida pela presença simultânea de ácido propionico e ácido acético como substratos.

No presente estudo, as proporções desses precursores na Fase IV do reator acidogênico indicaram um desbalanceamento que possivelmente limitou a síntese de HV: na Fase IVA, o HAc representou 42,7% e o HProp 22,9%, enquanto na Fase IVB, essas proporções foram de 46,8% e 25,5%, respectivamente. Essa relação menos equilibrada pode ter favorecido a rota metabólica para produção de PHB em detrimento do copolímero PHV.

A predominância de PHB pode ser atribuída à maior disponibilidade de HAc (um ácido graxo de cadeia par - C2) em relação ao HProp (cadeia ímpar - C3). Esse padrão está de acordo com o descrito por Perez-Zabaleta et al. (2021), que demonstram que ácidos graxos com número par de carbonos (como acetato e butirato) são preferencialmente convertidos em (R)-3-

hidroxibutirato (monômero do PHB). Conforme apontado por Dahiya et al. (2023), diferentes agentes tamponantes ou neutralizantes influenciam diretamente a formação de ácidos específicos e reforçam a capacidade de tamponamento. No caso do NaOH, há um favorecimento na produção de ácido acético. Essa relação estequiométrica entre a composição do substrato e a estrutura do biopolímero formado evidencia a importância do controle preciso dos perfis de AGVs para a produção direcionada de PHA com características específicas.

No acompanhamento do teor de PHA (**Tabela 9**), observou-se que a fração predominante acumulada foi composta por PHB, acompanhada por pequenas quantidades de PHH e ausência expressiva de PHV. Os resultados indicaram que, nas condições operacionais adotadas, a comunidade microbiana converteu os substratos disponíveis majoritariamente em PHB.

Tabela 9 - Concentração de polímeros (PHB, PHH e PHA) obtida no reator.

Fase	SSV (mg.L ⁻¹)	PHB (mg.L ⁻¹)	PHH (mg.L ⁻¹)	PHA (mg.L ⁻¹)	Teor de PHA (%) ¹
I	1350	3,83	0,66	4,48	0,332
II	1604	2,85	0,51	3,36	0,209
III	1750	2,63	0,57	3,20	0,183
III	1361	2,31	0,56	2,87	0,211
III	1367	1,75	0,51	2,25	0,165

¹mg PHA·mg SSV⁻¹, conforme **Equação (3)**. Fonte: a autora (2025)

Esse perfil de acúmulo está intimamente relacionado à composição dos ácidos graxos voláteis (AGVs) no meio, com predomínio de ácido acético em relação aos demais compostos. A ausência de produção significativa de PHV no presente estudo está diretamente relacionada à baixa proporção de HProp no meio de fermentação, o que limitou a síntese do monômero hidroxivalerato e, consequentemente, a formação do copolímero PHV. Embora ácidos propiônico e valérico estivessem presentes, suas concentrações aparentaram ser insuficientes, ou pouco assimiladas pela microbiota, para induzir a via metabólica correspondente à formação de PHV.

A maior concentração de PHA, normalizada em relação aos SSV e quantificada por cromatografia, foi alcançada quando o reator foi alimentado exclusivamente com ácido acético puro. Esse resultado confirma a preferência metabólica da comunidade microbiana por substratos de cadeia par, em especial o acetato, que é convertido diretamente em 3-

hidroxibutirato, principal monômero do PHB. Com a substituição do ácido acético pelo fermentado rico em AGVs, observou-se uma redução gradual na concentração de PHA acumulado. Esse comportamento pode estar associado tanto à menor disponibilidade relativa de acetato quanto à presença de outros AGVs (como propiônico, valérico e caproico), que não são assimilados com a mesma eficiência ou não são preferencialmente direcionados para a rota de síntese de PHA, resultando em queda da eficiência global de conversão.

Face aos dados obtidos, o rendimento máximo de PHA de 0,33% ($\text{mg PHA} \cdot \text{mg SSV}^{-1}$) alcançado é consideravelmente inferior aos patamares reportados como viáveis na literatura, que podem atingir valores superiores a 60%. Essa baixa eficiência de acúmulo indica que, embora a rota integrada proposta tenha se mostrado viável na primeira etapa, com a produção bem-sucedida de AGVs via codigestão, o estágio de enriquecimento não foi eficaz. Pois a estratégia aplicada, seja com acetato puro ou com o fermentado bruto, não promoveu a seleção de uma cultura microbiana mista com alta capacidade de armazenamento de PHA.

6 CONCLUSÃO

- Caracterização de substratos e inóculos: A análise microscópica em 04/07/2023 revelou rotíferos e nematoides, indicadores de idade de lodo elevada ($\geq 15\text{--}20$ dias) e IVL de $282,56 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$, compatíveis com sistemas maduros e estáveis. A biomassa algal manteve pH próximo da neutralidade, enquanto vinhaça e glicerina foram ácidas, exigindo correção; a vinhaça destacou-se pelo maior C/N, indicando maior aporte de carbono.
- Produção de AGVs e impacto do substrato: A vinhaça isolada (Fase I) gerou $1.469 \pm 972 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de AGVs (HAc predominante); com biomassa algal (Fase II), subiu para $4.777 \pm 1.182 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (HBut dominante). O pré-tratamento térmico e aumento de COV resultaram no pico em III_C ($13.003 \pm 1.599 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, HAc $4.461 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), enquanto a introdução do glicerol reduziu a produção para $825\text{--}1.260 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. O pH modulou o perfil: HAc (4,8–5,5), HBut (5,8) e HVa ($\geq 6,3$).
- Acúmulo de PHA sob diferentes condições operacionais: O regime de abundância/escassez, aliado ao pH do licor misto (média de 8), favoreceu o metabolismo acumulador de PHA. A fase I, alimentada exclusivamente com ácido acético, alcançou o maior teor de PHA, de 0,33% (PHB 0,28%), caindo para 0,21% na Fase II e 0,17–0,18% na Fase III. A predominância de PHB foi condicionada à alta fração de HAc (43–47%) em relação ao HProp (23–26%), limitando a formação de PHV. Esses resultados evidenciam que ajustes na proporção de substratos acidogênicos são determinantes para otimizar a síntese de biopolímeros.

Em suma, a pesquisa cumpriu o objetivo geral de avaliar a viabilidade da rota integrada anaeróbia-aeróbia para a produção de biopolímeros a partir da codigestão de biomassa algal e vinhaça, demonstrando a viabilidade e a robustez operacional do sistema.

6.1 Sugestões para pesquisas futuras

- 1) Otimização dos parâmetros de fermentação para maximizar a produção de ácidos graxos voláteis (AGVs) e viabilizar estratégias economicamente eficientes para sua recuperação a partir dos efluentes;

- 2) Extensão do monitoramento do reator em batelada sequencial para ciclos completos, permitindo análises detalhadas da dinâmica microbiana e os parâmetros operacionais, com vistas a compreender melhor os mecanismos de produção de PHA;
- 3) Separação operacional das fases de enriquecimento e produção de PHA, de modo a otimizar cada etapa de forma independente, uma vez que as condições fisiológicas ideais para a seleção de microrganismos acumuladores podem diferir significativamente das condições ideais para a síntese de polímero.

8 REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, M. G. E. *et al.* Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sugar cane molasses. *Journal of Biotechnology*, v. 130, n. 4, p. 411–421, 15 jul. 2007a.
- ALBUQUERQUE, M. G. E. *et al.* Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sugar cane molasses. *Journal of Biotechnology*, v. 130, n. 4, p. 411–421, 15 jul. 2007b.
- ALBUQUERQUE, M. G. E.; TORRES, C. A. V.; REIS, M. A. M. Polyhydroxyalkanoate (PHA) production by a mixed microbial culture using sugar molasses: Effect of the influent substrate concentration on culture selection. *Water Research*, v. 44, n. 11, p. 3419–3433, 2010.
- ANDREOLLI, Marco *et al.* Thauera sp. Sel9, a new bacterial strain for polyhydroxyalkanoates production from volatile fatty acids. *New Biotechnology*, v. 72, p. 71–79, 25 dez. 2022.
- APHA, AWWA, and WPCF. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 25. ed. Baltimore: Port City Press, 2017.
- AQUINO, Sérgio F. et al. Metodologias para determinação da atividade metanogênica específica (AME) em lodos anaeróbios methodologies for determining the specific methanogenic activity (SMA) in anaerobic sludges luiz. Monteggia (Vol. 12), 2007.
- BEUN, J.; DIRCKS, K.; VAN LOOSDRECHT, M.; HEIJNEN, J. Metabolismo de poli- γ -hidroxibutirato em micróbios mistos alimentados dinamicamente culturas. *Água Res.* 2002, 36, 1167-1180.
- CHALIMA A, OLIVER L, FERNÁNDEZ DE CASTRO L, KARNAOURI A, DIETRICH T, TOPAKAS E. Utilização de ácidos graxos voláteis de microalgas para a produção de compostos de alto valor agregado. *Fermentação*. 2017; 3(4):54.
- CHRISTOFOLETTI, C. A., ESCHER, J. P., CORREIA, J. E., MARINHO, J. F. U., & FONTANETTI, C. S. Sugarcane vinasse: environmental implications of its use. *Waste management*, 33(12), 2752 2761. 2013.
- BURNIOL-FIGOLS, A.; VARRONE, C.; LE, SB; DAUGAARD, AE; SKIADAS, IV; GAVALA, HN. Produção combinada de polihidroxialcanoatos (PHA) e 1,3-propanodiol a partir de glicerol bruto: Conversão seletiva de ácidos graxos voláteis em PHA por consórcios microbianos mistos. *Água Res.* 2018, 136, 180-191.
- CHEN, G. Q.; CHEN, Guo-Qiang. Industrial Production of PHA. *Microbiology Monographs*, v. 14, 2010.

CHEN, Zhiqiang *et al.* Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate by Gamma proteobacterium WD-3 from volatile fatty acids. *Chemosphere*, v. 82, n. 8, p. 1209–1213, 2011.

COMEAU, Yves; HALL, Kenneth J.; OLDHAM, William K. Determination of Poly-3-Hydroxybutyrate and Poly-3-Hydroxyvalerate in Activated Sludge by Gas-Liquid ChromatographyAPPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 1988. Disponível em: <<https://journals.asm.org/journal/aem>>.

COSTA, R. S. T. Produção de Bioplásticos por Culturas Mistas em SBR. Dissertação, Universidade de Aveiro, 2011.

CUSTÓDIO, Andreza Cristiane *et al.* Purificação Simplificada do Rejeito de Glicerina Bruta da Produção de Biodiesel da Biorrefinaria Berso-UFPE: Uma Prática Sustentável Simple Purification Process of Waste Glycerol from Berso-Ufpe Biorefinery Biodiesel Production: A Sustainable Practice Revista Brasileira de Geografia Física. Revista Brasileira de Geografia Física Vol. 15, 2022.

DAHIYA, Shikha; LINGAM, Yaswanth; VENKATA MOHAN, S. Understanding acidogenesis towards green hydrogen and volatile fatty acid production – Critical analysis and circular economy perspective. *Chemical Engineering Journal* Elsevier B.V., 15 maio 2023.

DIONISI, Davide *et al.* Biodegradable Polymers from Organic Acids by Using Activated Sludge Enriched by Aerobic Periodic Feeding. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 85, n. 6, p. 569–579, 20 mar. 2004.

FUESS, Lucas Tadeu *et al.* Thermophilic two-phase anaerobic digestion using an innovative fixed-bed reactor for enhanced organic matter removal and bioenergy recovery from sugarcane vinasse. *Applied Energy*, v. 189, p. 480–491, 2017.

HOFFMAN, Heike *et al.* utilização da imagem microscópica na avaliação das condições de operação - Uma aplicação da experiência da Alemanha em estações de tratamento de esgotos do Brasil. 21º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2001.

HOFFMAN, Heike. Caracterização do funcionamento de ETE de tipo lodo ativado via imagem microscópica - Estudo na região da Grande Florianópolis. XI SILUBESA, 2004.

HU, S., LUO, X., WAN, C., & LI, Y. Characterization of crude glycerol from biodiesel plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(23), 5915–5921, 2012.

HUANG, Wenli *et al.* Effect of algae growth on aerobic granulation and nutrients removal from synthetic wastewater by using sequencing batch reactors. *Bioresource Technology*, v. 179, p. 187–192, 1 mar. 2015.

JANKE L, LEITE A, NIKOLAUSZ M. Produção de biogás a partir de resíduos de cana-de-açúcar: avaliação dos desafios cinéticos para o projeto de processos. *Int J Mol Sci* 16:20685–20703. 2015.

JAYAKRISHNAN, U.; DEKA, Deepmoni; DAS, Gopal. Waste as feedstock for polyhydroxyalkanoate production from activated sludge: Implications of aerobic dynamic feeding and acidogenic fermentation. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 9, n. 4, 1 ago. 2021.

JOHNSON, K.; JIANG, Y.; KLEEREBEZEM, R.; MUYZER, G.; VAN LOOSDRECHT, MCM. Enriquecimento de uma cultura bacteriana mista com alto Capacidade de armazenamento de polihidroxialcanoato. *Biomacromoléculas* 2009, 10, 670-676.

LEE, Wee Shen *et al.* A review of the production and applications of waste-derived volatile fatty acids. *Chemical Engineering Journal*, 1 jan. 2014.

LI, Dongna *et al.* Creating biotransformation of volatile fatty acids and octanoate as co-substrate to high yield medium-chain-length polyhydroxyalkanoate. *Bioresource Technology*, v. 331, 1 jul. 2021.

MAGDALENA JA, TOMÁS-PEJÓ E, GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ C. Produção de ácidos graxos voláteis a partir de biomassa de microalgas: desempenho do digestor anaeróbio e dinâmica populacional em condições estáveis, inanição e recuperação do processo. *Moléculas*. 2019; 24(24):4544.

MARANG, Leonie *et al.* Butyrate as preferred substrate for polyhydroxybutyrate production. *Bioresource Technology*, v. 142, p. 232–239, 2013.

MIN KIM, Seon *et al.* Recent Trends in The Production of Polyhydroxyalkanoates Using Marine Microorganisms. *Journal of Life Science*, v. 33, n. 8, p. 680–691, 2023.

MUNIR, Sajida; JAMIL, Nazia. Polyhydroxyalkanoate (PHA) production in open mixed cultures using waste activated sludge as biomass. *Archives of Microbiology*, v. 202, n. 7, p. 1907–1913, 1 set. 2020.

OEHMEN, Adrian *et al.* Optimisation of poly- β -hydroxyalkanoate analysis using gas chromatography for enhanced biological phosphorus removal systems. *Journal of Chromatography A*, v. 1070, n. 1–2, p. 131–136, 8 abr. 2005.

PASSOS, Fabiana; ASTALS, Sergi; FERRER, Ivet. Anaerobic digestion of microalgal biomass after ultrasound pretreatment. *Waste Management*, v. 34, n. 11, p. 2098–2103, 1 nov. Z-ZABALETA, Mariel *et al.* Bio-based conversion of volatile fatty acids from waste streams to

polyhydroxyalkanoates using mixed microbial cultures. *Bioresource Technology*, v. 323, 1 mar. 2021.

QUISPE, C. A., CORONADO, C. J., & CARVALHO JR, J. A. Glycerol: Production, consumption, prices, characterization and new trends in combustion. *Renewable and sustainable energy reviews*, 27, 475-493, 2013.

SANCHEZ-LEDESMA, Lina Marcela; RAMÍREZ-MALULE, Howard; RODRÍGUEZ-VICTORIA, Jenny Alexandra. Volatile Fatty Acids Production by Acidogenic Fermentation of Wastewater: A Bibliometric Analysis. *Sustainability* (Switzerland), v. 15, n. 3, 1 fev. 2023.

SARATALE, Rijuta Ganesh *et al.* An overview of recent advancements in microbial polyhydroxyalkanoates (Pha) production from dark fermentation acidogenic effluents: A path to an integrated bio-refinery. *PolymersMDPI*, , 1 dez. 2021.

SERAFIM, LS; LEMOS, PC; OLIVEIRA, R.; REIS, MA. Otimização da produção de polihidroxibutirato por culturas mistas submetidas às condições de alimentação dinâmica aeróbica. *Biotecnologia. Bioeng.* 2004, 87, 145-160.

SHARMA, Nishu; GUPTA, Urmila; SINGH, Iqbal. Co-digestion of euryhaline microalgae Scenedesmus sp. MKB. with paddy straw for biogas production. *Environmental Engineering Research*, v. 28, n. 2, 1 abr. 2023.

SILVA, E. M. Co-digestão anaeróbia de biomassa algal com diferentes resíduos orgânicos para otimização da produção de biogás. Trabalho de Conclusão de Curso, Engenharia Civil, UFPE, 2022.

SIVAGURUNATHAN, P.; KUPPAM, C.; MUDHOO, A.; SARATALE, GD; KADIER, A.; ZHEN, G.; CHATELARD, L.; TRAABLY, E.; KUMAR, G. Uma revisão abrangente sobre esquemas integrativos de dois estágios para a valorização de efluentes fermentativos escuros. *Cítrico. Rev. Biotechnol.* 2018, 38, 868-882.

SUDESH, K.; ABE, H.; DOI, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters, 2000.

VALENTINO, Francesco *et al.* Feed frequency in a Sequencing Batch Reactor strongly affects the production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from volatile fatty acids. *New Biotechnology*, v. 31, n. 4, p. 264–275, 25 jun. 2014.

VALENTINO, Francesco *et al.* Organic Fraction of Municipal Solid Waste Recovery by Conversion into Added-Value Polyhydroxyalkanoates and Biogas. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, v. 6, n. 12, p. 16375–16385, 3 dez. 2018.

VÁZQUEZ-FERNÁNDEZ, Ana; SUÁREZ-OJEDA, María Eugenia; CARRERA, Julián. Review about bioproduction of Volatile Fatty Acids from wastes and wastewaters: Influence of operating conditions and organic composition of the substrate. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 10, n. 3, 1 jun. 2022.

ZHANG, Mingmei; WU, Haiyun; CHEN, Hong. Coupling of polyhydroxyalkanoate production with volatile fatty acid from food wastes and excess sludge. *Process Safety and Environmental Protection*, v. 92, n. 2, p. 171–178, mar. 2014.

ZHAO, Jin *et al.* Carbon Source Applied in Enrichment Stage of Mixed Microbial Cultures Limits the Substrate Adaptability for PHA Fermentation Using the Renewable Carbon. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 193, n. 10, p. 3253–3270, 1 out. 2021.