

CAROLINE VARELLA RODRIGUES

Produção biotecnológica de hidrogênio a partir do glicerol, bioproduto da produção do biodiesel

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sandra Imaculada Maintinguer
Co-orientador: Prof. Dr. José Eduardo de Oliveira

Araraquara
2016

FICHA CATALOGRÁFICA

R696p Rodrigues, Caroline Varella
 Produção biotecnológica de hidrogênio a partir do
 glicerol, bioproduto da produção do biodiesel / Caroline
 Varella Rodrigues. – Araraquara : [s.n.], 2016
 151 f. : il.

 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
 Instituto de Química

 Orientador: Sandra Imaculada Maintinguer

 Coorientador: José Eduardo de Oliveira

 1. Hidrogênio. 2. Glicerina. 3. Fermentação. 4. Biodiesel.
 5. *Enterobacter*. I. Título.

CAROLINE VARELLA RODRIGUES

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Química.

Araraquara, 23 de agosto de 2016.

BANCA EXAMINADORA



Prof^a. Dr^a. Sandra Imaculada Maintinguer (Orientadora)
Instituto de Pesquisa em Bioenergia / UNESP / Rio Claro - SP



Prof^a. Dr^a. Maria Bernadete Amâncio Varesche Silva
Escola de Engenharia / USP / São Carlos - SP



Prof^a. Dr^a. Valeria Reginatto Spiller
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras / USP / Ribeirão Preto - SP

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Caroline Varella Rodrigues

Nome em citações bibliográficas: Rodrigues, C.V.; C.V. Rodrigues; C. Varella ou Caroline Varella Rodrigues; Varella Rodrigues, Caroline.

ENDEREÇO PROFISSIONAL: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP Campus de Araraquara, Instituto de Química de Araraquara: Rua Prof. Francisco Degni, n. 55, Bairro Quitandinha, CEP: 14800-060 Araraquara/ SP Brasil.

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO:

2014-2016: Mestrado em Química

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP Araraquara, Brasil.

Título: Produção biotecnológica de hidrogênio a partir do glicerol, bioproduto da produção do biodiesel.

Orientadora: Prof. Dra. Sandra Imaculada Maintinguer

Co-orientador: Prof. Dr. José Eduardo de Oliveira

Bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

Grande área: Química.

Área: Bioenergia.

2009-2014: Graduação em Bacharelado em Química Tecnológica

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP Araraquara, Brasil.

Trabalho de conclusão de curso: Estágio Curricular supervisionado na indústria química multinacional “Rhodia – Uma empresa do Grupo Solvay”, de janeiro de 2013 a dezembro de 2013. Orientador: Prof. Dr. Ossamu Hojo.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR:

2011-2012: Iniciação Científica

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP Araraquara, Brasil.

Bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Título: “Estudo químico e biológico em *Piper arboreum* aublet (Piperaceae)”.

2010-2011: Extensão Universitária

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP Araraquara, Brasil.

Bolsista do programa de Apoio ao Estudante: BAAE I.

Título: “Estudo Fitoquímico e Biológico em Folhas de *Piper aduncum* L (Piperaceae)”.

2009-2010: Extensão Universitária

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP Araraquara, Brasil.

Bolsista do programa de Apoio ao Estudante: BAAE I.

Auxílio na preparação das aulas de Bioquímica, no Departamento de Bioquímica no Instituto de Química de Araraquara, UNESP.

ATUAÇÃO PROFISSIONAL:

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP Araraquara, Brasil.

Vínculo Institucional

2014-2016: Vínculo: estudante

Enquadramento Funcional: Bolsista CAPES de Mestrado em Química.

Regime: Dedicação exclusiva.

2013-2013: Vínculo: estagiária

Enquadramento Funcional: Estagiária na indústria química “Rhodia – Uma empresa do Grupo Solvay”

Regime: 6 horas semanais.

2011-2012: Vínculo: estudante

Enquadramento Funcional: Bolsista FAPESP de Iniciação Científica

Regime: Dedicação exclusiva.

2010-2011: Vínculo: estudante

Enquadramento Funcional: Bolsista BAAE I de Iniciação Científica

Regime: Dedicação exclusiva.

2009-2010: Vínculo: estudante

Enquadramento Funcional: Bolsista BAAE I de Iniciação Científica

Regime: Dedicação exclusiva.

IDIOMAS

Inglês em nível avançado (escrita, leitura e conversação).

Espanhol em nível básico.

Alemão em nível básico.

PRÊMIOS E TÍTULOS

2016: Melhor trabalho da sessão oral da área de Microbiologia Aplicada do “1º Congresso Brasileiro de Microbiologia Agropecuária, Agrícola e Ambiental”, com apresentação oral do trabalho “Aplicação de Glicerol Bruto Pré-Tratado em Processos Biológicos de Geração de H₂”, realizado pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Jaboticabal – SP, nos dias 10 a 12 de maio de 2016.

2013: Participação na semifinal do concurso de jovens inovadores, “Falling Walls Lab”, em São Paulo no dia 09 de setembro de 2013, ocorrido na Universidade Presbiteriana Mackenzie, com apresentação do trabalho “Solventes Verdes: alimento para as indústrias, reciclagem para

o planeta”, classificando-me em segundo lugar, que garantiu minha participação na final deste mesmo concurso na Alemanha para representar o Brasil neste fórum internacional.

2006: Participação do Nível I da Olimpíada São Carlense de Matemática, realizada pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação, da Universidade de São Paulo, em Agosto de 2006, tendo recebido Menção Honrosa.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigo completo publicado em periódico

RODRIGUES, C. V.; SANTANA, K. O.; NESPECA, M. G.; DE OLIVEIRA, J. E.; MAINTINGUER, S. I. Crude Glycerol by transesterification process from used cooking oils: characterization and potentialities on hydrogen bioproduction. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 33, p. 14641-14651, Sep. 2016.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumos expandidos)

RODRIGUES, C. V.; SANTANA, K. O.; NESPECA, M. G.; DE OLIVEIRA, J. E.; MAINTINGUER, S. I. Aplicação de Glicerol Bruto pré-tratado em processos biológicos de geração de H₂. In: I CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, AGRÍCOLA E AMBIENTAL (CBMAAA), especial., 2016, Jaboticabal. **Microbiologia**. Jaboticabal: Ciência & Tecnologia, 2016, v. 8, ISSN 2178-9436.

SANTANA, K. O.; **RODRIGUES, C. V.**; NESPECA, M. G.; DE OLIVEIRA, J. E.; PIRES, L. O.; MAINTINGUER, S. I. Produção biológica de gás hidrogênio a partir de glicerol bruto e esgoto sanitário. In: I CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, AGRÍCOLA E AMBIENTAL (CBMAAA), especial., 2016, Jaboticabal. **Microbiologia**. Jaboticabal: Ciência & Tecnologia, 2016, v. 8, ISSN 2178-9436.

TORQUATO, L. D. M.; PACHIEGA, R.; **RODRIGUES, C. V.**; CRESPI, M. S.; MAINTINGUER, S. I. Produção biológica de hidrogênio a partir de lodos de diferentes sistemas de tratamento de esgotos. In: I CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, AGRÍCOLA E AMBIENTAL (CBMAAA), especial., 2016, Jaboticabal. **Microbiologia**. Jaboticabal: Ciência & Tecnologia, 2016, v. 8, ISSN 2178-9436.

Apresentação de trabalho

1. **CAROLINE VARELLA RODRIGUES**, KAMILI OLIVEIRA SANTANA, MAURÍLIO GUSTAVO NESPECA, JOSÉ EDUARDO DE OLIVEIRA, SANDRA IMACULADA MAINTINGUER. Aplicação de Glicerol Bruto pré-tratado em processos biológicos de geração de H₂. 2016 (Apresentação de Trabalho/Congresso).

2. KAMILI OLIVEIRA SANTANA, **CAROLINE VARELLA RODRIGUES**, MAURÍLIO GUSTAVO NESPECA, JOSÉ EDUARDO DE OLIVEIRA, LORENA OLIVEIRA PIRES, SANDRA IMACULADA MAINTINGUER. Produção Biológica de Gás Hidrogênio a partir de Glicerol Bruto e Esgoto Sanitário. 2016 (Apresentação de Trabalho/ Congresso).

3. LILIAN DANIELLE DE MOURA TORQUATO, RENAN PACHIEGA, **CAROLINE VARELLA RODRIGUES**, MARISA SPIRANDELI CRESPI, SANDRA IMACULADA MAINTINGUER. Produção Biológica de Hidrogênio a partir de Lodos de diferentes Sistemas de Tratamentos de Esgotos. 2016 (Apresentação de Trabalho/ Congresso).
4. **C.V. RODRIGUES**; M. PINESE; R. PACHIEGA; J.E. DE OLIVEIRA; S.I. MAINTINGUER. Crude Glycerol – characterization and potentialities on hydrogen bioproduction. 2015 (Apresentação de Trabalho/ Congresso).
5. L.M. TORQUATO; R. PACHIEGA; **C.VARELLA**; J.E. DE OLIVEIRA; S.I. MAINTINGUER. Hydrogen bio-production using vinasse from citrus industry as substrate. 2015 (Apresentação de Trabalho/ Congresso).
6. **RODRIGUES, C.V.**; SANTANA, K.O.; PINESE, M.; DE OLIVEIRA J.E.; MAINTINGUER S.I. Geração de H₂ por meio de consórcios bacterianos utilizando glicerol bruto proveniente da produção de biodiesel. 2015 (Apresentação de Trabalho/ Congresso).
7. SANTANA, K.O.; **RODRIGUES, C.V.**; PINESE, M.; DE OLIVEIRA J.E.; MAINTINGUER S.I. Produção de Bio-H₂ a partir de glicerol bruto da produção de biodiesel com óleos residuais. 2015 (Apresentação de Trabalho/ Congresso).
8. **CAROLINE VARELLA RODRIGUES**. Green solvents: food for industries, recycling for the Planet. 2013 (Apresentação de Trabalho/ Conferência).

Participação em eventos científicos

1. I Congresso de Microbiologia Agropecuária, Agrícola e Ambiental – CBMAAA, organizado pela Fundação de Apoio a Pesquisa, Ensino e Extensão – Funep, realizado no Centro de Convenções da UNESP/FCAV – Campus de Jaboticabal, SP, no período de 10 a 12 de maio de 2016 perfazendo um total de 27 horas. (Congresso)
2. 1º Encontro Nacional de Química Biotecnológica e Agroindustrial, realizado em Ribeirão Preto, São Paulo, no período de 08 a 11 de setembro de 2015. (Congresso)
3. V Seminário do Projeto Temático FAPESP “Produção de Bioenergia no Tratamento de Águas Residuárias e Adequação Ambiental dos Efluentes e Resíduos Gerados”, realizado na Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade da São Paulo (EESC-USP), no dia 31 de julho de 2015. (Seminário)
4. Conferência Internacional, “Falling Walls Conference”, em Berlim, Alemanha, no dia 09 de novembro de 2013.
5. Conferência Internacional, “Falling Walls Lab”, em Berlim, Alemanha, no dia 08 de novembro de 2013.
6. Semifinal do concurso de jovens inovadores, “Falling Walls Lab”, em São Paulo no dia 09 de setembro de 2013, ocorrido na Universidade Presbiteriana Mackenzie.
7. 41ª Semana da Química ocorrida de 17 a 21 de outubro de 2011, no Instituto de Química da UNESP de Araraquara. (Encontro)

8. “Programas 5’s – Conceitos e Aplicações”, do Centro de Monitoramento e Pesquisa da Qualidade de Combustíveis, Biocombustíveis, Petróleo e Derivados, no Instituto de Química da UNESP de Araraquara no dia 30 de setembro de 2011. (Palestra)

9. 40ª Semana da Química ocorrida de 26 de setembro a 01 de outubro de 2010, no Instituto de Química da UNESP de Araraquara. (Encontro)

10. 39ª Semana da Química ocorrida de 18 a 23 de outubro de 2009, no Instituto de Química da UNESP de Araraquara. (Encontro)

Dedico à Deus pela minha vida e pela força que me proporciona.

Dedico à minha avó Lydia (*in memorian*), aos meus pais Marisa e Carlos, à minha irmã Aline
e ao meu namorado Marcelo.
Com carinho e gratidão.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, por me envolver em seus braços, por ser o meu caminho de verdade, pela força e sabedoria que me proporciona.

Aos meus pais, Marisa e Carlos, pelo imenso amor, pela excelente educação que me deram, pelo suporte, onde por muitas vezes, abdicaram de tempo e de seus desejos para realizar meus sonhos, para que eu tivesse a oportunidade de ter uma boa formação profissional e pessoal.

A minha irmã Aline, minha pequena grande mulher, minha fonte de inspiração para a vida toda, que me abriu muitos caminhos, me ensinou, mostrou-me que eu era capaz, que me dá todo apoio e seu imenso amor.

Ao meu namorado Marcelo, meu melhor amigo, meu companheiro pra vida toda, que me apoia em todos os meu projeto de vida profissional, pelo incentivo e paciência durante todos esses anos de luta.

A minha orientadora Prof. Dra. Sandra Imaculada Maintinguer, pela confiança em meu trabalho, pelo apoio excepcional, pela atenção primordial e pelos ensinamentos pra vida toda.

Ao Cempeq, pela equipe integrante que sempre estava disposta a ajudar, em especial ao co-orientador Prof. Dr. José Eduardo de Oliveira, pela confiança, pela disponibilidade de equipamentos que foram cruciais para a execução e desenvolvimento do trabalho.

Aos colegas de trabalho que passaram por minha vida durante esses anos de muita aprendizagem, que contribuíram de forma significativa, como a Kamili, Lilian, Abraham, Renan, Maurílio, Prof. Dra. Lorena, Natália.

Aos amigos sempre presentes em meu coração.

Em especial à minha avó Lydia (*in memorian*) cujo maior sonho dela seria ver a finalização deste trabalho, mas que lá do céu está olhando e feliz por minha vitória.

Ao Instituto de Química, UNESP.

A Capes, pelo auxílio financeiro durante o desenvolvimento da pesquisa.

“Lute com determinação, abrace a vida com paixão, perca com classe e vença com ousadia, porque o mundo pertence a quem se atreve e a vida é muito bela para ser insignificante” – (Charles Chaplin).

RESUMO

A produção de biodiesel levou ao aumento do coproduto gerado desse processo, o glicerol bruto, que devido ao seu excesso, tem ganhado interesse nas transformações biotecnológicas visando à formação de produtos com valor agregado, sendo H_2 de maior interesse. Este estudo avaliou o potencial da bioconversão do glicerol bruto, proveniente da produção de biodiesel a partir de óleo de cozinha usado, a hidrogênio por meio de consórcios de bactérias anaeróbias fermentativas. O glicerol bruto foi submetido ao pré-tratamento ácido (pH 3,0, HCl 1,0M) para converter sabões solúveis, considerados inibitórios ao crescimento microbiano, à ácidos graxos insolúveis. Consórcios bacterianos provenientes de estação de tratamento de água residual industrial (I) e sanitária (II e III), além da cultura pura *Enterobacter* sp. (inóculo IV) foram utilizados como inóculos e reativados em meio de cultivo, pH 7,0, a 37°C por 7 dias, sob condições anaeróbias. Para a obtenção de consórcios bacterianos produtores de H_2 , o pré-tratamento nos inóculos I, II e III foi realizado por meio do choque térmico (100°C por 15 minutos) com posterior enriquecimento por diluições seriadas em meio PYG modificado e pH 5,5. Bacilos Gram positivos e formadores de endósporos foram predominantes. Os consórcios enriquecidos que apresentaram melhores desempenhos quanto à geração de H_2 , (I) e (II), foram utilizados para as realizações de ensaios, em batelada, em proporções crescentes de glicerol bruto pré-tratado. Nos ensaios de geração de H_2 , 20% do meio reacional era composto pelos inóculos (I) e (II), separadamente, em meio PYG modificado, mantidos a 37°C, pH inicial 5,5, *headspace* de N_2 (100%) sob as seguintes condições: (a) 10 g DQO L^{-1} de glicerol bruto pré-tratado e 10 g DQO L^{-1} de glicerina; (b) 4 g DQO L^{-1} de glicerina e 16 g DQO L^{-1} de glicerol bruto pré-tratado e (c) 20 g DQO L^{-1} de glicerol bruto pré-tratado. Os rendimentos de H_2 foram de 2,21, 1,63, 0,83, 1,05, 0,57 e 0,31 mol H_2 mol $^{-1}$ glicerol, respectivamente para Ensaio (I)-a (envolvendo o inóculo (I) sob a condição a), Ensaio (I)-b, Ensaio (I)-c, Ensaio (II)-a (envolvendo o inóculo (II) sob a condição a), Ensaio (II)-b e Ensaio (II)-c, com o consumo de glicerol de 26,9%, 45,8%, 56,2%, 31,7%, 59,0% e 91,0% para os respectivos ensaios citados. Foi detectado principalmente etanol em maior concentração em todos os ensaios envolvendo o inóculo (I), bem como para o inóculo (II) envolvendo os ensaios (II)-a e b, e ácido butírico em maior concentração no ensaio (II)-c. Por meio da análise de biologia molecular, a abundância relativa da ordem *Clostridiales* para o inóculo (I) e (II) foi, respectivamente, 91,81% e 94,70%, bem como de representantes da família *Peptostreptococcaceae* com alta abundância relativa para ambos os inóculos, de 85,29% e 70,26% para inóculo (I) e (II) respectivamente. Foi realizado um ensaio comparativo com cultura pura *Enterobacter* sp. com 20 g DQO L^{-1} de glicerol bruto pré-tratado e o rendimento obtido foi de 0,13 mol H_2 mol $^{-1}$ glicerol. Além disso, a cultura pura mostrou-se ser mais sensível nos ensaios de geração de hidrogênio devido à presença de contaminantes no glicerol bruto. Os resultados de geração de H_2 envolvendo consórcios foram eficientes do ponto de vista em que foram atingidos rendimentos equivalentes, ou até mesmo superiores, aos reportados por outros trabalhos, mostrando que é possível obter hidrogênio por meio do glicerol bruto proveniente de transesterificação do óleo de cozinha usado.

Palavras-chaves: Bioprodução de Hidrogênio. Consórcio Microbiano. *Enterobacter* sp. Fermentação. Glicerol bruto. Óleo de Cozinha Usado.

ABSTRACT

The biodiesel production has led to increase co-product generated in this process, the crude glycerol, which due to its excess, has gained interest in the biotechnological transformations for aimed at formation of value-added products, considering H₂ the most interest bioproduct. This study evaluated the potential of bioconversion of crude glycerol from the biodiesel production from used cooking oil, to generate hydrogen through consortia of fermentative anaerobic bacteria. The crude glycerol has been subjected to the acid pretreatment (pH 3.0, 1.0M HCl) to convert soluble soaps, considered inhibitory to microbial growth, to insoluble fatty acids. Consortia from sewage treatment of industrial waste (I) and sanitary waste (II and III), and the pure culture *Enterobacter* sp. (inoculum IV) were used as inocula and reactivated in growth medium, pH 7.0, at 37°C for 7 days, under anaerobic conditions. To obtain H₂-producing bacterial consortia, pretreatment in inocula I, II and III was carried through the thermal shock (100°C for 15 minutes) with subsequent enrichment by serial dilutions in modified PYG and pH 5.5. Gram positive bacillis and spores-forming were predominant. The enriched consortia that showed better performances for the H₂ generation, (I) and (II), were used for the assays, in batch mode, varying concentrations in increasing proportions of the crude glycerol pretreated. In the H₂ generation assays, 20% of the reaction medium was composed of inoculum (I) and (II) separately in modified PYG medium, kept at 37 ° C, initial pH 5.5, *headspace* N₂ (100%) under the following conditions: (a) 10 g COD L⁻¹ crude glycerol pretreated and 10 g COD L⁻¹ glycerine; (b) 4 g COD L⁻¹ of glycerin and 16 g COD L⁻¹ crude glycerol pretreated and (c) 20 g COD L⁻¹ crude glycerol pretreated. H₂ yields were 2.21, 1.63, 0.83, 1.05, 0.57 and 0.31 mol H₂ mol⁻¹ glycerol, respectively, for the Assay (I)-a (involving the inoculum (I) under the condition a), Assay (I) -b, Assay (I)-c, Assay (II)-a (involving the inoculum (II) under the condition a), Assay (II) -b Assay (II)-c with glycerol consumption of 26.9%, 45.8%, 56.2%, 31.7%, 59.0% and 91.0% for the respective assays cited. Ethanol was mainly detected in a higher concentration in all assays involving the inoculum (I), as well as for the inoculum (II) involving the assays (II)-a and b, and butyric acid in higher concentrations in the assay (II)-c. Through molecular biology, the relative abundance of the *Clostridiales* order for the inoculum (I) and (II) were, respectively, 91.81% and 94.70% as well as the Peptostreptococcaceae family showed high relative abundance for both inocula of 85.29% and 70.26% for inoculum (I) and (II) respectively. A comparative assay with a pure culture *Enterobacter* sp., with 20 g COD L⁻¹ crude glycerol pretreated and the yield obtained was 0.13 mol H₂ mol⁻¹ glycerol was performed. In addition, the pure culture was shown to be more sensitive to hydrogen generation assays due to the presence of contaminants in the crude glycerol. The results of generation of H₂ evolving consortia were efficient from the point of view that equivalent yields have been achieved, or even superior, to those reported by other studies showing that it is possible to obtain hydrogen by crude glycerol from cooking oil transesterification used.

Keywords: Hydrogen Bioproduction. Microbial Consortium. *Enterobacter* sp. Fermentation. Crude Glycerol. Used cooking oil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Reação de transesterificação	33
Figura 2.2 - Representação esquemática da produção de biodiesel pelo método de transesterificação	34
Figura 2.3 - Produção mundial de biodiesel (barras) e glicerol bruto (linhas) entre 2000 e 2010	37
Figura 2.4 - Representação esquemática das etapas envolvidas na fermentação anaeróbia	41
Figura 2.5 - Rotas bioquímicas para a fermentação do glicerol	43
Figura 2.6 - Alguns dos produtos finais da fermentação do glicerol por diferentes microrganismos	44
Figura 2.7 - Etapas do pirosequenciamento envolvendo a plataforma Illumina	56
Figura 4.1 - Esquema operacional	60
Figura 4.2 - Primeira etapa de purificação celular dos inóculos pré-tratados (I, II e III, onde 1- <i>headspeace</i> e 2- inóculo pré-tratado em meio de cultivo).....	67
Figura 4.3 - Segunda etapa de purificação celular dos inóculos pré-tratados (I, II e III, onde 1- <i>headspeace</i> e 2- inóculo pré-tratado em meio de cultivo).....	68
Figura 5.1 - Visualização do Glicerol bruto: (a) sem tratamento e (b) após tratamento ácido	80
Figura 5.2 - Purificação celular dos inóculos pré-tratados (I, II e III): (a) reator com inóculo pré-tratado e (b) reator com biomassa purificada	82
Figura 5.3 - Microscopia do inóculo (I) reativado após o pré-tratamento: (a) leveduras (b) bacilos Gram-positivos; (c) bacilos Gram-negativos.....	84
Figura 5.4 - Análises microscópicas após a purificação celular: (a) inóculo (I) predomínio de bacilos Gram-positivos; (b) inóculo (II) bacilos com endósporos	84
Figura 5.5 - Variação temporal do crescimento bacteriano nos ensaios de produção de H ₂	87

Figura 5.6 - Concentração de glicerol ao longo do tempo de operação dos reatores anaeróbios (a) Ensaio (I)-a, Ensaio (I)-b e Ensaio (I)-c; (b) Ensaio (II)-a, Ensaio (II)-b e Ensaio (II)-c.....	88
Figura 5.7 - Variação temporal da DQO nos ensaios de produção de H ₂ (a) Ensaio (I)-a, (b) Ensaio (I)-b, (c) Ensaio (I)-c, (d) Ensaio (II)-a, (e) Ensaio (II)-b e (f) Ensaio (II)-c.	90
Figura 5.8 - Produção de H ₂ (mmol H ₂ L ⁻¹) em função do tempo dos ensaios (h).....	92
Figura 5.9 - Comportamento da geração de H ₂ através da função Gompertz modificada nos ensaios: (a) Ensaios com inoculo (I) e (b) Ensaios com inóculo (II).....	95
Figura 5.10 - (a) Variação temporal de pH e (b) Produção acumulada de compostos orgânicos no meio líquido para o Ensaio (I)-a (50% glicerol bruto+50% glicerina).....	99
Figura 5.11 - (a) Variação temporal de pH e (b) Produção acumulada de compostos orgânicos no meio líquido para o Ensaio (I)-b (80% glicerol bruto+20% glicerina)...	100
Figura 5.12 - (a) Variação temporal de pH e (b) Produção acumulada de compostos orgânicos no meio líquido para o Ensaio (I)-c (100% glicerol bruto).....	101
Figura 5.13 - (a) Variação temporal de pH e (b) Produção acumulada de compostos orgânicos no meio líquido para o Ensaio (II)-a (50% glicerol bruto+50% glicerina).....	102
Figura 5.14 - (a) Variação temporal de pH e (b) Produção acumulada de compostos orgânicos no meio líquido para o Ensaio (II)-b (80% glicerol bruto+20% glicerina)..	103
Figura 5.15 - (a) Variação temporal de pH e (b) Produção acumulada de compostos orgânicos no meio líquido para o Ensaio (II)-c (100% glicerol bruto)	104
Figura 5.16 - Curvas de rarefação para OTUs dos inóculos I e II.....	118
Figura 5.17 - Variação temporal do crescimento bacteriano no ensaio de produção de H ₂ para cultura pura (100% glicerol bruto)	123
Figura 5.18 - Concentração de glicerol ao longo do tempo para a cultura pura.....	123
Figura 5.19 - Produção de H ₂ (mmol H ₂ L ⁻¹) em função do tempo do ensaio (h) para a cultura pura.....	123
Figura 5.20 - Comportamento da geração de H ₂ através da função Gompertz modificada no ensaio envolvendo a cultura pura	126

Figura 5.21 - (a) Variação temporal de pH e (b) Produção acumulada de compostos orgânicos no meio líquido para o Ensaio com cultura pura (100% glicerol bruto)..... 128

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Composição do Meio de cultivo PYG modificado	66
Tabela 4.2 - Condições dos ensaios de geração de H ₂ operados em batelada a 37°C, pH 5,5 para consórcios (I) e (II) e pH 7,0 para cultura pura	66
Tabela 5.1 - Caracterização do glicerol bruto usado nos ensaios de geração biológica de H ₂	75
Tabela 5.2 - Quantificação de H ₂ produzido em testes preliminares com os três tipos de inóculos testados (I), (II) e (III)	83
Tabela 5.3 - Concentrações de glicerol livre durante operação dos reatores anaeróbios para os inóculos (I) e (II)	89
Tabela 5.4 - Valores de DQO dos ensaios de produção de H ₂ para os inóculos (I) e (II) ao longo dos ensaios	90
Tabela 5.5 - Dados experimentais do tempo de operação dos ensaios e produção máxima de H ₂	93
Tabela 5.6 - Potencial de Produção de H ₂ (P), Taxa Máxima de Produção de H ₂ (R _m), Fase Lag (λ), limites inferior e superior que o modelo calculou e R ² obtidos pela equação de Gompertz modificada	97
Tabela 5.7 - Variação do pH durante os ensaios realizados para os inóculos I e II	99
Tabela 5.8 - Principais compostos orgânicos voláteis gerados no início e final da operação durante as gerações máximas de H ₂	106
Tabela 5.9 - Gerações de 1,3-propapodiol, consumos de glicerol e produção máxima de H ₂ no final da operação dos ensaios	109
Tabela 5.10 - Abundância relativa de Filo, Classe, Ordem, Família e Gênero para os inóculos I e II por meio da plataforma Illumina.....	111
Tabela 5.11 - Resumo das estimativas de riqueza e diversidade de espécies ao final dos ensaios (I) - c e (II) - c	117
Tabela 5.12 - Rendimentos de H ₂ (mol de H ₂ mol ⁻¹ de glicerol) para os ensaios realizados.....	119
Tabela 5.13 - Estudo comparativo da bioconversão do glicerol bruto à H ₂	120

Tabela 5.14 - Concentração de glicerol livre durante operação do reator anaeróbio para a cultura pura	124
Tabela 5.15 - Valor de DQO do ensaio de produção de H ₂ para a cultura pura.....	124
Tabela 5.16 - Dado experimental do tempo de operação do ensaio e produção máxima de H ₂	124
Tabela 5.17 - Potencial de Produção de H ₂ (P), Taxa Máxima de Produção de H ₂ (R _m), Fase Lag (λ), limites inferior e superior que o modelo calculou e R ² obtidos pela equação de Gompertz modificada	126
Tabela 5.18 - Concentração de metanol no meio líquido para o ensaio da cultura e os dois ensaios envolvendo o consórcio de bactérias (I) e (II) na condição de 100% de glicerol bruto	129
Tabela 5.19 - Relação da geração de 1,3-propapodiol com a porcentagem de glicerol consumido e as produções máximas de H ₂ para a cultura pura e para os ensaios (I)-c e (II)-c.....	130
Tabela 5.20 - Rendimento da produção de H ₂ (mol de H ₂ mol ⁻¹ de glicerol) para o ensaio envolvendo a cultura pura na condição de 100% de glicerol bruto pré-tratado	131
Tabela 5.21 - Estudo comparativo da bioconversão do glicerol bruto à H ₂	132

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PROBIODIESEL Programa Brasileiro de Desenvolvimento Tecnológico de Biodiesel

PNPB Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel

CNPE Conselho Nacional de Política Energética

B2 mistura de 2% de biodiesel ao óleo diesel mineral

B3 mistura de 3% de biodiesel ao óleo diesel mineral

B4 mistura de 4% de biodiesel ao óleo diesel mineral

B5 mistura de 5% de biodiesel ao óleo diesel mineral

Ibiotec Instituto de Biotecnologia do curso de Engenharia de Energias Renováveis da Uniara

Uniara Centro Universitário de Araraquara- SP

Acácia Cooperativa de Catadores de Materiais Recicláveis

DQO Demanda Química de Oxigênio

FID Detector de Ionização por Chama

PTV Programmed Temperature Vaporization

MONG Matéria Orgânica Não Glicerol

UASB Upflow Anaerobic Sludge Blanket

NCBI National Center for Biotechnology Information

PYG Peptone Yeast Glucose

TOGA Transformer Oil Gas Analyser

TCD Detector de Condutividade Térmica

MCA Metros de coluna d'água

STV Sólidos Totais Voláteis

OTU Unidade Taxonômica Operacional

Proálcool Programa Nacional do Álcool

Pro-Óleo Plano de Produção de Óleos Vegetais para Fins Energéticos

CNE Conselho Nacional de Energia

Proinfa Programa de Incentivo às Fontes Alternativas de Energia Elétrica

MCT Ministério da Ciência e Tecnologia

ASTM American Society for Testing and Materials

ONGs Organizações Não Governamentais

PCR Polymerase Chain Reaction

DGGE Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

LISTA DE SÍMBOLOS

P Potencial de Produção de Hidrogênio (mmol L^{-1} cultura)

R_m Taxa máxima de Produção de Hidrogênio (mmol L^{-1} cultura. h)

λ Fase *lag* (h) de geração de H_2

e 2,718281828

m_i Massa do cadinho com a amostra no início do ensaio (g)

m_f Massa do cadinho com a amostra ao final do ensaio (g)

m_{amostra} Massa da amostra de glicerol bruto (g)

V_{ácido} Volume do ácido utilizado na titulação completa da amostra (mL)

M_{cf} Massa do cadinho final (g)

M_{cv} Massa do cadinho vazio (g)

V_a Volume da amostra adicionada no tubo (mL)

V_{HCl} Volume de ácido clorídrico utilizado para reduzir o pH da amostra (mL)

V_{HCl_a} Volume de ácido clorídrico adicionado no tubo (mL)

V_s Volume separado de MONG (mL)

H_2 Gás Hidrogênio

N_2 Gás Nitrogênio

NaOH Hidróxido de Sódio

KOH Hidróxido de Potássio

$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ Dicromato de Potássio

CO_2 Dióxido de Carbono

CH_4 Metano

NAD^+ Nicotinamida adenina dinucleotídio, coenzima hidrossolúvel na sua forma oxidada

NADH Nicotinamida adenina dinucleotídio, coenzima hidrossolúvel na sua forma reduzida

ADP Adenosina difosfato

ATP Adenosina trifosfato

PD 1,3 propanodiol

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	26
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	30
2.1 Biodiesel no mundo e no Brasil	30
2.2 Obtenção do biodiesel de forma convencional	33
2.3 Biodiesel a partir de óleo de cozinha usado	35
2.4 Glicerol: resíduo da geração do biodiesel	37
2.5 Gás Hidrogênio	39
2.6 Produção biológica de hidrogênio a partir do glicerol bruto	40
2.7 Metabolismo do glicerol	43
2.8 Microrganismos envolvidos da produção de H ₂	46
2.9 Pré-tratamento de culturas mistas para a geração de H ₂	50
2.10 Pré-tratamento do glicerol bruto	51
2.11 Reatores anaeróbios em batelada	52
2.12 Plataforma Illumina: <i>Next-Generation Sequencing</i>	53
3 OBJETIVOS	59
3.1 Geral.....	59
3.2 Específicos	59
4 MATERIAIS E MÉTODOS	60
4.1 Esquema operacional	60
4.2 Fonte de Carbono.....	60
4.2.1 Caracterização do Glicerol Bruto	60
4.3 Inóculos.....	66
4.3.1 Reativação	66
4.3.2 Pré-tratamento nos inóculos I, II e III reativados.....	67
4.3.3 Reativação dos inóculos pré-tratados.....	67
4.3.4 Purificação celular.....	67
4.3.5 Enriquecimento dos inóculos purificados	68
4.3.6 Reativação da biomassa enriquecida.....	69
4.4 Ensaios de geração de H ₂ em reatores anaeróbios operados em batelada sequencial	69
4.5 Análises.....	70
4.5.1 Determinação do biogás no <i>headspace</i> dos reatores anaeróbios.....	70
4.5.2 Análise de pressão gasosa	71

4.5.3 Cálculos geração H_2	71
4.5.4 Análise de Crescimento.....	72
4.5.5 Análises microscópicas	72
4.5.6 Determinação de compostos orgânicos no meio líquido.....	73
4.5.7 Determinação de 1,3 propanodiol no meio líquido	73
4.5.8 Análises de Biologia Molecular	73
4.5.9 Ajuste de dados experimentais	75
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	76
5.1 Caracterização do Glicerol Bruto	76
5.2 Pré-tratamento dos inóculos (I), (II) e (III)	82
5.3 Ensaios de geração de hidrogênio para os inóculos (I) e (II).....	86
5.3.1 Análises de crescimento celular	86
5.3.2 Consumo do glicerol nos ensaios de produção do H_2	88
5.3.3 Demanda Química de Oxigênio (DQO).....	90
5.3.4 Produção de hidrogênio.....	92
5.3.5 Cinética da produção de hidrogênio.....	95
5.3.6 Compostos orgânicos do meio líquido	99
5.3.7 Determinação de 1,3- propanodiol	108
5.3.8 Caracterização Filogenética	110
5.3.9 Rendimento da geração de H_2	119
5.4 Ensaios de geração de H_2 para a cultura pura	122
5.4.1 Análise do crescimento celular	122
5.4.2 Consumo do glicerol no ensaio de produção de H_2	123
5.4.3 Demanda Química de Oxigênio (DQO).....	124
5.4.4 Produção de hidrogênio.....	124
5.4.5 Cinética da produção de hidrogênio	126
5.4.6 Compostos orgânicos do meio líquido	127
5.4.7 Determinação de 1,3- propanodiol	130
5.4.8 Rendimento da geração de H_2	131
6 CONCLUSÕES.....	134
7 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	135
REFERÊNCIAS	137
ANEXO A- Obtenção das equações de crescimento microbiano	149

ANEXO B- Obtenção da curva de hidrogênio.....	150
ANEXO C- Determinação de ácidos e álcoois.....	151
ANEXO D- Obtenção da curva de calibração para DQO	152

1 INTRODUÇÃO

O maior destaque no setor de energia e meio ambiente é a fonte de energia “amigável”. A demanda atual da energia global é basicamente dependente das reservas de combustíveis fósseis, sendo recursos finitos que já estão chegando ao esgotamento. A diminuição dos fornecimentos mundiais de petróleo e a instabilidade de seu mercado mundial provocaram a elevação do preço, tanto para combustíveis fósseis, quanto para seus derivados. Além disso, o mundo enfrenta problemas gravíssimos decorrente da poluição gerada pela queima desses combustíveis fósseis. A comunidade científica tem aceitado amplamente o fato de que o aumento dos níveis de CO₂ devido aos recursos fósseis está impactando no efeito estufa e aquecimento global. Assim, diferentes maneiras de se obter energia por meio de fontes limpas e recursos renováveis estão sendo desenvolvidas. Estas razões ecológicas e econômicas promovem o interesse da conversão de biomassa em biocombustíveis, como o biodiesel, que está sendo gerado no mundo todo (GHIMIRE et al., 2015; LEE et al., 2015).

O Programa Brasileiro de Desenvolvimento Tecnológico de Biodiesel, PROBIODIESEL, promove o desenvolvimento científico e tecnológico do biodiesel, visando sua entrada no mercado brasileiro com inserção na matriz energética em função de substituir gradativamente o óleo diesel de origem fóssil. Este programa foi instituído pela Portaria do Ministério da Ciência e Tecnologia nº 702, de 30 de outubro de 2002 (BRASIL, 2002). A realização imediata da mistura de biodiesel ao diesel foi instituída pelo Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (BRASIL, 2015). Esta mistura teve início com a adição de 2% (B2) em 2008, passando a adições sucessivas até se chegar aos 10%, conforme a nova lei nº 13.263 de 23 de março de 2016 (BRASIL, 2016). A contínua elevação do percentual de adição do biodiesel ao óleo diesel demonstra o sucesso do PNPB.

O Brasil está entre os maiores produtores e consumidores de biodiesel no mundo, com produção mensal, em abril de 2016, de 323.158 m³ (AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS, 2016) gerando assim 32.316 m³ de glicerol, pois, durante a produção do biodiesel por meio da transesterificação, um grande volume de glicerol é gerado como coproduto, sendo 10 Kg glicerol para cada 100 kg de biodiesel produzido (SARMA et al., 2012).

Para a produção de biodiesel, convencionalmente emprega-se triglicerídeos, tais como óleos vegetais virgens e gorduras animais que são misturados em reatores com metanol juntamente com catalisadores de hidróxido de sódio (SARMA et al., 2012). O custo requerido para as matérias-primas é o maior problema de comercialização do biodiesel, onde cerca de

70-95% do custo total de sua produção é dependente do custo das matérias-primas empregadas. A utilização de óleo de cozinha usado como matéria-prima reduz os custos de produção do biodiesel para 60-70% (GUPTA et al., 2015).

Pesquisas no Instituto de Biotecnologia (Ibiotec) do curso de Engenharia de Energias Renováveis da Uniara (Centro Universitário de Araraquara- SP) levaram à construção da planta piloto de produção de biodiesel a partir de óleo de cozinha usado, coletado de residências, escolas municipais e estabelecimentos comerciais da cidade de Araraquara-SP. O biodiesel gerado nesta unidade já abastece os caminhões da Cooperativa de Reciclagem Acácia (Cooperativa de Catadores de Materiais Recicláveis) de Araraquara (SP), numa proporção de 50% de diesel comum e 50% do biodiesel, caminhões estes que fazem a coleta de materiais recicláveis e do próprio óleo de cozinha usado para a produção do biodiesel. Além de reutilizarem este resíduo para a produção do biocombustível, já é avaliada a redução de custos com combustível de 50%. Para uma entrada de 80 litros de óleo de cozinha usado (matéria-prima) no processo desenvolvido na planta piloto do Ibiotec são gerados, aproximadamente, 15 litros de glicerol bruto. A presença de ácidos graxos livres neste óleo de cozinha usado geram, no final da reação de transesterificação, produtos saponificados quando na presença do catalisador básico. Estes produtos, assim como boa parte do catalisador e do excesso de álcool, ficam misturados e acumulam-se no glicerol bruto (SEQUINEL, 2013).

Com a geração de glicerol elevada e a dificuldade em ser usado por indústrias farmacêuticas e alimentícias como matéria-prima, devido aos processos de purificação serem onerosos, sua comercialização se torna inviável aumentando assim seus estoques (SARMA et al., 2012). Além do que, sua disposição no meio ambiente sem o tratamento adequado, pode causar problemas de intoxicação, formação de espumas, mau cheiro, dentre outros (VIANA, 2011). Portanto, surge a necessidade de se encontrar caminhos viáveis e alternativos para o glicerol bruto a fim de se manter a sustentabilidade econômica e ambiental da produção de biodiesel.

Alternativamente, o glicerol bruto pode ser usado como substrato para a bioconversão de produtos com valor agregado. O que tem ganhado a atenção de muitos pesquisadores é a produção de gás hidrogênio por meio da digestão anaeróbia do glicerol bruto (SARMA et al., 2013a; SARMA et al., 2013b; SELEMBÓ, et al., 2009; REUNGSANG et al., 2013; KIVISTÖ et al., 2010; MANGAYIL et al., 2012; CHOOKAEW et al., 2015), sendo uma alternativa promissora a aplicação deste biogás como energia limpa.

A ampla utilização de H_2 pode se tornar um dos possíveis caminhos para o desenvolvimento de energia no futuro. Previsões, em longo prazo, do desenvolvimento

mundial de energia mostram que a produção e o consumo de energia do hidrogênio em 2050-2100 podem exceder o nível atual por dezenas ou mesmo centenas de vezes (MARCHENKO; SOLOMIN, 2015).

A quantidade de energia produzida durante a combustão do hidrogênio por unidade de peso é maior do que a liberação por qualquer outro combustível como metano, gasolina e outros. Especificamente, a quantidade de energia liberada durante a reação de combustão do hidrogênio é cerca de 2,5 vezes do poder de combustão de um hidrocarboneto. A principal vantagem do hidrogênio como combustível é a ausência das emissões de CO₂, bem como as emissões de outros poluentes, além de gerar somente como subproduto a água (MARBÁN; VALDÉS-SÓLIS, 2007; SANTOS; SANTOS, 2005).

A produção biológica de hidrogênio vem se desenvolvendo como uma grande área promissora para a geração deste biogás. Tem ganhado destaque os processos de obtenção de hidrogênio por via microbiana, utilizando culturas mistas com substratos não esterilizados, uma vez que estes processos são mais práticos e robustos do que os que utilizam culturas puras bem definidas, além do que promove o reaproveitamento de materiais residuais, diminuindo assim a quantidade de subprodutos armazenados nas indústrias (SÁ et al., 2014).

A produção biológica de hidrogênio por fermentação na ausência de luz compartilha muitas características em comum com a metanogênese. Culturas mistas tipicamente anaeróbias podem não produzir hidrogênio uma vez que este é rapidamente consumido pelas arqueias metanogênicas. Entretanto, o caminho mais efetivo para se aumentar a produção de hidrogênio em culturas mistas anaeróbias é restringir a metanogênese permitindo que o hidrogênio se torne um produto final da rota metabólica. Sendo assim, pré-tratamentos em inóculos para obtenção de consórcios de bactérias anaeróbias têm sido usados como forma de selecionar grupos específicos de bactérias (ROSSI et al, 2011).

Além disso, alguns problemas também podem ser encontrados durante a digestão anaeróbia do glicerol bruto, como inibição do consórcio anaeróbio causado por impurezas presentes como sais, metanol, sabão, sendo este último, o majoritário presente no glicerol bruto. A remoção de sabões contidos no glicerol bruto pode se dar pelo ajuste do pH à condições ácidas, convertendo-os a ácidos graxos insolúveis (SARMA et al., 2012).

Nesse sentido, foi utilizado nesse estudo o glicerol bruto, proveniente da planta piloto do processo de transesterificação do óleo de cozinha usado, em reatores anaeróbios em batelada visando à geração de gás hidrogênio, por meio da fermentação de culturas mistas pré-tratadas, além de ter sido feito um comparativo com cultura pura *Enterobacter* sp. Foi realizada a caracterização deste glicerol bruto e posterior aplicação em reatores anaeróbios em

batelada em proporções crescentes de glicerol bruto até que se atingisse 100% deste com consequente geração de H_2 , assim como a identificação dos consórcios bacterianos presentes por técnicas de Biologia molecular.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biodiesel no mundo e no Brasil

Os primeiros relatos de uso de óleo vegetal como combustível para possíveis aplicações comerciais foram em 1978 nos Estados Unidos. Metil ésteres passaram a ser produzidos a partir da colza, na Alemanha e na Áustria, se estabelecendo neste último país, uma pequena planta piloto de produção de biodiesel em 1985. A produção comercial de biodiesel passou a existir mais tarde, em 1990 na Europa (ANWAR et al., 2016).

A primeira referência no Brasil do uso de óleos vegetais como combustível aconteceu em 1920, onde muitas universidades começaram a investir na pesquisa referente ao uso destes óleos que passaram a ser misturados com o diesel do petróleo como combustível. Em 1973, a crise do petróleo foi impactante na economia mundial, levando a intensificação das pesquisas com o uso de combustíveis renováveis, com o lançamento dos programas Proálcool e Probiodiesel a fim de se superar a crise (BERGAMANN et al., 2013).

Em 1980, o programa Pro-Óleo, Plano de Produção de Óleos Vegetais para Fins Energéticos, foi criado pelo Conselho Nacional de Energia (CNE), cujo objetivo principal deste estudo foi substituir parcialmente o diesel do petróleo por uma mistura de óleos vegetais de até 30% em volume. Assim, o Governo promoveu a pesquisa tecnológica que poderia tornar a produção possível em várias regiões do país. Em 1981, os estudos foram focados no óleo de soja, seguido pela colza, girassol em 1982 e dendê em 1986. Em 1985 provou-se tecnicamente que os óleos vegetais eram substitutos adequados para o óleo diesel, sendo obtida neste mesmo ano, a primeira patente brasileira de obtenção de biodiesel (CÉSAR et al., 2010).

A redução dos preços do barril do petróleo, que começou em 1986, levou estes estudos a perder a importância e o Pro-Óleo foi abandonado. O Governo reiniciou os investimentos no biodiesel nos anos seguintes, devido às mudanças climáticas com o aquecimento global e com o aumento dos preços do barril do petróleo. Embora não só aplicados para o biodiesel, a lei nº 9.991/2000 pôde ser vista como um estímulo para o desenvolvimento desta cadeia. De acordo com esta lei, 1% da receita operacional líquida das empresas de operação, 2% das empresas de transmissão e 0,75% das empresas de distribuição de energia no país, deveria ser investido em pesquisa e desenvolvimento do setor elétrico nacional. Da mesma forma, o Programa de Incentivo às Fontes Alternativas de Energia Elétrica (Proinfa), criado pela lei nº 10.438/2002

(e revisado pela lei nº 10.762/2003) visou encontrar soluções regionais viáveis para o uso de fontes renováveis de energia (CÉSAR et al., 2010).

Em 2002, com a diretiva nº702, o Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT) instituiu a Rede de Investigação e Desenvolvimento Tecnológico (Probiodiesel), destinada a promover o desenvolvimento científico e tecnológico do biodiesel proveniente de ésteres etílicos de óleos vegetais puros e/ou residuais (BRASIL, 2002). Em 2003, por meio do decreto nº 07/02/2003, uma comissão ministerial coordenada pela Casa Civil foi criada para definir a base para o Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB), que foram divididos em três pilares da sustentabilidade: social, econômica e ambiental. O relatório considerou que o biodiesel deveria ser imediatamente introduzido na matriz energética brasileira, embora seu uso não devesse ser obrigatório. Além disso, o programa PNPB não devia estabelecer rotas ou matérias-primas para a produção de biodiesel, considerando ainda que a sua produção devesse ser usada como uma ferramenta para proporcionar inclusão social e promover o desenvolvimento social e econômico nas regiões menos desenvolvidas do país. A ação mais importante do PNPB foi a aprovação da lei nº 11.097/2005, que estabeleceu a sua adição de 2% no óleo diesel produzido no Brasil, em 2008. Desde então, a produção de biodiesel atendeu essa demanda e o setor vem se desenvolvendo rapidamente (CÉSAR et al., 2010).

No ano de 2007, a produção ultrapassou 400.000 m³ e em 2008 atingiu 1161.202 m³. A lei nº 11.097/2005, que estabeleceu uma adição obrigatória de 2% de biodiesel ao diesel mineral (B2) foi um fator importante para promover esse crescimento, gerando uma demanda estimada em 800 milhões litros de biodiesel por ano. A resolução nº 2 do Conselho Nacional de Política Energética (CNPE), publicado em março de 2008, estabeleceu a obrigatoriedade da adição de 3% de biodiesel no óleo diesel (B3), com início em julho de 2008 e em maio de 2009 foi estabelecida a adição obrigatória B4 no início de julho de 2009. O primeiro incremento obrigatório de 1% na mistura, B3, representou um aumento de cerca de 200 milhões de litros no ano de 2008 superando 1 bilhão de litros, que promoveu um desenvolvimento mais rápido do segmento elevando as expectativas dos setores produtivos. A meta de adição de 5% de biodiesel (B5) para o diesel comum, prevista somente para 2013, foi atingida em 2010, gerando uma demanda de cerca de dois bilhões de litros de biodiesel por ano (CÉSAR et al., 2010).

Em 2010, o Brasil se tornou o segundo maior produtor de biodiesel no mundo com uma produção de 2,4 milhões m³ ficando atrás da Alemanha, o maior produtor de biodiesel em 2010 com uma produção de 2,8 milhões m³. Em 2011, apesar do aumento na produção de biodiesel do Brasil para 2,6 milhões m³, esta foi superada pelos Estados Unidos, que produziu

3,7 milhões de m³ e Argentina, que produziu 2,7 milhões de m³ de biodiesel. A Alemanha manteve a produção em 2,8 milhões m³. No ranking mundial, o Brasil está entre os maiores produtores e isto é resultado dos investimentos realizados em pesquisa e produção de biodiesel devido ao programa governamental (BERGAMANN et al., 2013).

A Lei nº 13.033, de 24 de setembro de 2014 dispôs sobre a adição obrigatória de biodiesel ao óleo diesel comercializado com o consumidor final, ficando estabelecidos os seguintes percentuais de adição obrigatória de biodiesel ao óleo diesel, medidos em volume, em qualquer parte do território nacional: 6% a partir de 1º de julho de 2014 e 7% a partir de 1º de novembro de 2014 (BRASIL, 2014).

Em 23 de março de 2016, a nova lei nº 13.263 alterou a lei nº 13.033, passando a vigorar as seguintes modificações sobre os percentuais de adição obrigatória, em volume, de biodiesel ao óleo diesel: 8% em até doze meses após a data de promulgação desta Lei; 9% em até vinte e quatro meses após a data de promulgação desta Lei e 10% em até trinta e seis meses após a data de promulgação desta Lei (BRASIL, 2016). A contínua elevação do percentual de adição do biodiesel ao óleo diesel demonstra o sucesso do PNPB.

O setor brasileiro de produção de biodiesel prevê um investimento de R\$ 28 bilhões para 2020, atingindo um consumo interno de 3,1 milhões de toneladas de combustível. Além disso, espera-se que a substituição de diesel por biodiesel atinja 20% no final da década. Globalmente, a perspectiva para 2020 também é bastante promissora, dada a estimativa de produção de 41,9 bilhões de litros de biodiesel, com os Estados Unidos, Brasil e Índia representando cerca de 75% deste montante (CREMONEZ et al., 2015).

Segundo as previsões, a produção e consumo de biodiesel no Brasil evoluem em taxa linear principalmente devido ao aumento da demanda do combustível e ao consequente aumento da frota veicular brasileira e a perspectiva de elevação da mistura de biodiesel/diesel nos anos seguintes (CREMONEZ et al., 2015).

Apesar dos aumentos da mistura de biodiesel/diesel para os anos seguintes, em algumas capitais nacionais, a B20 (20% de biodiesel com 80% de diesel convencional) já é uma realidade. Em São Paulo, por exemplo, a chamada EcoFrota tem mais de 3070 ônibus usando B20. Em Curitiba, capital do Paraná, a frota de transporte público utiliza biodiesel desde 2009 e em 2011 foi lançado um ônibus chamado MegaBRT sendo abastecido com 100% de biodiesel (CREMONEZ et al., 2015).

De acordo com Pinto e colaboradores (2005), os futuros desafios relacionados à obtenção do biodiesel devem envolver o desenvolvimento de novos processos de transesterificação com a possibilidade de redução dos coprodutos e custos com a separação e

purificação do biodiesel, incluindo políticas subsidiárias de base para financiar o cultivo de oleaginosas, garantindo o preço, infraestrutura, logística de transporte, segmento de tecnologia, ressaltando a investigação para os novos usos do glicerol, coproduto deste processo (PINTO et al., 2005).

2.2 Obtenção do biodiesel de forma convencional

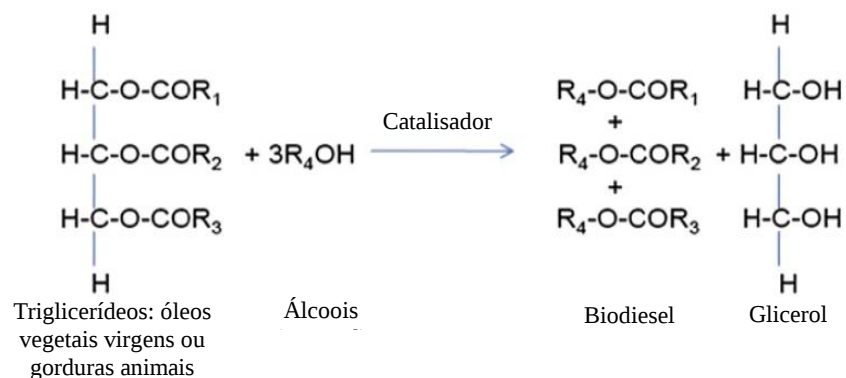
Os combustíveis fósseis são a maior fonte de energia, correspondendo a cerca de 80% da demanda da energia global. Entretanto, suas reservas têm chegado ao esgotamento, além de que sua combustão provoca impactos negativos no aquecimento global. Tal situação mobilizou uma rápida busca por fontes alternativas de energia em todo mundo. Os biocombustíveis tem se tornado uma fonte de energia renovável podendo substituir os combustíveis fósseis. O biodiesel é, portanto, um dos biocombustíveis mais investigados (SARMA et al., 2012), apresentando reduções significativas das emissões de CO₂ durante sua combustão quando comparado aos combustíveis fósseis comumente usados (ANWAR et al., 2016).

A palavra "Biodiesel" foi definido pela American Society for Testing and Materials (ASTM) como um mono-alquil éster de ácidos graxos ou éster (m)etílico de ácido graxo derivado a partir de matérias-primas renováveis, tais como os óleos vegetais. O termo "bio" indica a origem biológica de biodiesel, em contraste com o diesel convencional. O biodiesel é um líquido com uma coloração amarelo claro ou escuro. Tem um ponto de ebulição superior a 200°C e um ponto de inflamação entre 145-175°C (YAAKOB et al., 2013). Além disso, ele oferece várias vantagens, incluindo renovabilidade, biodegradabilidade, toxicidade insignificante, ambientalmente amigável quanto às emissões durante a combustão, maior eficiência de combustão, maior número de cetano, maior ponto de fulgor, contém 10-11% de oxigênio em peso e melhor lubrificação. O conteúdo de energia e as propriedades físico-químicas do biodiesel são quase semelhantes ao combustível diesel convencional e por isso, pode ser usado por si só ou misturado com diesel convencional nos motores de ignição-compressão convencionais existentes sem grandes modificações (FAROOQ et al., 2013).

Os óleos naturais possuem uma viscosidade de 10 a 17 vezes maior do que o diesel de petróleo e por isso a sua utilização da forma bruta como combustível provoca danos nos motores. A fim de se reduzir a viscosidade, é necessário que o óleo vegetal bruto seja convertido em biodiesel por meio de um processo de esterificação ou transesterificação (BERGMANN et al., 2013).

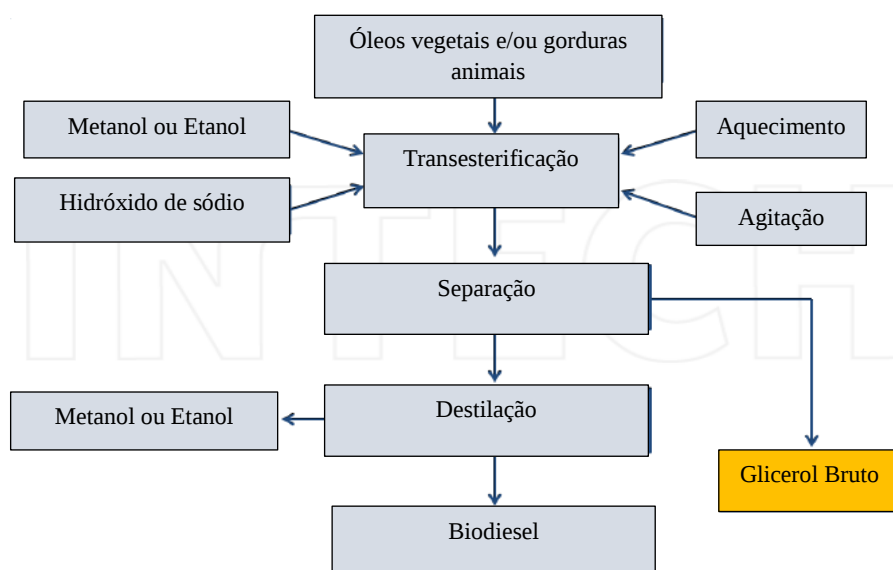
Para a obtenção de biodiesel, convencionalmente empregam-se triglicerídeos (óleos vegetais virgens ou gorduras animais) e álcool (metanol ou etanol) na presença de um catalisador (hidróxido de sódio) (Fig. 2.1), onde a mistura é agitada e aquecida até a temperatura de ebulição do metanol. Quando a agitação para, ocorre uma separação da mistura em duas fases, sendo a fase superior correspondendo a metil éster de ácidos graxos, que é o biodiesel, e a fase inferior corresponde ao glicerol bruto contendo metanol que não reagiu, sais e substâncias sólidas presentes nas matérias-primas (Fig. 2.2). Para cada 10 volumes de biodiesel, cerca de 1 volume de glicerol bruto é gerado como resíduo do processo (SARMA et al., 2012).

Figura 2.1 - Reação de transesterificação



Fonte: Modificado de Sarma et al. (2012).

Figura 2.2 - Representação esquemática da produção de biodiesel pelo método de transesterificação



Fonte: Modificado de Maintinguer et al. (2015).

A transesterificação pode ser feita na presença de catalisadores ácidos ou básicos, podendo ser homogêneos ou heterogêneos. O hidróxido de sódio (NaOH) é largamente usado como catalisador homogêneo devido à sua eficiência e preço baixo. Quanto aos álcoois, diferentes tipos podem ser empregados, como etanol, propanol, butanol e metanol, sendo este último o mais comumente usado nas rotas de produção de biodiesel no Brasil e no mundo por apresentar eficiência mais elevada, ocorrer em um tempo mais curto e temperatura mais baixa (60°C) em comparação a outros álcoois (BERGAMANN et al., 2013).

O requerimento das matérias-primas, convencionalmente usadas no processo de transesterificação, é o principal problema para a comercialização do biodiesel, onde cerca de 70-95% do custo total da produção de biodiesel é dependente do custo das matérias-primas empregadas. Os gastos com a produção de biodiesel podem ser reduzidos em até 60 a 70%, usando óleo de cozinha usado como matéria-prima, que também acaba por resolver o problema de descarte deste resíduo (GUPTA et al., 2015).

2.3 Biodiesel a partir de óleo de cozinha usado

O uso de fontes de alimento (óleo comestível) para produzir biodiesel tem recebido duras críticas de várias organizações não governamentais (ONGs) devido à justificativa de que milhões de pessoas enfrentam a fome em todo o mundo, o que ocasiona certa incoerência a sua utilização como combustível. Além disso, o aumento resultante na demanda por óleo vegetal promove a devastação desnecessária de florestas para sua plantação (YAAKOB et al., 2013).

O uso de óleo de cozinha usado como matéria-prima do biodiesel pode reduzir problemas sendo que sua disposição via drenagem ou aterramento sanitário pode causar poluição das águas, do solo e distúrbios no ecossistema aquático (YAAKOB et al., 2013). Vale ressaltar a redução de custos durante a produção de biodiesel usando óleo de cozinha usado, tendo em vista que o seu preço é duas a três vezes mais barato do que os óleos vegetais virgens (KIAKALAIEH et al., 2013).

A quantidade de óleo de cozinha usado gerada pelas casas e restaurantes estão aumentando rapidamente devido ao crescimento da população, ocasionando no aumento do consumo de alimentos. As fontes de óleo de cozinha diferem por todo o mundo, sendo lipídios à base de plantas, tais como, óleo de milho, margarina, óleo de coco, palma, oliva, soja, semente de uva e canola ou proveniente de lipídios animais, tais como manteiga e óleo de peixe (YAAKOB et al., 2013). Considerando que os óleos de fritura provêm destas fontes

distintas, isso faz com que se aumente a variabilidade de características do biodiesel formado (DIYA'UDDEEN et al., 2012).

O processo de fritura do óleo de cozinha envolve seu aquecimento por tempo variado, na presença de ar em temperaturas de 160 a 200°C. Isto faz com que os óleos sejam degradados através de reações de hidrólise, oxidação e craqueamento, resultando em aumento da viscosidade e acidez, bem como associado a um odor desagradável e uma coloração mais escura (DIYA'UDDEEN et al., 2012). A quantidade de calor e água aumenta a hidrólise de triglicerídeos e o percentual de ácidos graxos livres no óleo. A água e o teor de ácidos graxos livres tem uma influência negativa sobre a reação de transesterificação para a geração de biodiesel (KIAKALAIEH et al., 2013). A presença de água no óleo de cozinha usado leva à hidrólise e altas taxas de ácidos graxos livre leva à formação de produtos saponificados, resultando em baixos rendimentos de biodiesel gerado (YAAKOB et al., 2013). Além deste aspecto negativo quanto à utilização de óleo de cozinha usado na reação de obtenção do biodiesel, o sabão formado consome parcialmente o catalisador empregado na reação de transesterificação e a separação de ésteres de ácidos graxos (biodiesel) e glicerol (resíduo do processo) é dificultada (KIAKALAIEH et al., 2013).

De acordo com Diya'uddeen et al., (2012), apesar destas limitações, várias abordagens têm sido feitas a fim de se resolver o problema e um rendimento ótimo de 99,3% foi registrado para a geração de biodiesel a partir de óleo de cozinha usado.

Atualmente, a maior parte do óleo de cozinha usado, ou é descartado ou é comercializado para a utilização como aditivos na alimentação animal, apesar da proibição da sua utilização na formulação de rações. Assim, a produção de biodiesel a partir de óleo de cozinha usado pode ser uma abordagem eficaz e econômica de gerir esta fonte de energia, proporcionando um benefício duplo de geração de combustível e proteção do meio ambiente (DIYA'UDDEEN et al., 2012).

O biodiesel a partir desta matéria-prima é ambientalmente aceito devido a menores emissões de poluentes atmosféricos, em comparação com diesel do petróleo, por exemplo, monóxido de carbono, hidrocarbonetos não queimados, partículas em suspensão, dióxido de enxofre, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e fumaça foram reduzidos em intervalos de 15-60%, 21-45%, 23-63%, 50-100%, 8-40 % e 16-83%, respectivamente (DIYA'UDDEEN et al., 2012).

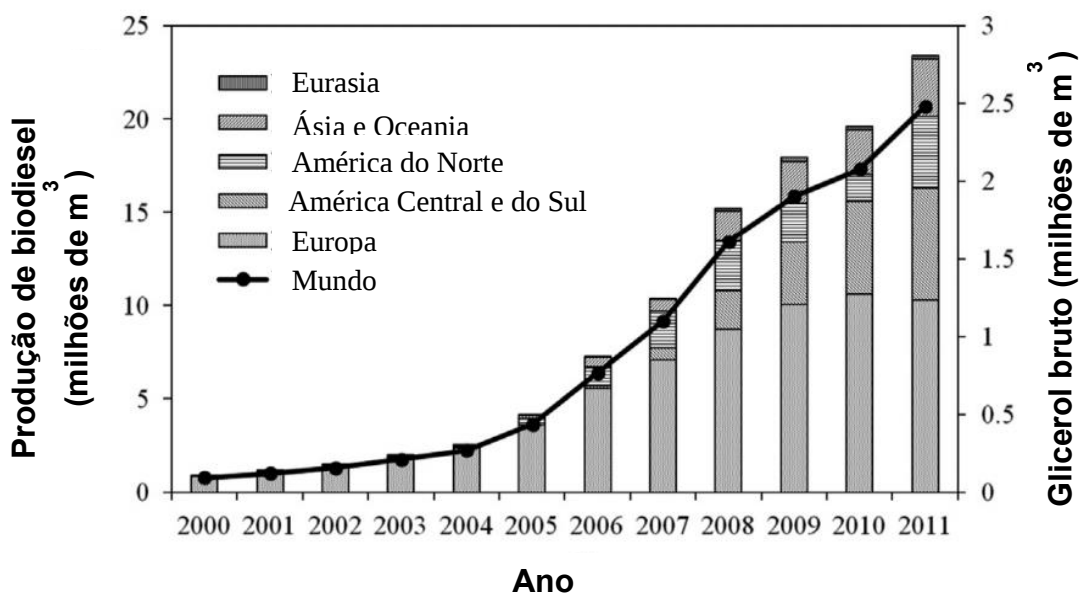
Como esta matéria-prima está prontamente disponível, seu custo de obtenção é reduzido. Segundo Diya'uddeen e colaboradores (2012), o óleo de cozinha usado pode potencialmente substituir o combustível diesel em curto prazo e no longo prazo reduzir a

dependência do uso de combustíveis à base de petróleo. De acordo com Yaakob e colaboradores, (YAAKOB et al., 2013), o óleo de cozinha usado é esperado ser o mais importante na produção futura de biodiesel do que os óleos comestíveis e não-comestíveis, devido ao baixo custo e como alternativa mais sustentável.

2.4 Glicerol: resíduo da geração do biodiesel

Nos últimos anos, a produção de biodiesel aumentou consideravelmente, juntamente com a quantidade de resíduos gerados durante a produção, o glicerol bruto (Fig. 2.3). A Europa ainda é o maior produtor de biodiesel e o Brasil tem o maior aumento na taxa de produção nos últimos anos em comparação com os Estados Unidos e Europa, isto é, de 736 m³ em 2005 para 2.670.000 m³ em 2011 (GHOLAMI et al., 2014).

Figura 2.3 - Produção mundial de biodiesel (barras) e glicerol bruto (linhas) entre 2000 e 2010



Fonte: Modificado de Gholami (2014).

O glicerol bruto é o principal resíduo da indústria do biodiesel, que cresceu rapidamente nas últimas décadas devido às preocupações ambientais quanto às liberações de poluentes, efeito estufa e esgotamento dos combustíveis fósseis. A expansão da indústria de biodiesel tem levado a um aumento de 100% na produção global de glicerol bruto nos últimos dez anos atingindo uma produção anual total de 1,5 bilhões de kg em 2011. Com um aumento

tão drástico na produção deste coproduto, seu preço diminuiu drasticamente de \$400 por tonelada em 2001 para menos de \$100 por tonelada em 2011 (VALERIO et al., 2015).

Novo aumento da produção de biodiesel está previsto em muitos países ao redor do mundo com a associação à geração de glicerol bruto como um coproduto adicionando pressão para um mercado já saturado de glicerol. Em 2020, espera-se dobrar a quantidade de glicerol bruto produzido atingindo uma produção global de 2,6 bilhões de quilos (VALERIO et al., 2015). Para cada 10 volumes de biodiesel produzido, 1 volume de glicerol é gerado como resíduo do processo (SARMA et al., 2012), conforme descrito anteriormente.

Ao contrário de glicerol puro (glicerina), o glicerol bruto contém muitas impurezas provenientes do processo de produção de biodiesel, sendo as principais: sabão, metanol, quantidade variada de água, resíduos de catalisadores, ácidos graxos livres, triglicerídeos que não reagiram no processo de transesterificação, produtos intermediários da reação como diglicerídeos e monoglicerídeos (VALERIO et al., 2015 e SARMA et al., 2012). A quantidade de cada componente no glicerol bruto depende tanto do óleo empregado como matéria-prima quanto do processo utilizado para a síntese de biodiesel, sendo que teores de glicerol abaixo dos 30% são bastante comuns dependendo da eficiência do processo de produção e da qualidade de separação de fases ao final da reação de transesterificação (SEQUINEL, 2013).

O grande problema deste glicerol bruto proveniente da produção do biodiesel é justamente a sua contaminação com os resíduos desse processo da transesterificação. Tendo em vista que o foco dos produtores de biodiesel era também obter uma glicerina em grau farmacêutico, havia a necessidade de realização de pré-tratamento e purificação deste coproduto por meio de uma destilação à pressão reduzida e com a utilização de altas temperaturas, que eram os meios mais eficazes de se retirar de forma quantitativa o metanol residual e as demais impurezas. Estes processos de purificação do glicerol bruto são caros e, portanto, suas aplicações em indústrias de alimentos, farmacêutica e de cuidados pessoais não são economicamente viáveis (SEQUINEL, 2013; SARMA et al., 2012). Além disso, sua disposição no meio ambiente sem o tratamento adequado pode causar problemas de intoxicação, formação de espumas, mau cheiro, dentre outros (VIANA, 2011).

Sendo assim, todo este contexto fez com que vários fabricantes passassem a estocar grandes volumes da substância, criando um passivo ambiental em potencial. Portanto, surge a necessidade de se encontrar caminhos viáveis e alternativos para o glicerol bruto a fim de se manter a sustentabilidade econômica e ambiental da produção de biodiesel.

Alternativamente, o glicerol bruto pode ser usado como substrato para a bioconversão de produtos com valor agregado, onde diferentes pesquisadores têm chegado a um grande número de produtos, sendo alguns deles o 1,3-propanodiol (DROŹDŹYŃSKA et al., 2011; METSOVITI, et al. 2012; LIU et al. 2013; PFLÜGL et al., 2014), acetato e metano (ZHANG et al., 2015), etanol (ITO et al., 2005; SUZUKI et al., 2015), ácido propiônico (ZHANG; YANG, 2009), ácido butírico e acético (FORREST et al., 2010), ácido fumárico (ZHOU et al., 2014), ácido docosaheptaenoico (ETHIER et al., 2011).

Outro produto de grande interesse que tem ganhado a atenção de muitos pesquisadores é a produção de gás hidrogênio por meio da digestão anaeróbia do glicerol bruto (SARMA et al., 2013a; SARMA et al., 2013b; SELEMBO, et al., 2009; REUNGSANG et al., 2013; KIVISTÖ et al. 2010; MANGAYIL et al., 2012; CHOOKAEW et al., 2015), sendo uma alternativa promissora a aplicação deste biogás como energia limpa.

O glicerol bruto gerado da produção de biodiesel é considerado como uma boa matéria-prima para a produção microbiana de hidrogênio, sendo uma excelente fonte de carbono para os microrganismos, porém, há a necessidade do pré-tratamento antes da sua utilização (SARMA et al., 2012).

2.5 Gás Hidrogênio

A demanda de energia do mundo tem crescido especialmente nos países em desenvolvimento devido à industrialização e crescimento econômico. No momento, recursos de combustíveis fósseis como o carvão, petróleo bruto e fornecimento de gás natural correspondem a quase 80% da demanda global de energia. Combustíveis à base de petróleo estão confinados às reservas concentradas em regiões específicas do mundo. No ritmo atual de consumo de combustíveis fósseis, as reservas estão previstas para se esgotarem em menos de 50 anos (HOSSEINI et al., 2016).

Quando a tecnologia de produção de hidrogênio receber um apoio moderado ou forte, o uso de petróleo e carvão cairá para 40,5% e 36,7%, respectivamente em 2030. Um quinto do CO₂ mundial liberado é gerado pelo setor de transportes, que responde cerca de 60% do consumo mundial de petróleo. Por isso, a transição para a utilização de combustíveis alternativos de transporte, como o biodiesel, hidrogênio e etanol é vital no cenário energético futuro do mundo (HOSSEINI et al., 2016).

Entre as alternativas de fontes de energia possíveis, o hidrogênio parece promissor para aplicações de transporte devido a três quesitos: redução das emissões de gases de efeito

estufa, segurança energética e redução da poluição do ar local. Os avanços na tecnologia de célula de combustível no final dos anos 1990 e uso do hidrogênio nos motores de combustão interna sem recorrer em grandes investimentos são as principais razões por trás do crescente interesse em hidrogênio especialmente para aplicação em transporte (SINGH et al., 2015).

A quantidade de energia produzida durante a combustão do hidrogênio por unidade de peso é maior do que a liberação por qualquer outro combustível como metano, gasolina e outros, uma vez que o hidrogênio é o elemento mais leve e não possui os pesados átomos de carbono. É por este motivo que o hidrogênio tem sido usado intensamente nos programas espaciais onde o peso é crucial. Especificamente, a quantidade de energia liberada durante a reação de combustão do hidrogênio é cerca de 2,5 vezes do poder de combustão de um hidrocarboneto (MARBÁN; VALDÉS-SOLOMIN, 2007; SANTOS; SANTOS, 2005).

A produção atual de hidrogênio pode ser conseguida por métodos físico-químicos ou biológicos. A produção biológica de hidrogênio a partir de substratos naturais e residuais, tais como águas residuais ricas em açúcares, celulose, resíduos sólidos urbanos, caldo de cana, celulose do milho e papel têm sido relatados (ROSSI et al., 2011).

Formas alternativas de produção biológica de H_2 são potencialmente mais atraentes com o uso de resíduos de biomassa ou resíduos orgânicos baratos e abundantes como substratos para fermentação. Fermentação na ausência de luz para a produção de H_2 tem vantagens sobre foto-fermentação em termos de produção mais rápida, técnica simples e nenhuma exigência de energia luminosa (PACHAPUR et al. 2015a).

2.6 Produção biológica de hidrogênio a partir do glicerol bruto

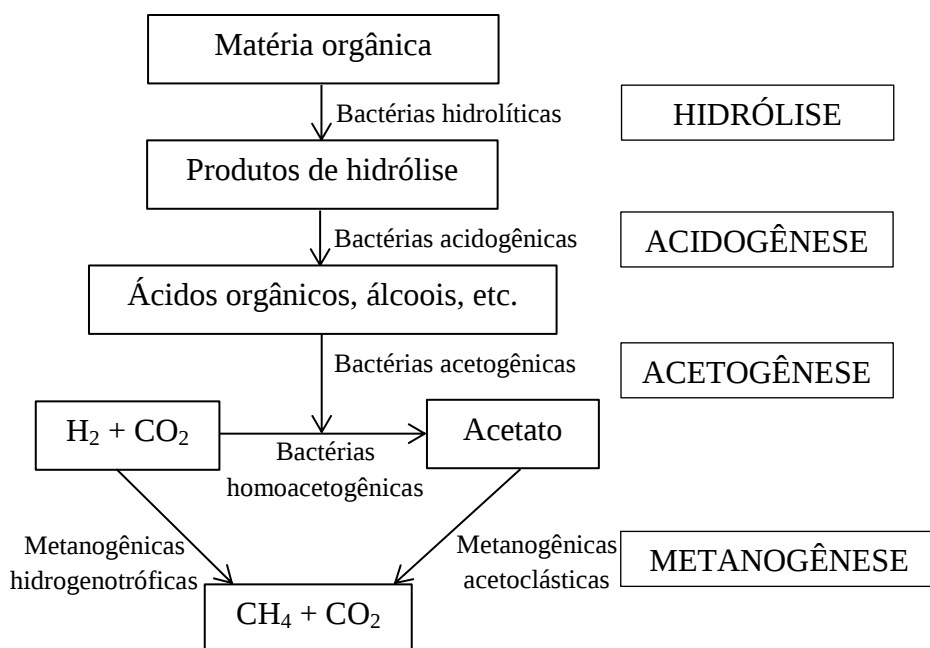
Produção biológica de hidrogênio ou biohidrogênio é uma área nova de tecnologia de processamento de combustível que propõe a produção de hidrogênio a partir de várias fontes renováveis. A investigação sobre a produção de hidrogênio com bactérias anaeróbias começou na década de 1980 e foi desenvolvida devido às suas características ambientalmente amigáveis. Bactérias fermentativas e cianobactérias são os tipos de microrganismos envolvidos na produção de hidrogênio (HOSSEINI et al., 2016).

A fermentação consiste em um processo biológico no qual um consórcio de microrganismos ou cultura pura promove a transformação de compostos orgânicos complexos (carboidratos, proteínas e lipídios) em produtos mais simples, tais como ácidos orgânicos voláteis (ácidos isobutírico, propiônico, acético e butírico), álcoois (etanol, butanol), H_2 e CO_2 (SÁ et al., 2014).

A degradação da matéria orgânica em ambientes anaeróbios envolve a cooperação de diferentes microrganismos. Quatro etapas principais são responsáveis por essa degradação: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese (Figura 2.4). A etapa inicial corresponde à hidrólise, onde bactérias hidrolíticas produzem enzimas extracelulares que promovem a degradação dos materiais particulados complexos em materiais mais simples, os quais são permeáveis às membranas celulares das bactérias fermentativas. Durante a etapa acidogênica, os produtos solúveis oriundos da etapa anterior são metabolizados no interior das células das bactérias, sendo convertidos em compostos mais simples, sendo eles os ácidos orgânicos voláteis, álcoois, CO_2 e H_2 . Na etapa seguinte, as bactérias acetogênicas são responsáveis pela oxidação dos produtos gerados na fase acidogênica em substrato apropriado (H_2 e ácido acético) para as arqueias metanogênicas, onde o H_2 pode também ser convertido em ácido acético pelas bactérias homoacetogênicas. A última etapa do processo corresponde à presença das arqueias metanogênicas, que convertem o H_2 e o ácido acético em CH_4 e CO_2 . Em função de sua afinidade pelo substrato, as arqueias metanogênicas podem ser divididas em metanogênicas acetoclásticas (arqueias que utilizam o ácido acético como substrato) e metanogênicas hidrogenotróficas (arqueias que utilizam o hidrogênio como substrato) (SÁ et al., 2014).

A rota de fermentação é um dos métodos de produção de hidrogênio mais promissor, que pode garantir o futuro da economia do hidrogênio sustentável. Atualmente, uma série de estudos tem sido realizada por diferentes pesquisadores sobre o conceito de "lixo zero" (HOSSEINI et al., 2016). Uma grande vantagem da produção fermentativa de hidrogênio é o largo espectro de substratos aplicáveis, permitindo a possibilidade de acoplar o aproveitamento energético de biomassa, como o glicerol bruto, à geração de hidrogênio com o tratamento simultâneo de materiais residuais (SARMA et al., 2012).

Figura 2.4 - Representação esquemática das etapas envolvidas na fermentação anaeróbia



Fonte: Modificado de Sá et al., (2014).

O glicerol é uma matéria-prima que pode ser utilizada por muitos microrganismos para o seu crescimento e tem sido extensivamente estudado pelo seu potencial de produção de hidrogênio. O conteúdo energético de glicerol puro é 19,0 MJ/kg; e para o glicerol bruto é 25,30 MJ/kg, que pode ser devido à presença de metanol e vestígios de biodiesel. Tal conteúdo de alta energia no glicerol bruto indica seu alto potencial para ser um substrato eficaz para a produção de hidrogênio (SARMA et al., 2012).

Vários pesquisadores tem estudado o potencial de geração de hidrogênio a partir do glicerol bruto oriundo da produção de biodiesel. Selembo et al. (2009) utilizou em seus estudos (reatores em batelada a 30°C) um glicerol bruto proveniente da produção de biodiesel a partir de óleo de soja, utilizando culturas mistas para a bioconversão à hidrogênio, obtendo como rendimento máximo 0,31 mol H₂ mol⁻¹ glicerol.

A pesquisa de Ngo e colaboradores (2010) foi relacionada à eficiência da conversão do glicerol bruto em biohidrogênio usando a cultura pura *Thermotoga neapolitana* DSM 4359. O experimento foi conduzido em um reator em batelada a 75°C obtendo como rendimento máximo 2,73 ± 0,14 mol H₂ mol⁻¹ glicerol consumido.

Sarma e colaboradores (2013b) trabalharam com um glicerol bruto oriundo da produção de biodiesel a partir de óleos residuais de restaurantes utilizando a cultura pura

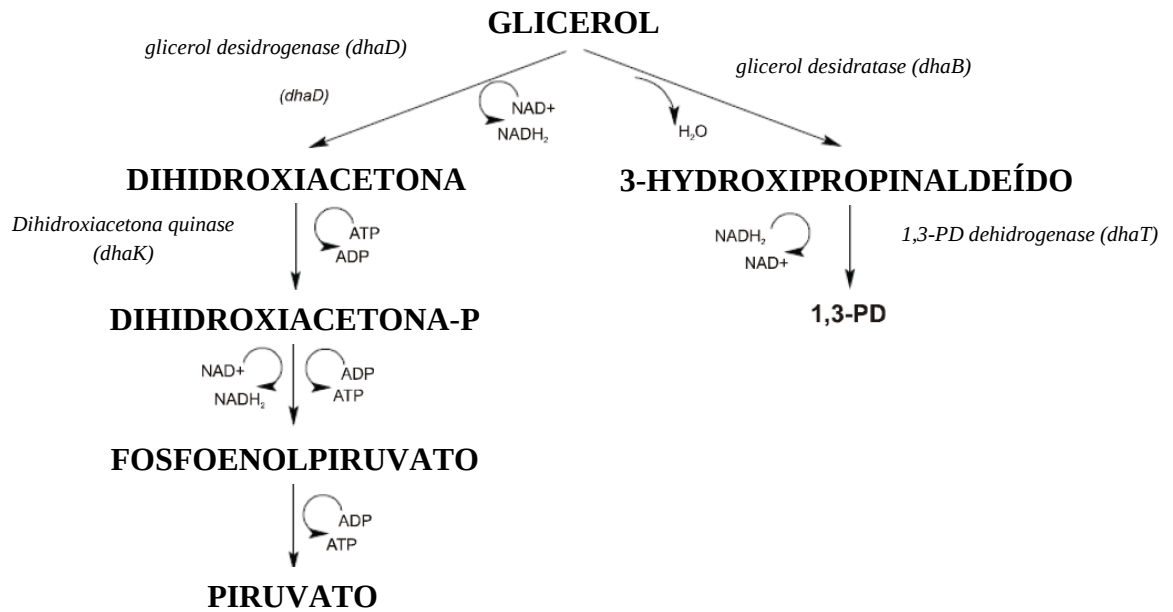
Enterobacter aerogenes NRRL B 407, em reatores em batelada e a 30°C, obtendo como produção máxima acumulada de hidrogênio $116,41 \pm 3,72 \text{ mmol H}_2 \text{ L}^{-1}$.

Na pesquisa desenvolvida por Varrone e colaboradores (2013), foi utilizado lodo ativado enriquecido, um consórcio caracterizado por bactérias do gênero *Klebsiella*, *Escherichia/Shigella* e *Cupriavidus* para a montagem dos reatores em batelada a 37°C no estudo da bioconversão do glicerol bruto proveniente da produção de biodiesel à hidrogênio, cujo rendimento máximo foi de $0,90 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}$ glicerol.

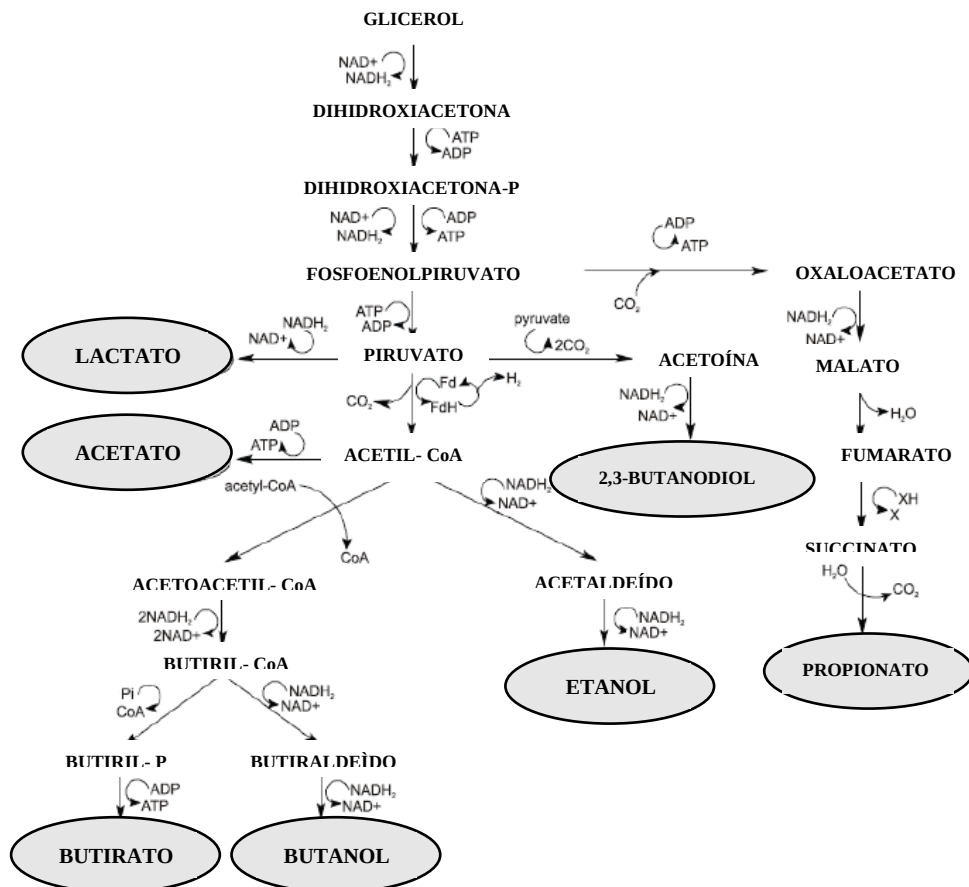
Assim, para serem determinados os rendimentos de hidrogênio gerados durante a fermentação do glicerol bruto, deve-se compreender o metabolismo de decomposição deste substrato, bem como as rotas desta bioconversão.

2.7 Metabolismo do glicerol

O metabolismo do glicerol e produção de hidrogênio podem ser dados por meio de duas rotas, a oxidativa e a redutiva, conhecida para algumas espécies produtoras de hidrogênio como a *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Clostridium* e *Enterobacter* (PACHAPUR et al., 2015b; DROŹDŹYŃSKA et al., 2011). Na rota oxidativa (Figura 2.5), o glicerol é primeiramente convertido a dihidroxiacetona, reação esta catalisada pela enzima glicerol dehidrogenase, com a geração de equivalentes redutores (NADH_2). No próximo passo, dihidroxiacetona é fosforilada pela enzima glicolítica dihidroxiacetona kinase. Então, o produto fosforilado é metabolizado através da glicólise (DROŹDŹYŃSKA et al., 2011 e SARMA et al., 2012). Na rota de redução (Figura 2.5), o glicerol é convertido em 3-hidroxi propionaldeído, reação esta catalisada pela coenzima B_{12} dependente da glicerol desidratase e relacionada à diol desidratase. A seguir, a 3-hidroxi propionaldeído é reduzido a 1,3 propanodiol e o NAD^+ é regenerado pelo NADH^+H^+ - enzima dependente 1,3 propanodiol-oxidoreductase (DROŹDŹYŃSKA et al., 2011). Durante a rota do metabolismo de oxidação (Figura 2.6), o piruvato é formado como um intermediário. O piruvato, dependendo dos microrganismos, pode ser quebrado em vários produtos, como etanol, ácido láctico, ácido acético, ácido butírico e outros (PACHAPUR et al., 2015a).

Figura 2.5 - Rotas bioquímicas para a fermentação do glicerol

Fonte: Modificado de Drożdżyńska et al., (2011)

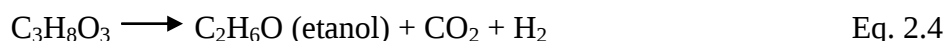
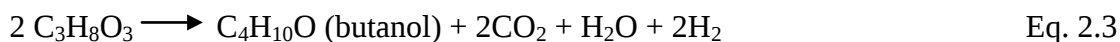
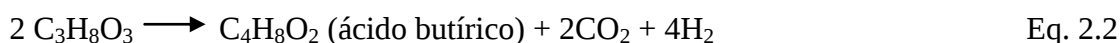
Figura 2.6 - Alguns dos produtos finais da fermentação do glicerol por diferentes microrganismos

Fonte: Modificado de Drożdżyńska et al., (2011)

Inicialmente, o piruvato é convertido à acetilcoenzima A (acetil-CoA), dióxido de carbono e hidrogênio via redução da ferredoxina (Fd) catalisada pela oxidoreductase ferredoxina pirúvico. A ferredoxina (Fd) reduzida é então oxidada pela hidrogenase que reproduz Fd oxidada e gás hidrogênio (SARMA et al., 2012; COSTA, 2010).

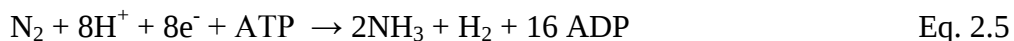
O piruvato também pode ser convertido à acetil-CoA e formiato, que pode ser convertido prontamente a hidrogênio e dióxido de carbono pelas bactérias, tais como *Escherichia coli*. O acetil-CoA é convertido em ácido acético, ácido butírico e etanol, dependendo dos microrganismos presentes e das condições ambientais. O NADH₂ é utilizado na formação do butirato, butanol e etanol e o NADH₂ residual pode ser oxidado produzindo hidrogênio. O ATP é gerado na formação do ácido butírico e ácido acético a partir do acetil-CoA (COSTA, 2010).

Na maioria das vias de bioconversão do glicerol, o H₂ é gerado juntamente com os diferentes metabolitos durante o metabolismo oxidativo (Eq. 2.1 - Eq. 2.4) (SARMA et al., 2012).



Cada processo metabólico de produção de biohidrogênio é dependente das enzimas produtoras de hidrogênio encontradas no interior de cada microrganismo. Estas enzimas catalisam uma reação redox muito simples: $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \leftrightarrow \text{H}_2$. Para realizar esta reação, a maioria das enzimas responsáveis pela geração de hidrogênio tem aglomerados metálicos complexos como sítios ativos e necessitam de proteínas especiais. As três principais enzimas envolvidas na produção de hidrogênio são nitrogenase, [NiFe]-hidrogenase e [FeFe]-hidrogenase (MATHEWS et al., 2009).

A enzima nitrogenase reduz o nitrogênio (N₂) à amônia (NH₃) e é acompanhada pela redução obrigatória de prótons (H⁺) à hidrogênio (H₂). O complexo da nitrogenase consiste em duas proteínas, sendo a primeira dinitrogenase ou MoFe-proteína e a segunda é dinitrogenase redutase ou Fe-proteína. A redução de (N₂) à amônia (NH₃) acompanhada da geração de hidrogênio requer adenosina tri-fosfato (ATP) (MATHEWS et al., 2009), de acordo com a equação 2.5 (KIM et al., 2011):



Em contraste, [NiFe] - hidrogenase funciona cerca de 15 vezes melhor do que nitrogenase na produção de hidrogênio e não necessita de ATP (MATHEWS et al., 2009).

As enzimas de produção de hidrogênio mais eficientes são [FeFe]-hidrogenase, que podem ter uma atividade 1000 vezes melhor do que nitrogenase e cerca de 10-100 vezes melhor do que [NiFe]-hidrogenase. Estas hidrogenases consistem de uma proteína contendo um núcleo catalítico de Fe-Fe e pode ter uma variedade de doadores e aceptores de elétrons. O complexo [FeFe]-hidrogenase pode produzir ou consumir hidrogênio, dependendo do seu ambiente. Todas estas três enzimas geralmente são sensíveis ao oxigênio e devem ser tanto espacialmente ou temporalmente separada deste, a fim de produzir hidrogênio a taxas ótimas (MATHEWS et al., 2009).

Assim sendo, fica claro que os produtos majoritários da bioconversão do glicerol bruto são H_2 e 1,3-propanodiol (PD). No entanto, devido às seguintes razões apresentadas abaixo, a produção de H_2 é mais apropriada do que a produção do PD durante a bioconversão do glicerol bruto: (a) o glicerol tem uma grande quantidade de hidrogênio em sua estrutura (8) e a energia contida no hidrogênio é tão alta quanto $142,9 \text{ kJ g}^{-1}$, o que torna seu uso como combustível uma forma eficiente e sustentável; (b) há rendimento e produtividade de PD reduzidos durante sua geração quando comparado ao H_2 ; (c) para geração elevada de PD, há o requerimento da vitamina B12, que possui custo elevado; (d) no final da bioconversão do glicerol bruto em PD o caldo de fermentação em geral contém água, glicerol residual, subprodutos, tais como ácido acético, ácido láctico, etanol, macromoléculas tais como proteínas e polissacarídeos. Além disso, PD é conhecido por ser de natureza hidrofílica e ter ponto de ebulição elevado. Por estas razões, a purificação do PD a partir de um caldo de fermentação é muito complexa. Existem os métodos convencionais para tal purificação, como extração reativa, extração líquido-líquido, evaporação, destilação, filtração por membrana e cromatografia de troca iônica. No entanto, todos estes métodos são conhecidos por terem inúmeras limitações. Tais dificuldades de obtenção do PD dificilmente são relatadas para a produção de H_2 . Assim, a bioconversão do glicerol bruto à H_2 pode ser considerada como a opção mais adequada para a utilização da indústria de biodiesel (SARMA et al., 2012).

2.8 Microrganismos envolvidos na produção de H_2

Várias bactérias fermentativas produzem hidrogênio, sendo que este é liberado a fim de eliminar o excesso de elétrons. As bactérias usadas nessas rotas são anaeróbias estritas (*Clostridium* sp.) e anaeróbias facultativas (*Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Citrobacter*) (ROSSI et al., 2011).

Entre as bactérias produtoras de hidrogênio, *Clostridium* sp. e *Enterobacter* são as mais amplamente estudadas. *Clostridium* é Gram-positiva, possui morfologia de bacilos e formadora de endósporos, entretanto, a *Enterobacter* é Gram-negativa e também apresenta morfologia de bacilos. Para estas duas espécies, condições de pH próximas de 5,8-6,0 e mantidas a 37° C não inviabilizam o seu desenvolvimento. A bactéria *Thermotoga* também é estudada para a geração de hidrogênio, sob condições termofílicas de 80° C e pH 7,0-7,4 (LI; FANG, 2007).

Certos microrganismos podem crescer anaerobiamente em glicerol como única fonte de carbono e energia e gerar hidrogênio. A habilidade desta bioconversão já foi relatada por alguns autores.

Ito e colaboradores (2005) trabalharam com *Enterobacter aerogenes* HU-101 a fim de se obter hidrogênio por meio da bioconversão do glicerol bruto proveniente da usina de produção de biodiesel em um reator de leito fixo. Com um estudo em relação ao meio de cultivo utilizado para se atingir simultaneamente a produção máxima de hidrogênio e etanol, a melhor condição foi em pH 6,8, 5 g L⁻¹ de extrato de levedura e 5 g L⁻¹ de triptona na presença de 1,7 g L⁻¹ de glicerol bruto, obtendo-se o rendimento de 1,12 mol H₂ mol⁻¹ glicerol e 0,96 mol etanol mol⁻¹ glicerol. Neste ensaio em batelada, houve o consumo total de glicerol bruto.

Liu & Fang, (2007) utilizaram *Klebsiella pneumoniae* DSM 2026 para gerar hidrogênio a partir do glicerol bruto proveniente da produção de biodiesel em reator em batelada. Por meio de ferramentas estatísticas, foi encontrada uma condição otimizada do meio de cultivo contendo 20,4 g L⁻¹ glicerol, 5,7 g L⁻¹ KCl, 13,8 g L⁻¹ NH₄Cl, 1,5 g L⁻¹ CaCl₂ e 3,0 g L⁻¹ extrato de levedura, em pH 6,5, 37°C, com rendimento de 0,53 mol H₂ mol⁻¹ glicerol, gerando como principal metabólito secundário o 1,3-propanodiol.

Ngo et al. (2010) relataram a eficiência da bioconversão do glicerol bruto, oriundo de uma planta de produção de biodiesel, à hidrogênio por meio do uso da bactéria hipertermofílica *Thermotoga neapolitana* DSM 4359 em reatores em batelada. Com 5,0 g L⁻¹ glicerol bruto pré-tratado, 2,0 g L⁻¹ de extrato de levedura, na presença de 0,05 M de tampão e aspersão de N₂ para garantir a anaerobiose, o rendimento máximo de 2,73 mol H₂ mol⁻¹ glicerol foi alcançado.

Na pesquisa realizada por Lo et al. (2013) foi estudada a viabilidade do uso do glicerol bruto proveniente da produção de biodiesel para a geração de biohidrogênio utilizando sete cepas de bactérias produtoras de hidrogênio (*Clostridium butyricum*, *C. pasteurianum* e *Klebsiella* sp.) em reatores em batelada. Dentre as cepas examinadas, a que exibiu melhor desempenho na produção de hidrogênio foi *C. pasteurianum*, a 35°C, pH inicial de 7,0, agitação a 200rpm e concentração de glicerol bruto de 10 g L⁻¹. Um estudo comparativo feito com o uso de glicerol puro e glicerol bruto comprovou que houve maior rendimento quando o glicerol bruto foi utilizado como substrato no meio de cultivo, com rendimento de 0,77 ± 0,05 mol H₂ mol⁻¹ glicerol.

A bactéria hipertermofílica *Thermotoga maritima* DSM 3109 foi usada por Maru e colaboradores (MARU et al., 2013), para a geração de hidrogênio a partir do glicerol. No sistema em batelada, o glicerol foi convertido principalmente à acetato, CO₂ e H₂, obtendo como rendimento máximo 2,84 mol H₂ mol⁻¹ glicerol, sob condições otimizadas de pH entre 7,0 e 7,5 e concentração de extrato de levedura de 2 g L⁻¹. Os autores verificaram que esta espécie de bactéria foi capaz de converter o glicerol, gerando bons rendimentos de H₂. Assim, os autores destacaram as vantagens do uso de bactérias termofílicas na realização de processos à elevadas temperaturas, baixa viscosidade, melhor mistura, menor risco de contaminação, altas taxas de reação e sem a necessidade de resfriamento do reator.

Enterobacter aerogenes NRRL B-407 foi usada por Sarma e colaboradores, 2013, (SARMA et al., 2013b) a fim de se estudar a bioconversão do glicerol bruto, proveniente da planta de produção de biodiesel a partir de óleos residuais de restaurantes, para a geração de H₂ em reatores em batelada. Materiais residuais foram empregados como fonte de nitrogênio mais barata para o meio de cultivo a fim de se melhorar a geração de H₂ à custo reduzido. Assim, 10 mg L⁻¹ de ureia no meio líquido com 10 g L⁻¹ de glicerol bruto ocasionou a máxima produção acumulada de H₂ frente às outras variáveis estudadas neste mesmo trabalho, com 116,41 ± 3,72 mmol H₂ L⁻¹ e cerca de 93% de glicerol bruto foi consumido durante esta operação.

A fim de se melhorar a produção de hidrogênio, Jitrwung e colaboradores (2013) otimizaram as condições do meio de cultivo para reatores em batelada utilizando o glicerol bruto proveniente da planta de produção de biodiesel com *Enterobacter aerogenes*. As concentrações dos sais comumente usados na composição do meio de cultivo foram determinadas por métodos estatísticos. O rendimento máximo obtido deste processo foi de 0,84 mol H₂ mol⁻¹ glicerol.

Chookaew e colaboradores (CHOOKAEW et al., 2014) utilizaram a cultura pura *Klebsiella* sp. TR17 para a geração de hidrogênio, em batelada, a partir do glicerol bruto oriundo de uma planta piloto de produção de biodiesel. Esta espécie de microrganismo foi imobilizada em grânulos metanogênicos provenientes de reator UASB de um sistema de tratamento de águas residuais de frutos do mar da Tailândia, previamente esterilizados à 121°C por 30 minutos para inibir a atividade metanogênica para serem usados como suporte para a imobilização. O reator foi operado à 40°C com pH inicial 8,0 e tempo de retenção hidráulica de 2-12h. O maior rendimento de 44,27 mmol H₂ g⁻¹ glicerol foi atingido com 4 horas de operação e concentração de glicerol de 10 g L⁻¹.

No trabalho de Pachapur e colaboradores (PACHAPUR et al., 2015b), o impacto da aspersão do nitrogênio (N₂) sobre a produção de H₂ usando *Enterobacter aerogenes* e *Clostridium butyricum*, em reatores em batelada e em meio complexo contendo 1% de glicerol bruto foi estudada para reduzir o custo global do processo. Foi verificado neste trabalho que na presença de ar, variando de 5 mL a 75 mL do volume do *headspace*, a produção de hidrogênio aumentou até o máximo de 26,14 mmol L⁻¹ gerando 1,4 g L⁻¹ de etanol. A concentração de 1,3-propanodiol com borbulhamento de N₂ era cerca de 3,0 g L⁻¹ e diminuiu para 0,5 g L⁻¹ devido à presença de 75 mL de ar no *headspace*. Esta observação pode ser atribuída a uma mudança na rota do metabolismo do glicerol redutivo para o oxidativo, aumentando assim a produção de hidrogênio, minimizando a produção de metabólitos e redução dos custos com o uso do N₂. Outro trabalho do mesmo autor (PACHAPUR et al., 2015a) utilizando os mesmos microrganismos (*Enterobacter aerogenes* e *Clostridium butyricum*) em reatores em batelada incluiu o estudo do aumento da produção de hidrogênio com a inclusão do bagaço de maçã, que favoreceu a rota do metabolismo oxidativo do glicerol, diminuindo a formação de 1,3-propanodiol, cuja maior produção de H₂ foi de 26,07 ± 1,57 mmol L⁻¹ com 15 g L⁻¹ de glicerol e 5 g L⁻¹ de bagaço de maçã.

Kumar e colaboradores (2015) trabalharam com *Bacillus thuringiensis* EGU45 imobilizada em materiais ligno-celulósicos sob condição contínua, com retenção hidráulica de 48h, mantidos a 37°C, pH 7,0 e o rendimento obtido foi de 0,393 mol H₂ mol⁻¹ glicerol.

Além da utilização de culturas puras para a geração de hidrogênio, como visto nos trabalhos descritos acima, as culturas mistas tem ganhado destaque nos presentes estudos. Os processos usando culturas microbianas mistas são mais práticos porque eles são mais simples de serem operados, mais robustos, de fácil controle, não havendo a necessidade de trabalhar com substratos esterilizados e podem ter uma escolha mais ampla de matéria-prima a ser utilizada (LI; FANG, 2007; SIVAGURUNATHAN et al., 2016). Além disso, a uso de

culturas mistas para a conversão de substratos complexos (tais como o glicerol bruto) favorece uma maior eficiência do processo graças aos possíveis benefícios sinérgicos. No entanto, até agora, os estudos sobre as culturas mistas são escassos e concentrando-se principalmente no uso de substratos sintéticos (VARRONE et al., 2012).

As culturas mistas podem ser obtidas a partir de várias fontes naturais, tais como lodo, solos, sedimentos de lagos, fontes termais e de plantas de estações de tratamento. No entanto, juntamente com os microrganismos produtores de hidrogênio, há também a presença da microflora consumidora deste gás, cuja existência se dá de forma natural no ecossistema. Isso pode ser suprimido por pré-tratamentos usando métodos adequados, tais como calor, ácido, base, agentes químicos, para enriquecer a microflora produtora de hidrogênio (SIVAGURUNATHAN et al., 2016).

2.9 Pré-tratamento de culturas mistas para a geração de H₂

Em um sistema de culturas mistas, sob condições anaeróbias, o hidrogênio produzido pelas bactérias, tais como o *Clostridium* ou *Enterobacter*, é na maioria das vezes rapidamente consumido por certos microrganismos. Assim, a fim de se aproveitar o hidrogênio gerado deste sistema de culturas mistas, o lodo, por exemplo, necessita passar por um processo de pré-tratamento para suprimir a atividade das espécies consumidoras de hidrogênio preservando ao mesmo tempo a atividade das bactérias geradoras deste gás (LI; FANG, 2007).

A produção biológica de hidrogênio por fermentação escura compartilha muitas características em comum com a digestão anaeróbia metanogênica. Culturas mistas tipicamente anaeróbias podem não produzir hidrogênio uma vez que ele é rapidamente consumido pelos microrganismos produtores de metano. Por isso, há a necessidade de se restringir a metanogênese permitindo que o hidrogênio se torne o produto final do fluxo metabólico. Assim, os métodos de pré-tratamento dos microrganismos são essenciais como forma de selecionar grupos específicos de bactérias (ROSSI et al., 2011).

Bactérias produtoras de hidrogênio formadoras de endósporos, como as pertencentes aos gêneros *Clostridium* e *Bacillus*, formam endósporos como um resultado do estresse bacteriano quando em condições ambientais desfavoráveis, como alta temperatura, limitação de nutrientes, acidificação e alcalinidade, por exemplo, que são as condições impostas durante os pré-tratamentos dos inóculos (ROSSI et al., 2011). A esporulação é um processo de diferenciação, considerado um fenômeno complexo, que leva à formação de endósporos

dormentes que são capazes de sobreviver milhares, senão milhões de anos. Os endósporos bacterianos não possuem metabolismo e podem suportar uma ampla variedade de condições adversas como calor, exposição à radiação ultravioleta e contato com solventes, enquanto que as espécies metanogênicas, que geram metano e consomem hidrogênio, não possuem tais capacidades que acaba por prevenir o crescimento competitivo destes microrganismos. Apesar desta dormência extrema, os endósporos mantêm um mecanismo sensorial em alerta, o que lhes permite responder aos nutrientes específicos quando em condições ambientais ideais para sua reativação (ATRIH; FOSTER, 2002; ROSSI et al., 2011).

Vários pré-tratamentos das culturas mistas são encontrados na literatura. Rossi e colaboradores (2011) desenvolveram uma pesquisa investigando a influência de diferentes métodos de pré-tratamentos para a seleção de consórcios de bactérias geradoras de hidrogênio a partir do glicerol residual da síntese de biodiesel. Os cinco tratamentos químicos estudados por este autor e aplicados ao consórcio foram: choque térmico, no qual o lodo foi fervido a 100°C por 15 minutos; o tratamento com ácido e base, por meio de um ajuste do pH a 3,0 ou 10,0 usando 1M HCl ou NaOH e mantendo este pH por 24h; o calor seco e dessecação foi realizado armazenando a amostra por 2 horas em um forno de secagem à 105°C seguido por uma dessecação em uma jarra de dessecação por 2 horas; o congelamento e o descongelamento foi realizado pela exposição das amostras à -10°C por 24 horas seguido por um descongelamento por 6 horas à 30°C. De acordo com o autor, tratamentos à quente são os melhores métodos de serem garantidas as maiores gerações de hidrogênio. Para Selembo et al. (2009), o tratamento térmico é o pré-tratamento mais comum e que pode ser facilmente empregado para a seleção de bactérias geradoras de hidrogênio.

Além dos cuidados a serem tomados com o inóculo, para que se tenham bons rendimentos de hidrogênio gerado é importante que se realize o pré-tratamento do glicerol bruto. Como visto, ele contém impurezas que são consideradas prejudiciais ao consórcio microbiano, como os sabões e gorduras. Após o pré-tratamento para a eliminação destes resíduos, há a possibilidade de sua reutilização para produção de mais biodiesel por meio de esterificação e transesterificação. Sendo assim, toda a matéria orgânica não glicerol que foi separada do glicerol bruto por meio do pré-tratamento, pode voltar ao processo de obtenção de mais biodiesel (SANTORI et al., 2012).

2.10 Pré-tratamento do glicerol bruto

Sabão e metanol são as maiores impurezas presentes no glicerol bruto e elas são inibitórias ao crescimento microbiano afetando na produção biológica de hidrogênio (SARMA et al., 2013a). O metanol pode ser removido por meio de autoclavação, tendo em vista que ele evapora a 65°C. Consequentemente, uma esterilização processada durante 15 minutos a 121°C é capaz de remover quantidade significativa de metanol do glicerol bruto (PYLE et al., 2008). Outro modo eficaz de remoção do metanol é por meio de uma destilação, como foi usada no trabalho de geração de hidrogênio a partir do glicerol bruto de Ngo e colaboradores (2010), no qual por meio do uso do rota evaporador a 45°C obteve-se a remoção de metanol do resíduo utilizado.

Durante o processo de transesterificação por catálise básica para a obtenção do biodiesel, boa parte do catalisador e do excesso de álcool acumulam-se no glicerol bruto. O catalisador, juntamente com os ácidos graxos livres, em pH neutro a básico, formam os sabões, que ficam misturados no glicerol bruto. A esta mistura podem ser adicionados ácidos minerais fortes como ácido sulfúrico ou clorídrico de modo que o pH fique em torno de 4,6 para que os ácidos graxos livres possam ser separados por decantação seguida de uma centrifugação a 5000 rpm, onde a fase superior corresponde aos ácidos graxos livres e a fase inferior ao glicerol (SEQUINEL, 2013). Assim, o ajuste do pH à faixa ácida faz com que sabões solúveis se transformem a ácidos graxos insolúveis (SARMA et al., 2012).

Phyle et al. (2008) encontraram um efeito negativo na produção do ácido docohexanoico pela alga *Schizochytrium limacinum* devido à presença de sabões e metanol no glicerol bruto (PHYLE et al., 2008).

Ngo e colabolaboradores (2010) observaram que quando o glicerol bruto foi diretamente misturado com o meio de cultura, ocorreu a precipitação de sabões no meio líquido, que se verificou prejudicial para o crescimento celular (NGO et al., 2010).

A fim de se evitarem tais incidentes, o glicerol bruto deve ser conduzido a um pré-tratamento antes de ser usado como matéria-prima para uma produção eficaz de hidrogênio por meio dos microrganismos responsáveis por essa geração.

2.11 Reatores anaeróbios em batelada

Uma variedade de configurações de biorreatores pode ser empregada para a produção de hidrogênio a partir de materiais orgânicos baratos, incluindo o glicerol bruto proveniente da indústria de biodiesel. Eles podem ser simples garrafas de soro de tamanhos diferentes, fermentadores em escala laboratorial, com agitação e controle de pH, reatores de fluxo

ascendente, ou podem ser células bioeletroquímicas. No entanto, com base no potencial de produção de hidrogênio, uma configuração em particular não pode ser considerada superior às demais configurações. Observa-se que a maior parte dos experimentos é conduzida no modo de operação em batelada usando uma configuração simplificada com a utilização de frascos de soro (SARMA et al., 2012).

Reatores em batelada são usados em escala laboratorial na maioria dos estudos que tratam de fermentação na ausência de luz. Tal configuração possui a vantagem de ser mais simples, facilmente operado e flexível. Isto resultou na ampla utilização de reatores em batelada para a determinação do potencial de geração de biohidrogênio a partir de substratos orgânicos. No entanto, em um contexto industrial, por razões práticas de gestão de armazenamento de resíduos e de considerações de ordem econômica, os bioprocessos contínuos são recomendados (GUO et al., 2010; SÁ et al., 2014).

Até o presente momento, nenhum reator de biohidrogênio em escala industrial foi configurado, mas espera-se que o *design* de biorreator e a configuração do sistema sejam semelhantes às usinas de biogás de metano: somente os parâmetros operacionais podem variar entre estas duas aplicações anaeróbias. Tendo em vista a vasta experiência adquirida em unidades de biogás que tratam resíduos orgânicos agrícolas, especialmente na Alemanha, o reator mais provável para a produção biohidrogênio seria um reator de tanque vertical, continuamente agitado com diferentes tipos de misturadores (GUO et al., 2010).

Em alguns estudos, verificou-se que a produção de hidrogênio em reatores em batelada apresentavam maiores rendimentos de hidrogênio gerados do que os reatores em modo contínuo. Isto pode ser atribuído ao microambiente substancialmente diferente em um reator em batelada (variáveis no tempo e conseqüentemente concentrações elevadas de substrato na parte inicial do reator em batelada) que conduz a um fluxo metabólico diferente do que em microambiente com concentração reduzida de substrato de forma constante que acontece em reator de tanque agitado, em modo contínuo (NTAIKOU et al., 2010).

2.12 Plataforma Illumina: Next-Generation Sequencing

Análises quantitativas e qualitativas da dinâmica da comunidade microbiana com base no gene ribossomal RNA 16S são importantes para o monitoramento da eficácia de biorreatores produtores de hidrogênio e indicação de mudanças na sua função. Portanto, é necessário compreender melhor as relações entre a estrutura das comunidades microbianas e o desempenho do processo de geração de hidrogênio. Até o momento, apenas alguns estudos

sobre a composição da comunidade microbiana produtora de H_2 foram pesquisados. Nestes estudos, o sistema de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (PCR / DGGE) foi usado principalmente para monitorar as comunidades microbianas. Hoje em dia, o pirosequenciamento, um método de sequenciamento de alto rendimento utilizando a tecnologia de sequenciamento por síntese, foi introduzido na ecologia microbiana como uma nova abordagem poderosa que é capaz de revelar a diversidade taxonômica nas comunidades microbianas complexas em alta resolução em amostras ambientais (IM et al., 2012).

O pirosequenciamento foi introduzido pela primeira vez, para o campo da ecologia microbiana, em 2006, como uma tecnologia de rendimento elevado. Uma série de estudos de comunidades microbianas foi publicada utilizando este método em análises com amostras de água do mar. Para avaliar esta nova tecnologia, vários estudos têm comparado as estruturas das comunidades microbianas determinadas por pirosequenciamento com aquelas desenvolvidas usando a tecnologia de biblioteca de clones bem estabelecidos. Estes estudos têm destacado a utilidade do pirosequenciamento para análise da comunidade microbiana em ecologia (ZHANG et al., 2011). Sanapareddy e colaboradores foram os primeiros a usar o pirosequenciamento para analisar a comunidade microbiana presente em amostras de tratamento de águas residuais (SANAPAREDDY et al., 2009).

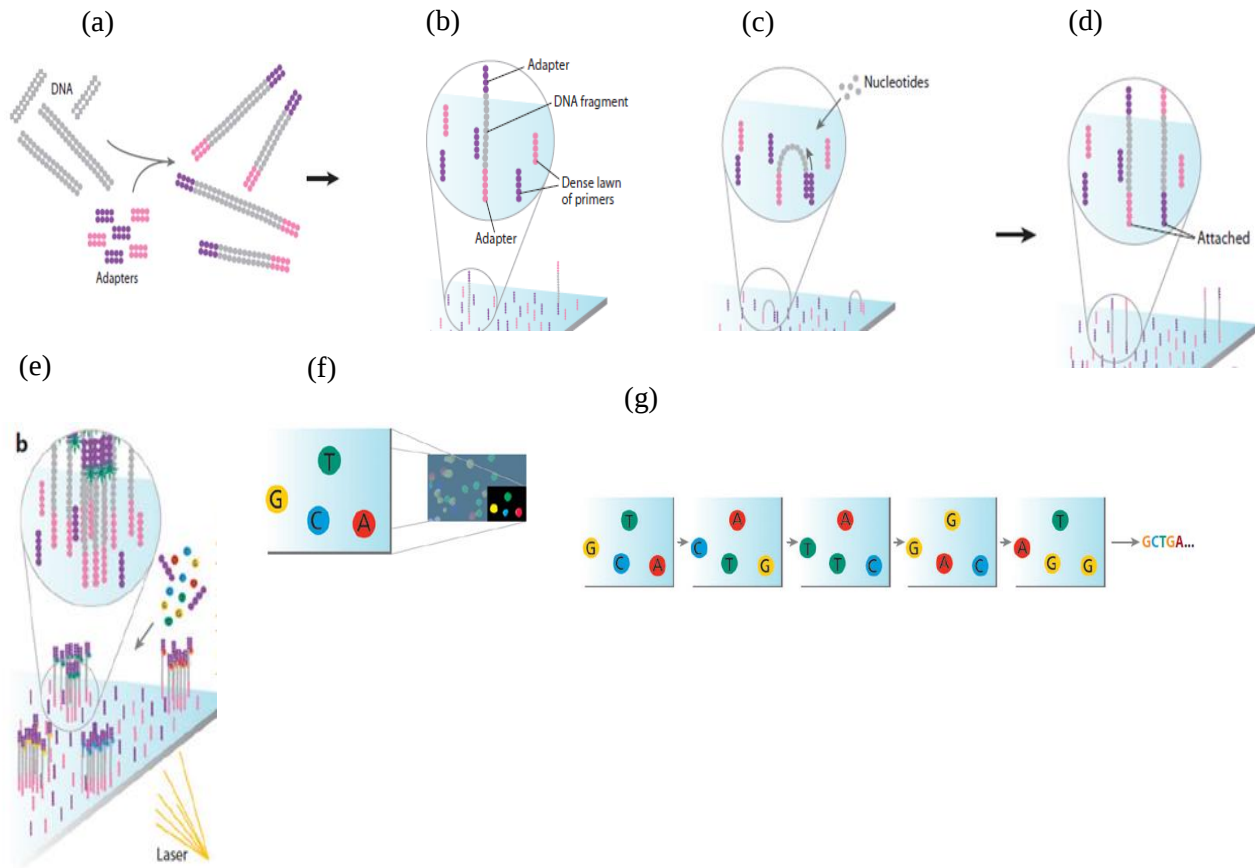
A plataforma de pirosequenciamento possui a habilidade de montar genomas completos a partir da leitura de sequenciamentos curtos (ARMOUNGOM et al., 2009). O pirosequenciamento também elimina a necessidade de clonagem, eliminando assim o potencial das recombinações aberrantes no hospedeiro substituto (EDWARDS et al., 2006). No entanto, a técnica de pirosequenciamento atualmente só produz comprimentos curtos de leitura que nem sempre são suficientes para caracterizar, com precisão, comunidades microbianas, mas podem fornecer uma boa estimativa da biodiversidade da comunidade formadora de biogás, principalmente por causa da quantidade do conjunto de dados analisados (KRÖBER et al., 2009).

Quanto às tecnologias de última geração envolvendo o sequenciamento genômico, destaca-se a utilização de plataforma Illumina. Estas tecnologias não estão apenas mudando as abordagens de sequenciamento do genoma, os prazos e os custos associados, mas também acelerando e alterando uma ampla variedade de tipos de investigação biológica. Além disso, as plataformas estão ajudando a abrir completamente novas áreas de pesquisa biológica, incluindo a investigação de genomas antigos, a caracterização da diversidade ecológica, bem como a identificação de agentes etiológicos desconhecidos (MARDIS, 2008).

O sequenciamento de DNA já percorreu um longo caminho desde os dias da cromatografia bidimensional na década de 1970. Com o advento do método da cadeia de terminação de Sanger, em 1977, os cientistas adquiriram a capacidade de sequenciar o DNA de um modo confiável e reproduzível. A leitura curta, técnica de sequenciamento massivamente paralela, foi uma abordagem fundamentalmente diferente que revolucionou capacidades de sequenciamento e lançou a "*next-generation*" em ciência genômica (ILLUMINA, 2016).

Para a análise genômica pelo Illumina, uma única molécula para a etapa de amplificação inicia-se em uma plataforma adaptada específica que acontece na superfície de uma célula de fluxo (Figura 2.7). O DNA a ser sequenciado é fragmentado em fitas. Adaptadores são ligados no final dos fragmentos e um desses adaptadores é hibridizado em uma célula de fluxo. Uma célula de fluxo é um dispositivo micro fabricado, de vidro, com 8 canais que permite que ocorram as “pontes” de amplificação dos fragmentos sobre a sua superfície e o uso da enzima DNA polimerase para produzir múltiplas cópias de DNA ou *clusters*. Cada *cluster* contém aproximadamente 1 milhão de cópias do fragmento original, o que é suficiente para reportar a incorporação de bases para a intensidade do sinal necessária para a detecção durante o sequenciamento. O sistema Illumina utiliza a abordagem do sequenciamento por síntese no qual todos os quatro nucleotídeos são adicionados simultaneamente aos canais da célula de fluxo, juntamente com a DNA polimerase, por incorporação dos fragmentos e *primers*. Reações de PCR localizada são realizadas e cada um dos pedaços hibridizados de DNA chegará localmente amplificado. Posteriormente, a sequência de DNA é determinada pela adição de um *primer* no final das moléculas. Uma mistura de nucleotídeos modificada é adicionada. Cada uma delas carrega uma marca fluorescente a ser anexada. Além disso, cada um tem grupos 3'OH bloqueadores que garantem a incorporação de um único nucleotídeo por vez. A célula de fluxo é colocada sob o microscópio e quando uma luz brilha em sua fluorescência, uma emissão de luz mostra qual base foi incorporada em cada um dos *clusters*. O Illumina lê um comprimento de aproximadamente 35 bases, mas mais de bilhões de leituras são geradas por tempo. Depois de cada imagem, o grupo 3' é removido quimicamente para uma próxima incorporação pela DNA polimerase (MARDIS, 2008).

Figura 2.7 - Etapas do pirosequenciamento envolvendo a plataforma Illumina



Fonte: MARDIS, 2008

(a) Preparação da amostra de DNA genômico - Fragmentos genômicos de DNA e os adaptadores ligam-se em ambas as extremidades dos fragmentos; (b) Fixação do DNA à superfície - Fragmentos de fitas simples de ligam-se aleatoriamente na superfície interna dos canais da célula de fluxo; (c) Ponte de amplificação – Adição de nucleotídeos não marcados e enzimas para iniciar a ponte de amplificação em fase sólida; (d) Desnaturação das moléculas de cadeia dupla; (e) Primeiro ciclo químico: determinar a primeira base - vários milhões de clusters de DNA de fita dupla são gerados em cada canal da célula de fluxo. O primeiro ciclo de sequenciamento começa pela adição de quatro terminadores marcados reversivelmente, primers e a DNA polimerase; (f) Imagem do primeiro ciclo químico - Após a excitação por laser, ocorre a captura da imagem pela fluorescência emitida a partir de cada cluster na célula de fluxo. Registrar a identidade da primeira base para cada grupo; (g) Leitura da sequência de múltiplos ciclos químicos – Ciclos repetidos de sequenciamento determinam a sequência de bases em um dado fragmento de uma única base de cada vez.

Em meados da década de 1980, grandes melhorias na tipagem bacteriana e caracterização de relações filogenéticas foram alcançadas, utilizando novas abordagens moleculares com base no sequenciamento completo de genes ribossomais. Um dos tipos de rRNA em ribossomos procarióticos é classificado como 16S que possui uma extensão de sequência de 1550 nucleotídeos. O gene 16S se tornou um padrão na classificação taxonômica bacteriana, porque é mais fácil e rapidamente sequenciado. A sequência do gene 16S é

atualmente o método mais comum usado na classificação microbiana como um resultado das suas propriedades filogenéticas e a grande quantidade de sequências de genes 16S disponíveis para análise de comparação (ARMOUGOM et al., 2009). O gene de rRNA 16S (rRNA 16S) contém regiões que são altamente conservadas flanqueando sequências variáveis e sequências de espécies específicas. Diversos estudos relataram a utilidade da tecnologia de pirosequenciamento para tipagem bacteriana por sequenciamento da região variável do gene de 16S rRNA. A tipagem envolve uma amplificação de ácidos nucleicos utilizando *primers* universais visando às sequências conservadas e sequenciamento da região variável por um dos *primers* de amplificação (AHMADIAN et al., 2006).

No entanto, a fim de distinguir as estirpes bacterianas estreitamente relacionadas por pirosequenciamento, leituras de comprimentos longos podem ser necessárias. Para superar a limitação das leituras de comprimentos no rRNA 16S, estudos sugerem a utilização de vários grupos específicos de *primers*. Nesta abordagem, um conjunto de *primers* de pirosequenciamento é adicionado, mas apenas um dos *primers* hibridiza com o molde e funciona como iniciador do sequenciamento (AHMADIAN et al., 2006).

Devido ao comprimento de leitura da sequência curta gerado pela tecnologia do pirosequenciamento e devido à pequena quantidade de variabilidade de nucleotídeos no gene 16S em todo o domínio bacteriano, a montagem de toda sequência do gene 16S e a atribuição taxonômica das espécies presentes em uma amostra microbiana mista continuam a ser um desafio computacional. Uma estratégia de abordar este problema consiste no direcionamento uma região variável específica 16S que exibe um sinal filogenético suficiente para ser atribuído com precisão (ARMOUNGOM et al., 2009).

A avaliação da diversidade microbiana em um ambiente natural envolve dois aspectos, que são riqueza de espécies (número de espécies presentes em uma amostra) e equitatividade (distribuição de abundância relativa das espécies). Para estimar a riqueza de espécies, os pesquisadores amplamente dependem da atribuição de sequências 16S nos aglomerados em Unidade Operacional Taxonômica (OTU). O critério utilizado para definir uma OTU em nível de espécie é a porcentagem da diferença da sequência de nucleotídeos; os valores de corte variam entre 1%, 3%, 5% ou, dependendo do estudo. A diversidade total da comunidade de um único ambiente, ou alfa-diversidade, muitas vezes é representada por curvas de rarefação. Estas curvas simulam o número acumulado de OTUs capturadas como uma função de tentativa de amostragem e, por conseguinte, indica-se somente a riqueza da OTU observada num determinado conjunto de amostras. Em contraste, os métodos não paramétricos, incluindo Chao1 ou ACE, são estimadores de riqueza da alfa-diversidade global. Além disso,

os métodos quantitativos, tais como os índices de Shannon ou Simpson medem a uniformidade da alfa-diversidade. No entanto, embora estes estimadores possam descrever a diversidade da microbiota associada com um estado saudável ou doente, eles não são informativos da diversidade (filó) genética de uma amostra ambiental (ARMOUGOM et al., 2009).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Produzir H_2 a partir de glicerol bruto, o coproduto da produção do biodiesel a partir de óleos residuais, por processos fermentativos, utilizando consórcios enriquecidos provenientes de sistemas biológicos de tratamento de efluentes.

3.2 Específicos

- Caracterizar o glicerol bruto;
- Obter consórcios de bactérias anaeróbias produtoras de gás hidrogênio por meio de técnicas de tratamento a quente e controle de pH;
- Enriquecer e purificar consórcios anaeróbios em glicerina, obtidos após pré-tratamento do inóculo;
- Realizar pré-tratamento do glicerol bruto para separação de sabões e gorduras;
- Realizar ensaios de produção biológica de gás hidrogênio com reatores anaeróbios em batelada alimentados com glicerol bruto, em quantidades crescentes, e inóculo enriquecido;
- Analisar o crescimento bacteriano, consumos de glicerol e gerações dos produtos intermediários da fermentação como compostos orgânicos voláteis e H_2 ;
- Caracterizar o consórcio microbiano por meio de técnicas de biologia molecular;
- Calcular rendimentos da geração de H_2 durante a operação dos reatores anaeróbios em batelada;
- Testar capacidade de geração de H_2 com cultura pura *Enterobacter* sp. em reator anaeróbio em batelada alimentado com 100% glicerol bruto e comparar com os trabalhos presentes na literatura e ensaios envolvendo os consórcios microbianos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Esquema operacional

As atividades realizadas, tanto para a caracterização do glicerol bruto quanto para as condições operacionais da fermentação anaeróbia, foram as seguintes: reativação do inóculo, pré-tratamento, enriquecimento e aumento de biomassa, montagem dos ensaios em reatores anaeróbios em batelada, análises físico-químicas e cromatográficas (Figura 4.1).

4.2 Fonte de Carbono

Foi utilizado glicerol bruto proveniente da produção de biodiesel por processo de transesterificação, a partir de óleos de cozinha usados, metanol e hidróxido de sódio (catalisador), da planta piloto de Produção de Biodiesel do Instituto de Biotecnologia (Ibiotec) do curso de Engenharia de Energias Renováveis da Uniara, Araraquara – SP.

4.2.1 Caracterização do Glicerol Bruto

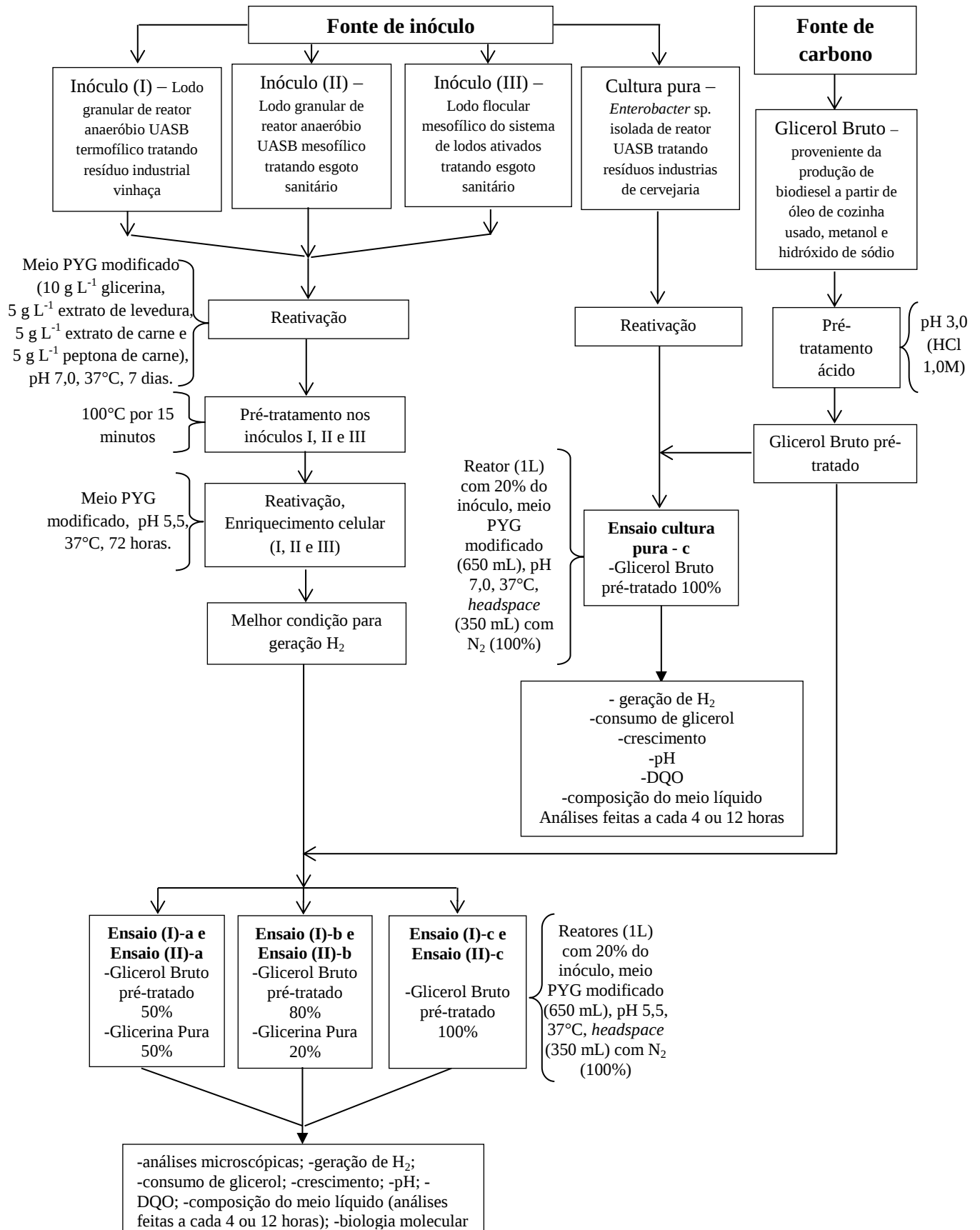
4.2.1.1 pH

Foi efetuada a leitura para a determinação do pH de acordo com AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (2005).

4.2.1.2 Demanda Química de Oxigênio (DQO)

A amostra de glicerol bruto, previamente diluída (1,25 mL), foi adicionada com 0,75 da solução de digestão (dicromato de potássio e sulfato de mercúrio) e 1,75 mL da solução de ácido sulfúrico e sulfato de prata. O tubo foi fechado e agitado por inversão. A seguir a amostra foi colocada em digestor de DQO (Nanocolor® VARIO C2) durante 2 horas a 150°C. Posteriormente, realizou-se a leitura espectrofotométrica a 620 nm (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005).

Figura 4.1 - Esquema operacional



4.2.1.3 Determinação de glicerol

A determinação foi realizada por espectrofotometria, por oxidação do glicerol livre com meta periodato de sódio levando à formação de formaldeído. Para que o formaldeído pudesse ser quantificado, ocorreu uma segunda reação com duas moléculas de acetilcetona na presença de acetato de amônio, levando à formação de 3,5-diacetil 1,4-dihidrolutidina, reação conhecida como reação de Hantzsch. A curva de calibração foi realizada usando glicerina como padrão. Para cada análise de glicerol, uma nova curva de calibração foi realizada, tendo em vista que os reagentes eram instáveis ao longo do tempo e deviam ser preparados diariamente para as análises. Foram usados 0,5 mL de amostra previamente diluída e colocada em tubo de 10 mL com 1,5 mL de solvente de trabalho (água destilada com etanol 95% misturados em volumes iguais) e 1,2 mL de solução de periodato de sódio (21 mg de meta periodato de sódio + 5 mL de solução de ácido acético 1,6M + 5 mL de solução de acetato de amônio 4,0M). O tubo foi agitado por 30 segundos e a seguir adicionado 1,2 mL de solução de acetilcetona (200µL de acetilcetona + 5 mL de solução de ácido acético 1,6M + 5 mL de solução de acetato de amônio 4,0M). O tubo foi mantido em banho de água a 70°C por 1 minuto e agitado manualmente. A seguir o tubo foi resfriado por imersão na água a 25°C. Posteriormente, foi realizada a leitura espectrofotométrica das amostras a 410 nm (BONDIOLI; BELLA, 2005).

4.2.1.4 Umidade e materiais voláteis

O procedimento experimental foi realizado em estufa, com 5 gramas de amostra do glicerol bruto colocadas em cadinhos de alumínio previamente secos em estufa e dessecador para eliminação de umidade, pesados e anotadas as massas. Os cadinhos contendo as amostras foram mantidos a 130°C por 30 minutos. A seguir, os mesmos foram colocados em dessecador até que se atingisse a temperatura ambiente e pesados. O procedimento da secagem em estufa foi repetido até que a perda de massa não fosse superior a 0,05% do peso (AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY, 2009). As análises foram realizadas em triplicata e o teor umidade e voláteis foi determinado segundo a equação 4.1:

$$\text{Umidade e voláteis \%} = \frac{m_i - m_f}{m_{\text{amostra}}} \times 100 \quad \text{Eq. 4.1}$$

Sendo:

m_i = massa do cadinho com a amostra no início do ensaio, em gramas;

m_f = massa do cadinho com a amostra ao final do ensaio, em gramas e

$m_{amostra}$ = massa da amostra.

4.2.1.5 Teor de água

A determinação foi realizada de acordo com método Karl Fischer Volumétrico (ASTM INTERNATIONAL, 2015).

4.2.1.6 Teor de sabão

Foi realizada por titulação e expressa como oleato de sódio. Uma mistura de 60 mL de acetona e 0,15 mL de 0,5% (m/v) de azul de bromofenol (em 95% de etanol) foi preparada e neutralizada com solução de ácido clorídrico (0,01M). A solução foi misturada com 10 gramas de glicerol bruto e aquecida em banho de água a 70°C por 10 minutos. A seguir, a mistura foi titulada usando uma solução de ácido clorídrico (0,1M). Uma neutralização completa do sabão presente no glicerol bruto levou a solução azul (pH indicador) desaparecer, formando assim uma solução amarelada esverdeada. 1 mL da solução de ácido clorídrico 0,1M corresponde a 0,0304 gramas de oleato de sódio ($\text{NaC}_{18}\text{H}_{33}\text{O}_2$) (ORGANISATION INTERNATIONALE DE LA VIGNE ET DU VIN, 2016). Assim, o teor de sabão pode ser determinado como segue a equação 4.2:

$$\text{Teor de sabão como oleato de sódio \%} = \frac{V_{\text{ácido}} \times 0,0304 \times 100}{m_{\text{amostra}}} \quad \text{Eq. 4.2}$$

Sendo:

$V_{\text{ácido}}$ = volume do ácido, em mL, utilizado na titulação completa da amostra.

$m_{amostra}$ = massa da amostra de glicerol bruto, em gramas.

4.2.1.7 Metanol

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo a gás Shimadzu, modelo GC 2010, equipado com injetor Split/Splitless e detector de ionização por chama (FID) de alta frequência. O cromatógrafo foi acoplado a um auto amostrador modelo AOC-

5000, configurado para amostragem líquida e *headspace*. Toda a estação de trabalho foi controlada pelo programa GCSolution versão 2.32. As condições cromatográficas utilizadas neste trabalho foram injetor PTV e detector FID em temperaturas de 300 °C. A programação de temperatura do forno foi inicialmente de 50°C por 1 min, seguido de rampa de aquecimento a 60°C min⁻¹ até a temperatura final de 250°C, mantida por 2 min. A coluna analítica utilizada foi DB-1MS (20 m x 0,10 mm x 0,4 µm). Como gás de arraste foi utilizado hidrogênio com velocidade linear constante de 63 cm s⁻¹ (1 mL min⁻¹) e taxa de divisão de fluxo (split) 1:100. As condições de *headspace* foram 2 g de amostra (em vial de 20 mL), com temperatura de incubação de 60°C por 15 min (SEQUINEL, 2013).

4.2.1.8 Teor de cinzas

Os experimentos foram realizados em duplicata, onde 30 gramas de glicerol bruto foram pesados em um cadinho de porcelana e aquecidos no bico de Bunsen até que fosse cessado o desprendimento de vapores ou fumaça. O cadinho foi levado à mufla por 20 minutos a 775°C até que a oxidação do carbono fosse completa (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2008). O teor de cinzas foi determinado segundo a equação 4.3 abaixo:

$$\text{Teor de cinzas \%} = \frac{M_{cf} - M_{acv} \times 100}{M_a} \quad \text{Eq. 4.3}$$

Sendo:

M_{cf} = massa do cadinho final, em gramas;

M_{cv} = massa do cadinho vazio, em gramas e

M_a = massa da amostra, em gramas.

4.2.1.9 Matéria Orgânica Não Glicerol (MONG)

Por meio desta determinação foi possível quantificar a matéria orgânica não glicerol, como mono, di e triglicerídeos e ácidos graxos entre outros. 5 mL da amostra foram colocadas em um balão volumétrico de 50 mL avolumado até o menisco com água destilada. Para que ocorresse a separação da MONG, o pH foi reduzido até aproximadamente 2 com solução de HCl (20,7 mL de HCl 37% em um balão de 500 mL com água destilada). Anotou-se o volume de HCl utilizado para a acidificação da amostra. No tubo de centrífuga de 15 mL foi

adicionada a amostra pura (sem diluição) e a quantidade de HCl para que o pH da amostra reduza à 2. A soma da amostra e do ácido foram 10 mL (SEQUINEL, 2013). Pela equação 4.4 foi possível calcular a quantidade de amostra que foi adicionada ao tubo para a realização da determinação do MONG, bem como quantificar o volume de ácido (equação 4.5) inserido junto à amostra para então serem submetidas à centrifugação por 5 minutos, a 500 rpm.

$$V_a = \frac{50}{5 + V_{HCl}} \quad \text{Eq. 4.4}$$

Sendo:

V_a = volume da amostra adicionada no tubo e

V_{HCl} = volume de ácido utilizado para reduzir o pH da amostra.

$$V_{HCl_a} = 10 - V_a \quad \text{Eq. 4.5}$$

Sendo:

V_{HCl_a} = volume de ácido adicionado no tubo e

V_a = volume de amostra adicionado no tubo.

A porcentagem de MONG foi calculada pela equação 4.6:

$$\%MONG = \frac{V_s}{V_a} \times 100 \quad \text{Eq. 4.6}$$

Sendo:

V_s = volume separado de MONG e

V_a = volume de amostra adicionado no tubo.

4.2.1.10 Determinação da aparência

Procedimento realizado à temperatura ambiente, em frascos de 20 mL, com homogeneização da amostra, por método visual em ambiente bem iluminado, sem incidência direta da radiação solar ou feixe de luz artificial (SEQUINEL, 2013).

4.2.1.11 Pré-tratamento no Glicerol Bruto

Adicionou-se ácido clorídrico (1,0M) de forma que o pH ficasse em torno de 3,0 para que os ácidos graxos livres pudessem ser separados por decantação. Centrifugou-se a 9000 rpm por 8 minutos, onde foi desprezado os ácidos graxos livres formados na parte superior dos tubos falcon e recuperado na parte inferior o glicerol bruto pré-tratado (CHI et al., 2007).

4.3 Inóculos

Para a fermentação do glicerol bruto, foram testadas 4 fontes de inóculo, designadas por:

Inóculo (I)- Lodo granular de reator anaeróbio de fluxo ascendente UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) termofílico usado no tratamento de vinhaça, proveniente da Usina São Martinho, localizado em Pradópolis – SP;

Inóculo (II)- Lodo granular de reator anaeróbio de fluxo ascendente UASB mesofílico usado no tratamento de esgoto sanitário, localizado em São José do Rio Preto – SP;

Inóculo (III)- Lodo flocular mesofílico do Sistema de Lodos Ativados de tratamento de esgoto sanitário do Distrito de Bueno de Andrada, localizado em Araraquara – SP;

Cultura pura isolada de reator UASB de tratamento de água residuária de cervejaria local e depositada no Banco de dados NCBI como *Enterobacter* sp. (KP893397).

4.3.1 Reativação

Os inóculos I, II, III e a cultura pura foram transferidos, separadamente, para reatores anaeróbios em batelada (100 mL) contendo 50 mL de meio PYG modificado (Tabela 4.1), em triplicata, conforme descrito a seguir. A modificação no meio de cultivo PYG foi a substituição de glicose por glicerina nas mesmas concentrações.

Tabela 4.1 - Composição do Meio de cultivo PYG modificado

Composto	Quantidades (g L ⁻¹)
Glicerina	10,00
Extrato de levedura	5,00
Extrato de carne	5,00
Peptona de carne	5,00

O meio de cultivo foi preparado com a adição dos reagentes sob fluxo de N₂ (100%) no *headspace* dos reatores durante 5 minutos para efetuar a troca gasosa e garantir as condições de anaerobiose, em pH 7,0. Os reatores foram fechados com tampa de borracha e lacre de alumínio e a esterilização foi feita em autoclave (20 min, 120°C e 1 atm). Posteriormente, os inóculos I, II, III e a cultura pura foram adicionados aos reatores anaeróbios, separadamente, com auxílio de agulhas e seringas estéreis, em condições assépticas e foram mantidos a 37°C, no escuro por 7 dias.

4.3.2 Pré-tratamento nos inóculos I, II e III reativados

O processo do pré-tratamento consistiu em realizar o choque térmico, mantendo a biomassa (inóculos I, II e III) a 100°C por 15 minutos, sob agitação constante, como forma de promover a homogeneidade térmica em todo volume aquecido. A seguir, a amostra foi imersa em banho de gelo e monitorada até que a temperatura atingisse 25°C (MAINTINGUER et al., 2008).

4.3.3 Reativação dos inóculos pré-tratados

Alíquotas (20% em relação ao volume do meio líquido) dos inóculos I, II e III provenientes do pré-tratamento foram incubadas em reatores anaeróbios em batelada (100 mL) contendo 60 mL do meio de cultivo (Tabela 4.1) e 40 mL de *headspace* (N₂ 100%), em pH 5,5 e mantidas a 37°C até o crescimento das culturas durante 72 horas. A reativação celular foi monitorada por análises esporádicas de microscopia de luz comum.

4.3.4 Enriquecimento celular

O enriquecimento celular foi realizado nos inóculos I, II e III por meio da técnica de diluições seriadas (Figura 4.2 e Figura 4.3), realizadas diversas vezes, em meio de cultivo (Tabela 4.1), *headspace* de N₂ (100%), pH 5,5 e mantidos a 37°C, durante 72 horas cada purificação. O reator de maior diluição do primeiro enriquecimento foi utilizado como precursor para a segunda etapa de enriquecimento celular.

Figura 4.2 - Primeira etapa de enriquecimento celular dos inóculos pré-tratados (I, II e III, onde 1- *headspeace* e 2- inóculo pré-tratado em meio de cultivo)

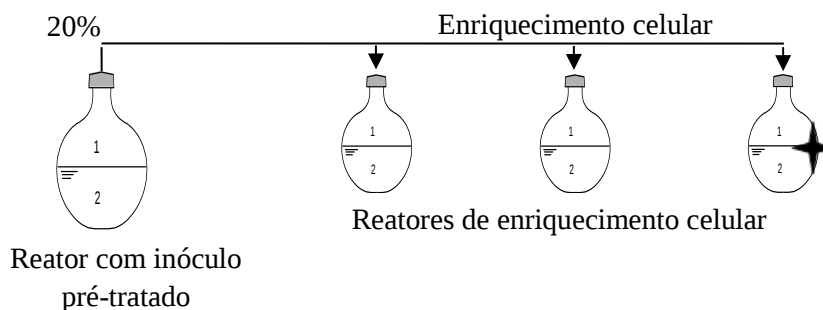
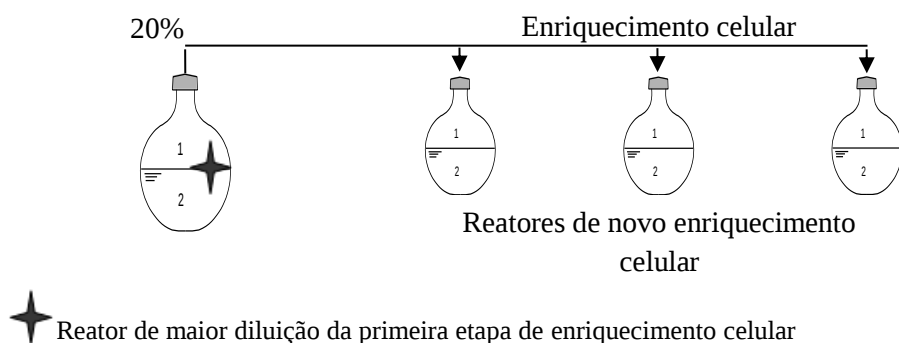


Figura 4.3 - Segunda etapa de enriquecimento celular dos inóculos pré-tratados (I, II e III, onde 1- *headspeace* e 2- inóculo pré-tratado em meio de cultivo)



Após 72 horas de crescimento da biomassa na segunda etapa de purificação, análises esporádicas de microscopia de luz comum foram realizadas, bem como o monitoramento da geração de gás hidrogênio, que foi medida por meio da cromatografia gasosa, conforme descrito posteriormente. Para os inóculos que apresentaram maiores gerações de H_2 foram utilizados nas etapas subsequentes descritas abaixo, como enriquecimento e reativação, prévias à sua utilização nos ensaios em reatores anaeróbios em batelada.

4.3.5 Enriquecimento dos inóculos purificados

Foram realizados enriquecimentos dos inóculos purificados que apresentaram atividade para a produção de H_2 por meio de constante reativação. Sendo assim, alíquotas (20%) dos inóculos foram incubadas em reatores anaeróbios em batelada (100 mL) contendo 60 mL do meio de cultivo (Tabela 4.1), em pH 5,5 e mantidas a 37°C até o crescimento das

culturas (72 h) com *headspace* de N₂ (100%) para garantir a anaerobiose. Após o enriquecimento, a biomassa foi armazenada a -20°C com glicerina (P.A.).

4.3.6 Reativação da biomassa enriquecida

A reativação da biomassa enriquecida foi realizada com antecedência de 72 horas à montagem de cada ensaio de geração de H₂. Os inóculos escolhidos por apresentarem maiores gerações de H₂ (I e II) foram reativados, separadamente, em alíquotas (20%) nos reatores anaeróbios de 500 mL, contendo 300 mL de meio de cultivo (Tabela 4.1), pH 5,5, mantidos a 37°C durante 72 horas e *headspace* preenchido com N₂ (100%). Após esse período, os inóculos reativados foram ressuspensos em centrífuga refrigerada a 4°C, a 9000 rpm, durante 10 minutos e utilizados como biomassa nos reatores anaeróbios operados em batelada, separadamente, conforme descrito a seguir. O mesmo procedimento de reativação da biomassa foi realizado para a cultura pura, 72 horas antes da montagem do ensaio.

4.4 Ensaios de geração de H₂ em reatores anaeróbios em batelada

Inicialmente, foi realizado um ensaio, em duplicata, envolvendo o inóculo (I) (20% v/v) com o glicerol bruto sem o pré-tratamento, para a sua avaliação quanto à geração de H₂. Para isso, foi montado um ensaio contendo 10 g DQO L⁻¹ de glicerina e 10 DQO L⁻¹ de glicerol bruto sem pré-tratamento, em meio PYG modificado (5g L⁻¹ extrato de levedura, 5g L⁻¹ extrato de carne e 5g L⁻¹ peptona de levedura), em pH 5,5, mantidos a 37°C. As concentrações de H₂ obtidas por meio deste pré-teste foram usadas para justificar o pré-tratamento do glicerol bruto nos ensaios de geração de H₂ subsequentes.

Os reatores anaeróbios em batelada foram montados em duplicata para três condições distintas: (a), (b) e (c). A concentração da fonte de carbono em cada reator foi de 20 g DQO L⁻¹ para todos os ensaios. Logo, para a condição (a), foi inserido como fonte de carbono, 50% de glicerol bruto pré-tratado e 50% de glicerina, o que corresponde a 10 g L⁻¹ em DQO de glicerol bruto pré-tratado e 10 g L⁻¹ em DQO de glicerina. Assim, para a condição (b), foram adicionados 4 g L⁻¹ em DQO (20%) de glicerina e 16 g L⁻¹ (80%) em DQO de glicerol bruto pré-tratado e para a condição (c), 20 g L⁻¹ (100%) em DQO de glicerol bruto pré-tratado, sem adição de glicerina.

Para cada ensaio, alíquotas de 20% (em relação ao volume total do meio de cultivo) dos inóculos (I) e (II) reativados foram adicionadas, separadamente, em duplicatas de reatores

anaeróbios em batelada (1L) contendo 650 mL de meio PYG modificado (5 g L⁻¹ extrato de levedura, 5 g L⁻¹ extrato de carne e 5 g L⁻¹ peptona de carne) em diferentes proporções de glicerina e glicerol bruto pré-tratado, conforme descritos anteriormente, para cada uma das três condições, em pH 5,5, *headspace* de N₂ (100%) e mantidos a 37°C. Assim, os ensaios foram denominados como: Ensaio (I)-a, envolvendo o inóculo (I) para a condição (a); Ensaio (I)-b, envolvendo o inóculo (I) para a condição (b); Ensaio (I)-c, envolvendo o inóculo (I) para a condição (c); Ensaio (II)-a, envolvendo o inóculo (II) para a condição (a); Ensaio (II)-b, envolvendo o inóculo (II) para a condição (b) e Ensaio (II)-c, envolvendo o inóculo (II) para a condição (c). Quanto ao ensaio envolvendo a cultura pura, um reator na condição (c) foi montado a fim de se realizar um comparativo com os consórcios microbianos trabalhados. A tabela 4.2 sumariza as condições dos ensaios realizados.

Tabela 4.2 – Condições dos ensaios da geração de H₂ operados em batelada a 37°C, pH 5,5 para consórcios (I) e (II) e pH 7,0 para cultura pura.

Nome do Ensaio	Inóculo	Glicerol (20 g DQO L ⁻¹)	
		Glicerol bruto pré-tratado	Glicerina (comercial)
Ensaio (I)-a	(I)	50% (10 g DQO L ⁻¹)	50% (10 g DQO L ⁻¹)
Ensaio (I)-b	(I)	80% (16 g DQO L ⁻¹)	20% (4 g DQO L ⁻¹)
Ensaio (I)-c	(I)	100% (20 g DQO L ⁻¹)	-
Ensaio (II)-a	(II)	50% (10 g DQO L ⁻¹)	50% (10 g DQO L ⁻¹)
Ensaio (II)-b	(II)	80% (16 g DQO L ⁻¹)	20% (4 g DQO L ⁻¹)
Ensaio (II)-c	(II)	100% (20 g DQO L ⁻¹)	-
Ensaio cultura pura	<i>Enterobacter</i> sp.	100% (20 g DQO L ⁻¹)	-

Para todos os ensaios foram monitoradas as gerações de H₂ no *headspace*, pressão gasosa interna dos reatores, crescimento celular, consumo do glicerol, pH, DQO, sólidos totais voláteis, geração de produtos intermediários como compostos orgânicos voláteis, sendo eles os ácidos orgânicos e álcoois e a identificação da comunidade bacteriana nos inóculos (I) e (II), conforme descritos a seguir.

4.5 Análises

4.5.1 Determinação do biogás no *headspace* dos reatores anaeróbios

H₂, N₂ e CH₄ foram determinados em cromatógrafo à gás TOGA - Transformer Oil Gas Analyser, com um sistema acoplado com Trace GC Ultra – Thermo Gas Chromatograph equipado com injetor split/splitless e dois detectores: detector de condutividade térmica (TCD) e detector de ionização de chama (FID). A fração contendo H₂, N₂ e CH₄ foi analisada por coluna Rt-MSieve 5A° 30 m x 0,53mm i.d. Hidrogênio e nitrogênio foram detectados por TCD e o CH₄ foi detectado pelo FID a 250°C depois de passar através do metanizador. Quando a coluna de peneira molecular foi passada, o CO₂ foi eluído dos poros do polímero da coluna Carboxen 1006 plot 30m x 0,53 mm i.d e detectados pelo detector de ionização de chama (FID) depois de passar através do metanizador. Argônio foi usado como gás de arraste (1,5 mL min⁻¹ em modo splitless). O detector TCD e injetor foram ajustados a 150°C. A programação do forno foi 50°C (4,5 min), taxa de aquecimento de 40°C min⁻¹ a 180 °C (1,5 min) com taxa de resfriamento de 50°C min⁻¹ a 50°C (3,15 min).

4.5.2 Análise de pressão gasosa

A pressão interna dos reatores foi determinada com medidor de pressão marca Labtrix modelo XL28.1 (faixa -20 A a 20 MCA – Metros de coluna d'água), tipo diferencial, previamente à medição de H₂ por cromatografia gasosa.

4.5.3 Cálculos geração H₂

O medidor de pressão forneceu valores em metros de coluna d'água (MCA). Sendo assim, primeiramente obteve-se a pressão absoluta para cada medida de H₂ (Eq. 4.7).

$$\text{Pressão Absoluta} = \text{Pressão manométrica} + \text{Pressão atmosférica} \quad \text{Eq. 4.7}$$

Sendo que a pressão atmosférica foi considerada a pressão em MCA do dia em que a curva de calibração foi realizada.

Em seguida, com o número de mols calculado através das curvas de calibração já realizadas, foi possível, por meio de uma relação direta, calcular o numero de mols na pressão interna do reator em 1mL (volume da seringa) (Eq. 4.8).

$$N^{\circ} \text{ de mols ajuste de pressão} = \frac{n^{\circ} \text{ mols obtidos na curva} \times \text{pressão absoluta}}{\text{pressão da curva}} \quad \text{Eq. 4.8}$$

Obter o número de mols no *headspace* (Eq. 4.9).

$$N^{\circ} \text{ de mols ajustado no headspace} = \frac{n^{\circ} \text{ mols ajuste de pressão} \times \text{volume do headspace}}{1 \text{ mL}} \quad \text{Eq. 4.9}$$

Obter o número de mols de H₂ por litro de meio de cultivo (Eq. 4.10).

$$N^{\circ} \text{ de mols H}_2 \text{ no headspace por litro de meio de cultivo} = \frac{n^{\circ} \text{ mols ajuste de headspace} \times 1000}{\text{volume de meio de cultivo utilizado}} \quad \text{Eq. 4.10}$$

4.5.4 Análise de Crescimento Celular

O crescimento celular foi monitorado pela densidade óptica a 600 nm (OD₆₀₀) e a massa celular foi expressa como Sólidos Totais Voláteis (STV g L⁻¹) de acordo com APHA (2005) e foram calculados pelas equações (A) e (B), correspondendo aos inóculos (I) e (II) respectivamente. Foram montados reatores anaeróbios (2 L) em duplicata, alimentados com 100% de glicerol bruto pré-tratado, meio PYG modificado, nas mesmas condições do ensaio (c) para ambos os inóculos, como volume reacional de 1,3 L, *headspace* de 700 mL preenchido com gás N₂ e inóculo do enriquecimento celular (20%). Os reatores foram mantidos a 37°C. A concentração de STV (g L⁻¹) da biomassa purificada foi proporcional à absorbância a 600 nm.

$$(A) \text{ STV} = 0,0046 \times \text{ABS}_{600} + 0,0111 \quad (R^2 = 0,9995)$$

$$(B) \text{ STV} = 0,0016 \times \text{ABS}_{600} + 0,0121 \quad (R^2 = 0,9785)$$

Os monitoramentos de pH, DQO e os consumos de glicerol foram realizados, conforme descritos anteriormente na caracterização do glicerol bruto (4.2.1.1; 4.2.1.2 e 4.2.1.3 respectivamente).

4.5.5 Análises microscópicas

Foram feitos exames microscópicos das amostras dos inóculos utilizados nas montagens dos reatores anaeróbios através de coloração de Gram, onde, por meio desta técnica, conseguiu-se diferenciar os microrganismos quanto às morfologias (RIBEIRO;

SOARES, 1993). Células Gram positivas coram-se em azul-violeta e células Gram negativas, em vermelho. As imagens foram capturadas por meio de câmera Moticam 2000 e software MOTIC Images Plus 2.0 em microscópio Motic AE31, com captura de imagens, com ampliação de 1000X para ambos os inóculos (I) e (II).

4.5.6 Determinação de compostos orgânicos no meio líquido

As análises foram realizadas em um cromatógrafo a gás Shimadzu, modelo GC 2010, equipado com injetor Split/Splitless e detector de ionização por chama (FID) de alta frequência. O cromatógrafo foi acoplado a um auto amostrador modelo AOC-5000, configurado para amostragem líquida e *headspace*. Toda a estação de trabalho foi controlada pelo programa GCSolution versão 2.32. As condições cromatográficas utilizadas neste trabalho foram injetor PTV e detector FID em temperaturas de 250 °C. A programação de temperatura do forno foi inicialmente de 45 °C por 1 min, seguido de rampa de aquecimento a 50 °C min⁻¹ até a temperatura final de 250 °C, mantida por 3 min. A coluna analítica utilizada foi a coluna RTX-1 (30 m x 0,32 mm x 3,0 µm). Como gás de arraste foi utilizado Hélio com velocidade linear constante de 51,6 cm s⁻¹ (1 mL min⁻¹). O preparo da amostra foi feito adicionando-se 1 g de NaCl em vials de *headspace* de 20 mL, com 2,5 mL da solução a ser determinada, com 100µL de H₂SO₄ 2M, com extração por *headspace* a 100°C por 15 minutos.

4.5.7 Determinação de 1,3 propanodiol no meio líquido

A análise foi realizada no Instituto de Biociências UNESP – Rio Claro – Departamento de Bioquímica - em um cromatógrafo líquido de alto desempenho da marca Shimadzu, série Prominence, com detector de índice de refração. A coluna utilizada foi a Rezex ROA (300 x 7,8 mm) da Phenomenex, eluída com H₂SO₄ 0,005N como fase móvel, fluxo de 0,6 mL/min, volume de injeção de 5 µL e temperatura de 65°C.

4.5.8 Análises de Biologia Molecular

A identificação dos consórcios microbianos geradores de H₂ (I e II) foi realizada em Plataforma Illumina. Tais análises compreenderam: Extração do DNA genômico, Pré-processamento e Montagem e Análise Metagenômica, conforme descrito a seguir.

Extração do DNA genômico:

O DNA genômico total foi obtido após a lise celular com *glass beads* e extração com fenol-clorofórmio como descrita por Griffiths et al. (2000) com modificações.

Pré-processamento e montagem:

A etapa de obtenção dos dados brutos foi feita pelo *software* CASAVA 1.8.2, fornecido pela Illumina, que fez o *base call* dos dados brutos e os transformou em *reads* no formato fastq acompanhados dos *scores* de qualidade phred. Os *reads* foram visualizados utilizando o programa FastQC (www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/).

A filtragem dos *reads* de baixa qualidade, sequências de adaptadores e vetores foi realizada pelo programa Seqclean (<https://bitbucket.org/izhbannikov/seqclean>), utilizando como cutoff bases com qualidade inferior a 24QScore. A base de dados de contaminantes usada foi a Univec (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/UniVec.html>). Após filtragem, *reads* com tamanho inferior a 65pb foram removidos.

Análise de Sequenciamento em Larga Escala:

Para a análise de metagenômica foi utilizada a base de dados RDP (COLE et al., 2014) de Bacteria. O pipeline usado foi o do pacote QIIME v 1.9 (CAPORASO et al., 2010) em 3 etapas:

1) Concatenação dos *reads* paired-end.

2) Filtragem, procura e identificação de OTUs. Nessa etapa o programa também realizou uma montagem de novo dos *reads* que não tiveram *hit* com a base de dados e procurou *hit* contra todas as bases disponíveis.

3) Análises de rarefação, alfa e beta diversidade. Para essas análises foi levada em consideração a profundidade de cobertura da amostra com menos *reads* para utilizar o parâmetro *-sampling_depth* de forma adequada.

Os scripts do QIIME utilizados para quatro ou mais amostras foram: *pick_open_reference_otus.py*; *merge_otu_tables.py*; *biom convert*; *biom summarize-table*; *core_diversity_analyses.py*. Para até três amostras: *pick_open_reference_otus.py*; *biom convert*; *biom summarize-table*; *alpha_diversity.py*; *beta_diversity.py*; *alpha_rarefaction.py*.

As sequências foram submetidas no Centro Nacional de Informação Biotecnológica, NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, pelo Arquivo de Leitura de Sequência

(SRA) número SRP075454, sob o número de acesso: SRX1786831 e SRX1786833, respectivamente para inóculo (I) e (II), (Bioconversion of crude glycerol from the biodiesel production from used cooking oil, to generate hydrogen through fermentative anaerobic bacteria consortia). O número de acesso do projeto é: PRJNA322194.

4.5.9 Ajuste do modelo de Gompertz aos dados experimentais dos ensaios de produção de H₂

Os dados experimentais obtidos durante os ensaios foram ajustados para os valores médios obtidos das duplicatas dos reatores em batelada utilizando o software Statistica® (versão 8.0). A taxa máxima de produção de hidrogênio foi obtida por ajuste sigmoidal não linear da função Gompertz modificada (LAY et al., 1998a) indicada abaixo pela equação 4.11, onde: P é o potencial de produção de hidrogênio (mmol L⁻¹ cultura), Rm é a taxa máxima de produção de hidrogênio (mmol L⁻¹ cultura. h), λ é a duração da fase *lag* (h) de geração de H₂ e e vale 2,718281828.

$$H = P \times \exp \left\{ - \exp \left[\frac{Rm \times e}{P} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad \text{Eq. 4.11}$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do Glicerol Bruto

Os valores obtidos durante a caracterização do glicerol bruto (Tabela 5.1) neste trabalho variaram com outros estudos presentes na literatura, tendo em vista que houve diferenças quanto às matérias-primas e catalisadores empregados para o processo de transesterificação envolvendo a sua obtenção. De acordo com Valerio e colaboradores (2015), a heterogeneidade da matéria-prima e o processo utilizado em cada fábrica de biodiesel podem contribuir com a variabilidade do glicerol bruto.

Tabela 5.1 - Caracterização do glicerol bruto usado nos ensaios de geração biológica de H₂

pH	DQO (g L ⁻¹)	Glicerol Livre (m/m) (%)	Umidade e Materiais Voláteis (%)	Teor de Água (%)	Teor de Sabão (m/m) (%)	Metanol (m/m) (%)	Teor de Cinzas (m/m) (%)	MONG (v/v) (%)
10,00	1961,33	10,41	22,75	5,84	23,38	15,84	3,04	34,57

Por se tratar de um processo envolvendo a catálise básica, a adição de NaOH nos processos de fabricação de biodiesel gera resíduos com índices elevados de basicidade. Isso é confirmado na caracterização do glicerol bruto (Tabela 5.1), cujo pH foi 10,00. Hu e colaboradores (2012) trabalharam com a caracterização de cinco amostras de glicerol bruto proveniente das plantas de produção de biodiesel, oriundas da transesterificação de óleo de soja e óleos vegetais residuais. A maioria dessas amostras estudadas por Hu apresentaram valores de pH próximos a 10,00, justificado pelos autores o fato de haver resíduos álcalis, tais como NaOH ou KOH provenientes da produção de biodiesel. Resíduos desta produção apresentando pH 12 já foram utilizados em outros trabalhos para a bioconversão à H₂ por comunidades microbianas (MANGAYIL, et al., 2012).

A DQO é um parâmetro global utilizado como indicador do conteúdo orgânico de um resíduo. Causará DQO a amostra que contiver substâncias orgânicas e/ou inorgânicas passíveis de oxidação pelo dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇) em meio ácido (AQUINO et al., 2006). O resultado do teste fornece uma indicação do oxigênio requerido para a estabilização da matéria (SPERLING, 1996). A reação ocorre por meio da adição de uma solução de digestão (dicromato de potássio e sulfato de mercúrio) com uma solução de ácido sulfúrico e sulfato de prata. A maioria das matérias orgânicas pode ser oxidada por um oxidante forte,

entretanto, os ácidos carboxílicos de cadeia linear não podem ser oxidados na ausência de um catalisador de sulfato de prata. O sulfato de prata é, portanto, adicionado aos testes da DQO para facilitar a oxidação completa. Entretanto, o íon cloreto, um constituinte comum no meio aquoso, reage com íons prata precipitando cloreto de prata e, portanto, elimina a atividade catalítica da prata produzindo uma interferência negativa. Assim, o sulfato de mercúrio é adicionado para minimizar a interferência da reação (HU; GRASSO, 2005). A DQO obtida durante a caracterização do glicerol bruto no presente trabalho (Tabela 5.1), apresentou um valor elevado ($1961,33 \text{ g L}^{-1}$) já que se trata de um resíduo oriundo de um processo de transesterificação envolvendo uma matéria-prima composta, contendo uma mistura de óleos de cozinha usados com possíveis impurezas possuindo uma carga orgânica elevada. No trabalho de Selembo e colaboradores (2009), o substrato glicerol bruto utilizado pelas culturas mistas de microrganismos para a geração de H_2 apresentou um valor de DQO mais reduzido (1300 mg L^{-1}) por se tratar de um coproduto da transesterificação do óleo de soja, tendo uma carga orgânica mais baixa do que o resíduo utilizado neste trabalho.

O glicerol bruto que sai da reação contém impurezas tais como, quantidade variada de água, resíduos de catalisadores, metanol, óleo vegetal (triacilgliceróis), ésteres metílicos, produtos intermediários da reação como mono e diacilgliceróis, além de ácidos graxos livres que contribuem com um valor de DQO elevado (SEQUINEL, 2013).

Um dos parâmetros mais importantes para se estabelecer a qualidade do glicerol proveniente das usinas de biodiesel é o seu teor em relação à massa total. O chamado “glicerol bruto” pode conter praticamente qualquer teor de glicerol, sendo que valores abaixo dos 30% são bastante comuns dependendo da eficiência do processo de produção e da qualidade de separação de fases ao final da reação de transesterificação (SEQUINEL, 2013). Conforme encontrado no presente trabalho, $114,77 \text{ g L}^{-1}$ de glicerol corresponde a um teor de 10,41% (m/m) em relação à massa total. Sarma e colaboradores (2013 b) trabalharam com glicerol bruto, proveniente do processo de produção do biodiesel envolvendo resíduos de fábricas do processamento de carne e gorduras usadas de restaurantes, contendo 23,63% (m/m) de glicerol para a geração de H_2 envolvendo a cultura pura *Enterobacter aerogenes* NRRL B 407. No trabalho de Hu e colaboradores (2012), durante a caracterização das várias amostras de glicerol bruto, o substrato proveniente de resíduos de óleos vegetais apresentou um teor de glicerol de 27,80%, diferentemente do glicerol bruto proveniente de óleo de soja puro, cujo teor determinado pelo trabalho deste autor foi de 63,00%. Valerio e colaboradores (2015) caracterizaram dois gliceróis brutos de fontes distintas, sendo o primeiro proveniente de processo industrial não purificado e o outro glicerol bruto não purificado proveniente de

produção de biodiesel. Para estes dois substratos, os teores de glicerol encontrados foram 30,2% e 15,4% respectivamente. De acordo com o autor, esses valores reduzidos mostram que as etapas de produção de biodiesel e matéria-prima podem afetar grandemente a qualidade do glicerol bruto obtido como coproduto.

A determinação do teor de água encontrada durante a caracterização do glicerol bruto foi de 5,84%, onde teores de água de até 10% são bastante comuns (SEQUINEL, 2013). A purificação do biodiesel pode ser feita por lavagem de água ou por lavagem a seco, sendo que esta última foi realizada na usina piloto da Ibiotec, que consistia em duas colunas compostas de resinas mistas (catiônicas e aniônicas). Se o valor do teor de água presente no glicerol bruto fosse superior a 10%, poderia atribuir esse aumento à incorporação da água de lavagem para a purificação do biodiesel. Como não foi realizado este tipo de purificação no biodiesel, este teor de água encontrado é justificado pelo glicerol bruto ser altamente higroscópico e absorver umidade do ambiente. A caracterização realizada por Hu et al. (2012) em seu trabalho mostrou que o glicerol bruto proveniente de resíduos de óleo vegetal continha 4,10% de água em sua composição. O teor de água encontrado no glicerol bruto não purificado proveniente de uma produção de biodiesel do estudo de Valerio et al. (2015) foi de 5,10%, valor próximo ao do presente estudo já que não foram realizadas etapas de purificação no biodiesel em ambos os casos apresentados na literatura.

Uma impureza considerada como majoritária na composição do glicerol bruto é o metanol, reagente adicionado no processo de transesterificação. De acordo com Hu et al. (2012), durante o processo de produção de biodiesel, geralmente é utilizado excesso de metanol a fim de se aumentar o rendimento de geração de biodiesel. Após o processo de produção, este excesso de metanol acumula-se no glicerol bruto, onde seu teor varia principalmente de acordo com as concentrações de entrada de metanol no processo. A sua presença neste resíduo é considerada um aspecto negativo, tendo em vista que afeta o crescimento microbiano, podendo interferir na rota metabólica de geração de H_2 . No presente trabalho foi observado teor de 15,84% (m/m). Valores mais elevados foram encontrados no trabalho de Ito e colaboradores (2005), com glicerol oriundo da produção de biodiesel contendo 25% (m/m) de metanol. No trabalho de Valerio e colaboradores (2015), a caracterização das duas amostras de glicerol bruto resultou numa determinação de metanol de 14,40% e 15,50% para ambas, que são valores próximos ao encontrado no presente estudo.

O teor de umidade e materiais voláteis encontrado no glicerol bruto foi de 22,75%. Como foi visto que este substrato apresentou teor de água de 5,84% e teor de metanol de 15,84%, a soma destes últimos resulta em um valor aproximado, 21,68%, ao que foi obtido

pelo método experimental, onde se pode inferir que o glicerol bruto tinha como materiais voláteis, uma composição basicamente de metanol e água.

O sabão presente no glicerol bruto representa uma das maiores impurezas encontradas e que são consideradas nocivas à biomassa, inviabilizando suas atividades metabólicas (SARMA et. al, 2012). Sua formação também se deve à matéria-prima utilizada, como óleo de cozinha usado, que pode conter concentrações elevadas de ácidos graxos livres e esses, na presença do catalisador básico durante a reação de transesterificação, geram produtos saponificados que se acumulam no glicerol bruto. Aproximadamente 23,38% (m/m) de sabão foi determinado no glicerol bruto do presente trabalho. Durante a caracterização do estudo de Hu et al., (2012), o valor encontrado para o teor de sabão na amostra de glicerol bruto proveniente de resíduos de óleos vegetais foi de 20,5%, valor próximo ao obtido no presente trabalho. O glicerol bruto não purificado proveniente da produção de biodiesel utilizado no estudo de Valerio e colaboradores (2015) apresentou um teor de sabão de 22,40%, correspondendo assim a um valor próximo ao entrado no trabalho anterior de Hu et al., (2012) e no presente estudo.

A análise do teor de cinzas fornece informações da quantidade de catalisador utilizada no processo de transesterificação, onde, sua maior parte migra para a fase glicerínica e que quando calcinados permanecem na forma de sais de sódio ou potássio. Além disso, esse método pode quantificar outros sais presentes em menores quantidades, provenientes da própria matéria-prima (óleo de cozinha usado) e do tratamento ácido seguido de neutralização elevando o teor de cinzas, devido à formação de sais de metais alcalinos (SEQUINEL, 2013). Conforme apresentado (Tabela 5.1), 3,04% de teor de cinzas foi determinado na análise de caracterização do glicerol bruto. Rossi e colaboradores (2011) trabalharam com glicerol bruto, visando à geração de hidrogênio, com um valor superior do teor de cinzas, cerca de 6,4%. As duas amostras de glicerol bruto não purificado, provenientes de óleos vegetais residuais e óleo de soja residual, do estudo de caracterização do pesquisador Hu et al. (2012), apresentaram teores de cinzas de 2,70% e 5,70%. Compatível ao que se encontra na literatura para trabalhos envolvendo caracterização de glicerol bruto, os resultados encontrados por Valerio et al. (2015) não foram diferentes, onde suas amostras de fontes distintas de glicerol bruto não purificado proveniente de plantas de produção de biodiesel, apresentaram teores de cinza de 3,50% e 4,20%.

MONG corresponde à Matéria Orgânica Não Glicerol que é composta por coprodutos da reação de transesterificação (mono, di e triacilgliceróis) além de ácidos graxos livres. De acordo com Hu et al. (2012), a presença de éster metílico de ácidos graxos, que correspondem

aos resíduos de biodiesel, no glicerol bruto foi provavelmente causado pela separação incompleta entre camadas de ésteres e glicerol durante o processo de produção de biodiesel. A baixa solubilidade do glicerol em ésteres de cadeia carbônica longa (que são os principais componentes da MONG) faz com que haja uma tendência natural de separação de fases entre o glicerol e MONG. Porém, em pH elevado, devido ao excesso de catalisador proveniente do processo de transesterificação, forma uma grande quantidade de sabões dificultando essa separação natural de fases. Por isso, durante a determinação de MONG, o pH do glicerol bruto foi reduzido a 3. Marques e colaboradores (2009) trabalharam com a geração de biohidrogênio utilizando um glicerol bruto contendo 6,2% de MONG, valor reduzido ao determinado no presente trabalho que foi de 34,57%. Os teores de MONG encontrados no trabalho de Hu e colaboradores (2012) variaram de 26,1% a 55,8%.

Na “Determinação da Aparência pelo Método Visual”, não foi observado material precipitado, consistindo de apenas uma fase, sendo líquida e de cor castanha. A coloração escura é advinda do óleo vegetal (óleo de cozinha usado) e do processo do transesterificação, mostrando que há grande quantidade de MONG e demais impurezas (Figura 5.1a).

Houve, portanto, a necessidade de ser realizado processo de pré-tratamento a fim de se reduzir tal interferência para a realização dos ensaios de geração de H_2 . Chi e colaboradores (2007) observaram o efeito inibitório da presença de sabões na atividade microbiana e por isso fizeram um ajuste do pH para 6,5 com adição de ácido clorídrico a fim de converter sabões solúveis à ácidos graxos insolúveis, ocorrendo assim uma separação de fases, onde a fase superior corresponde aos ácidos graxos livres e a parte inferior corresponde ao glicerol. Assim sendo, o resultado obtido do pré-tratamento do glicerol bruto (Figura 5.1b) foi eficiente, tendo em vista que a sua coloração após o tratamento ácido tornou-se mais clara, mostrando que grande parte da MONG foi eliminada, bem como a DQO do glicerol bruto pré-tratado reduziu, apresentando um valor de 1071,79 g DQO L^{-1} . Com isso, o glicerol bruto tornou-se mais apropriado ao uso dos microrganismos para seu consumo. Outros autores já relataram em seus trabalhos a realização do pré-tratamento do glicerol bruto e sua importância para uma eficiente geração de H_2 por bactérias.

Figura 5.1 - Visualização do Glicerol bruto: (a) sem tratamento e (b) após tratamento ácido



(a)

(b)

Fonte: Elaborada pela autora

No estudo desenvolvido por Ngo e colaboradores (2011), a produção de biohidrogênio se deu por meio da bactéria *Thermotoga neapolitana* DSM 4359 sob duas condições distintas, trabalhando-se com o glicerol bruto, proveniente da indústria do biodiesel, sem passar pelo pré-tratamento e passando pelo pré-tratamento para eliminação de metanol por rotaevaporação, onde se avaliou a geração de H_2 em comparação com estas duas condições. O nível de H_2 produzido a partir da fermentação com glicerol bruto pré-tratado foi superior ao da fermentação do glicerol bruto não tratado. A produção de hidrogênio pela *T. neapolitana* a partir do glicerol bruto pré-tratado foi de $1,97 \text{ mol } H_2 \text{ mol}^{-1} \text{ glicerol}$ e com o glicerol bruto sem pré-tratamento foi de $1,27 \text{ mol } H_2 \text{ mol}^{-1} \text{ glicerol}$, onde o autor conclui que o pré-tratamento do substrato desempenhou um papel chave na conversão do resíduo à biohidrogênio.

Ethier et al. (2011) realizou o processo de pré-tratamento do glicerol bruto, proveniente de uma planta de produção de biodiesel, que era abastecida com uma mistura de 50% de óleo de soja e 50% de gordura de frango, onde neste pré-tratamento foi eliminado o sabão, pela redução do pH do glicerol bruto à 3, e o metanol, pela esterilização do substrato em autoclave. Segundo Ethier e colaboradores, estas impurezas representavam um efeito inibitório ao crescimento celular, onde este substrato tratado foi utilizado para investigar as cinéticas de crescimento e parâmetros fisiológicos da microalga *Schizochytrium limacinum* para a produção do ácido docohexaenóico.

Zhou e colaboradores (2014) realizaram um estudo a fim de se determinar a capacidade da cultura *Rhizopus arrhizus* de assimilar o glicerol bruto, proveniente da produção de biodiesel, para então o ácido fumárico ser produzido. Para isso, o glicerol bruto foi pré-tratado com ácido fosfórico, reduzindo-se o pH a 4,0 para que ocorresse a separação dos sabões à ácidos graxos insolúveis. Uma nova etapa de purificação foi descrita no trabalho de Zhou et al., que consiste na remoção do metanol deste substrato por meio de uma destilação a 75°C. Todos estes pré-tratamentos foram conduzidos a fim de que se garantissem condições adequadas ao crescimento desta cultura.

Após o tratamento com ácido para recuperação da MONG há a possibilidade de reutilização deste resíduo para produção de mais biodiesel por meio de esterificação e transesterificação. Sendo assim, toda a matéria orgânica não glicerol que foi separada do glicerol bruto por meio do tratamento ácido, pode voltar ao processo para obtenção de mais biodiesel (SANTORI et al., 2012).

5.2 Pré-tratamento dos inóculos (I), (II) e (III)

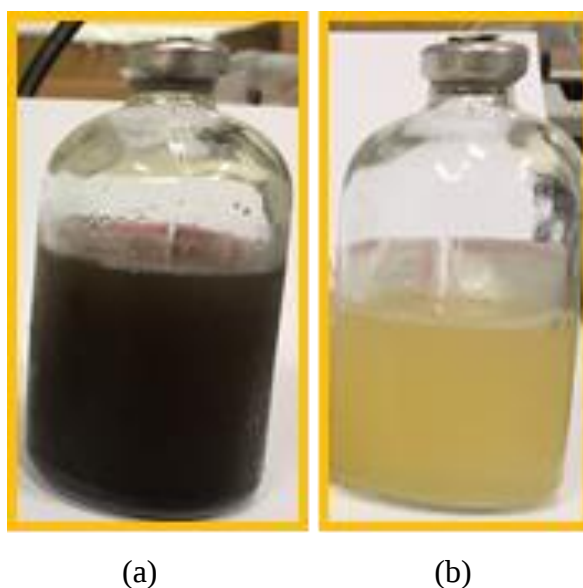
A primeira reativação feita nos inóculos (I), (II) e (III) em meio PYG modificado (Tabela 4.1) e em pH 7,0, teve como objetivo favorecer o crescimento das bactérias anaeróbias presentes nas amostras.

O pré-tratamento empregado neste estudo consistiu no choque térmico como forma de eliminar as arqueias metanogênicas consumidoras de hidrogênio, aumentando assim a eficiência de geração deste biogás. Segundo o trabalho de Rossi et al. (2011) para a seleção de bactérias geradoras de H₂ a partir de diferentes pré-tratamentos da biomassa para consumir o glicerol bruto, o que tem se mostrado mais eficiente foram os processos envolvendo calor, sendo um dos melhores, o choque-térmico. Maintinguer et al. (2008) realizaram em seu trabalho o pré-tratamento do inóculo, conforme foi empregado neste presente estudo, a 90°C por 15 minutos, para inibir a atividade metanogênica, inativando assim as consumidoras de H₂ e favorecer as bactérias geradoras deste biogás e formadoras de endósporos semelhantes ao gênero *Clostridium* sp. Assim como Maintinguer et al. (2008), Douvanis e colaboradores (2015) realizaram o mesmo procedimento de pré-tratamento à 100°C por 20 minutos em uma cultura mista acidogênica de estação de tratamento de esgoto a fim de se inibir a metanogênese e assegurar a dominância de bactérias produtoras de gás hidrogênio durante a fermentação do glicerol bruto proveniente de uma planta de produção de biodiesel à partir de óleo de girassol.

Após a realização do pré-tratamento nos inóculos (I), (II) e (III), houve uma nova etapa de reativação em meio de cultivo PYG modificado (Tabela 4.1) em pH 5,5. A imposição do pH 5,5 foi mais um parâmetro utilizado para a inibição da metanogênese, uma vez que tais microrganismos sobrevivem na faixa entre 6,3 e 7,8 (LI; FANG, 2007). Apesar das bactérias formadoras de endósporos, tais como espécies de *Clostridium*, mostrarem tolerância em pH elevado, as anaeróbias facultativas, tais como espécies de *Enterobacter* e *Klebsiella* têm mostrado uma faixa muito restrita de pH ótimo entre 5,0 e 6,0 para a produção de hidrogênio (ROSSI et al., 2011).

Diluições seriais realizadas sequencialmente permitiram a purificação da biomassa (Figura 5.2), conforme descritos na seção 4.3.4.

Figura 5.2 - Purificação celular dos inóculos pré-tratados (I, II e III): (a) reator com inóculo pré-tratado e (b) reator com biomassa purificada



Fonte: Elaborada pela autora

Através de análises de geração de H_2 , por cromatografia gasosa, nos reatores com a biomassa purificada, foi descartada a possibilidade da utilização do inóculo (III), tendo em vista que não houve produção de H_2 . Nos inóculos I e II foram verificados gerações de H_2 (Tabela 5.2) e os mesmos foram utilizados nas montagens subsequentes dos reatores anaeróbios em batelada.

Tabela 5.2 - Quantificação de H₂ produzido em testes preliminares com os três tipos de inóculos testados (I), (II) e (III)

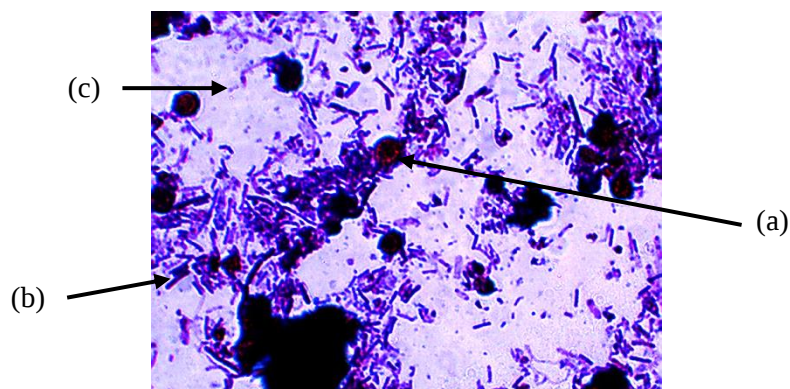
Inóculo	H ₂ gerado (mmol H ₂ L ⁻¹)
Inóculo (I)	11,53
Inóculo (II)	18,62
Inóculo (III)	< l.d.
l.d. - limite de detecção H ₂ = 0,000767 mmol H ₂	

O inóculo (III) era proveniente de um sistema de lodos ativados e, portanto, aeróbio. A princípio, a sua escolha para ser analisada a viabilidade de geração de hidrogênio se deveu ao fato de que poderia haver bactérias semelhantes a *Enterobacter*, que são anaeróbias facultativas, podendo sobreviver na presença de oxigênio. Assim, conforme foi constatada a ausência de geração de hidrogênio, concluiu-se que não havia a presença de nenhuma bactéria geradora deste biogás.

Análises microscópicas de coloração de Gram foram realizadas no inóculo (I) antes de passar por processos de purificação (Figura 5.3). O inóculo (I) continha leveduras nas primeiras amostragens. Tal ocorrência pode ser justificada devido à presença de resíduos, provenientes do processo de fabricação de álcool, aliado ao pH ácido, que puderam favorecer seu desenvolvimento nos primeiros testes em meio de cultivo. Após o processo de diluições seriais, as mesmas foram eliminadas, viabilizando assim o crescimento de consórcios de bactérias anaeróbias (Figura 5.4).

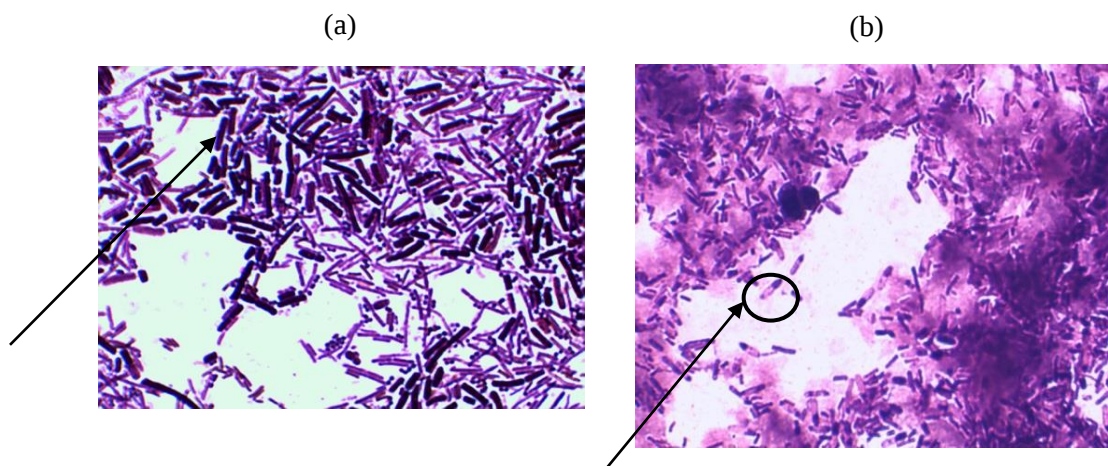
Após os processos de purificação, como as condições impostas do tratamento a quente e pH 5,5, não foram detectadas gerações de metano no *headspace* dos reatores, tendo causado assim, a inibição de arqueias metanogênicas que são consumidoras de H₂. Bacilos Gram-Positivos e bacilos com endósporos (Figura 5.4) foram observados, correspondendo assim às morfologias predominantes de bactérias envolvidas na geração de H₂ presentes nos consórcios bacterianos (MAINTINGUER et al, 2011).

Figura 5.3 - Microscopia do inóculo (I) reativado após o pré-tratamento: (a) leveduras (b) bacilos Gram-positivos; (c) bacilos Gram-negativos. Ampliação de 1000X.



Fonte: Elaborada pela autora

Figura 5.4 - Análises microscópicas após a purificação celular: (a) inóculo (I) predomínio de bacilos Gram-positivos; (b) inóculo (II) bacilos com endósporos. Ampliação de 1000X.



Fonte: Elaborada pela autora

Observa-se que houve o desaparecimento das leveduras (Figura 5.4a), evidenciando que os processos de purificação foram eficientes. Portanto, foi possível obter um consórcio bacteriano gerador de H_2 , já que as morfologias predominantes são condizentes às encontradas para este tipo de consórcio assim como foram detectadas as gerações de H_2 no *headspace* dos reatores de purificação (Tabela 5.2).

Os inóculos (I) e (II) que geraram hidrogênio após as purificações realizadas, tiveram suas biomassas enriquecidas e reativadas para que pudessem assim ser usados nas montagens dos reatores anaeróbios em batelada para os ensaios de geração de hidrogênio.

5.3 Ensaios de geração de hidrogênio para os inóculos (I) e (II)

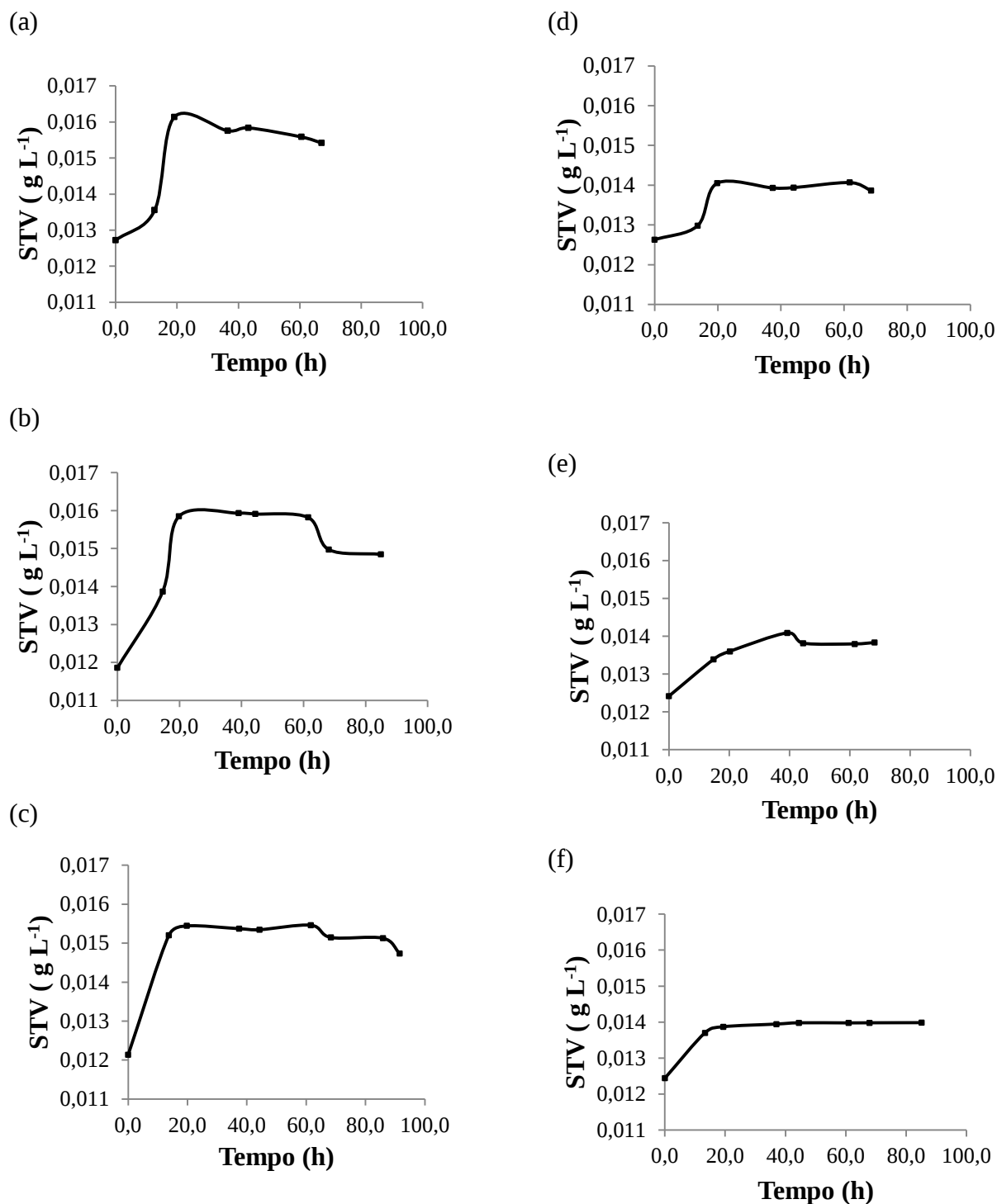
Um ensaio preliminar foi conduzido com a montagem de reatores anaeróbios em batelada contendo glicerol bruto sem pré-tratamento na condição previamente citada (4.4). A geração máxima de H_2 atingida foi de $0,7 \text{ mmol } H_2 \text{ L}^{-1}$, valor consideravelmente baixo, com um declínio do crescimento bacteriano em cerca de 30 horas de experimento. Com base nesses dados, usou-se o pré-tratamento do glicerol bruto nos ensaios subsequentes, a fim de se reduzir a carga de impurezas presentes consideradas inibitórias às atividades metabólicas com consequente aumento da geração de H_2 .

5.3.1 Análises de crescimento celular

Foi observada a elevação nos valores dos Sólidos Totais Voláteis (STV) em todos os ensaios (Figura 5.5 a,b,c,d,e,f), que corresponderam basicamente à biomassa microbiana presente nos reatores. O crescimento celular foi estabilizado em torno de 20 horas de experimento para ambos os inóculos estudados (Figura 5.5 a,b,c,d,e,f). Nesse período foi verificada a fase exponencial do crescimento com subsequente consumo de nutrientes.

Figura 5.5 - Variação temporal do crescimento bacteriano nos ensaios de produção de H₂

(a) Ensaio (I)-a (50% glicerol bruto + 50% glicerina), (b) Ensaio (I)-b (80% glicerol bruto + 20% glicerina), (c) Ensaio (I)-c (100% glicerol bruto), (d) Ensaio (II)-a (50% glicerol bruto + 50% glicerina), (e) Ensaio (II)-b (80% glicerol bruto + 20% glicerina), (f) Ensaio (II)-c (100% glicerol bruto).



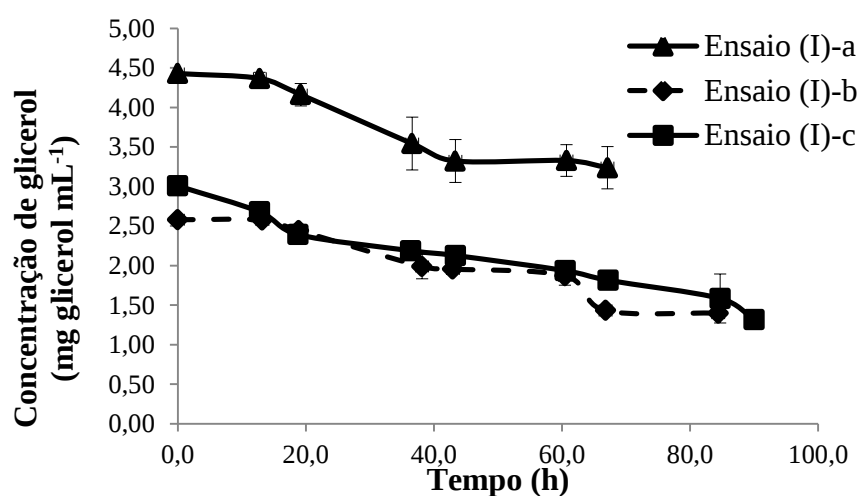
Fonte: Elaborada pela autora

5.3.2 Consumo do glicerol nos ensaios de produção do H₂

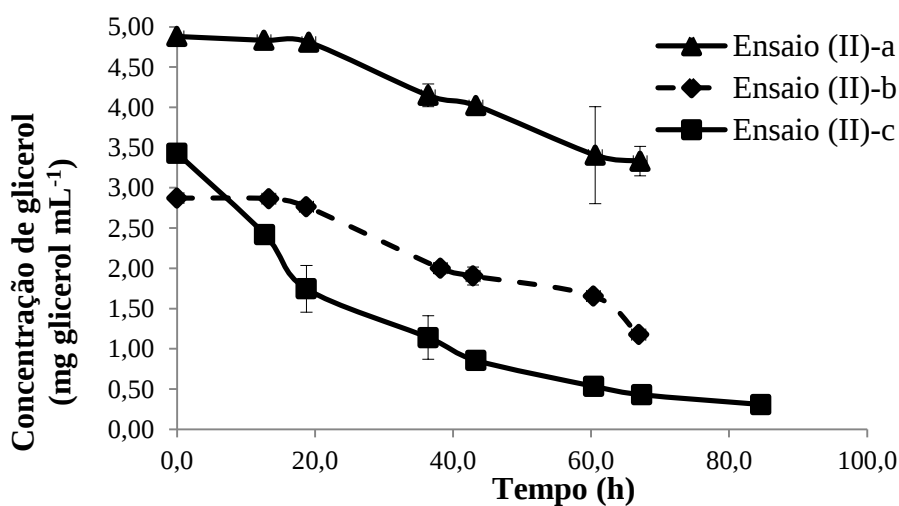
Ambos os inóculos (I e II) conseguiram se adaptar ao glicerol bruto já que houve indicativo do seu consumo ao longo dos experimentos (Figura 5.6).

Figura 5.6 - Concentração de glicerol ao longo do tempo de operação dos reatores anaeróbios (a) Ensaio (I)-a, Ensaio (I)-b e Ensaio (I)-c; (b) Ensaio (II)-a, Ensaio (II)-b e Ensaio (II)-c.

(a)



(b)



Fonte: Elaborada pela autora

Ensaio (I)-a (50% glicerol bruto + 50% glicerina), Ensaio (I)-b (80% glicerol bruto + 20% glicerina), Ensaio (I)-c (100% glicerol bruto), Ensaio (II)-a (50% glicerol bruto + 50% glicerina), Ensaio (II)-b (80% glicerol bruto + 20% glicerina), Ensaio (II)-c (100% glicerol bruto).

A Tabela 5.3 indica as concentrações iniciais e finais de glicerol livre nos ensaios (I) e (II), bem como as suas porcentagens de consumo pelos consórcios bacterianos.

Tabela 5.3 - Concentrações de glicerol livre durante operação dos reatores anaeróbios para os inóculos (I) e (II).

Ensaio	Início da operação (mg glicerol mL ⁻¹)	Final da operação	Glicerol consumido (%)
Ensaio (I)-a	4,4±0,00	3,2±0,27	26,9
Ensaio (I)-b	2,6±0,00	1,4±0,05	45,8
Ensaio (I)-c	3,0±0,00	1,3±0,01	56,2
Ensaio (II)-a	4,9±0,00	3,3±0,18	31,7
Ensaio (II)-b	2,9±0,00	1,2±0,00	59,0
Ensaio (II)-c	3,4±0,00	0,3±0,03	91,0

Ensaio (I)-a (50% glicerol bruto + 50% glicerina), Ensaio (I)-b (80% glicerol bruto + 20% glicerina), Ensaio (I)-c (100% glicerol bruto), Ensaio (II)-a (50% glicerol bruto + 50% glicerina), Ensaio (II)-b (80% glicerol bruto + 20% glicerina), Ensaio (II)-c (100% glicerol bruto).

Os ensaios (I)-c e (II)-c, que correspondiam a 100% de glicerol bruto pré-tratado, apresentaram os consumos mais elevados (56,2% e 91,0% respectivamente) quando comparados aos demais. Porém, para estes mesmos ensaios, foram reportadas gerações de H₂ mais reduzidas. Isto demonstra que o consórcio bacteriano estava adaptado, consumindo grande parte do glicerol bruto pré-tratado presente no meio, porém, a presença de impurezas advindas desse resíduo pode ter causado a inibição na rota metabólica de geração de H₂.

Ito e colaboradores (2005) observaram em seus ensaios de geração de H₂, que houve o consumo total de glicerol bruto (1,7 g L⁻¹) oriundo de plantas de produção de biodiesel, em 4 horas de experimento com reatores operados em batelada, diluídos em meio complexo (5 g L⁻¹ de extrato de levedura e 5 g L⁻¹ de triptona) com cultura pura de *E. aerogenes* em pH 6,8 e tampão fosfato. Fato este esperado por se tratar de cultura pura e glicerol bruto contendo menor quantidade de impurezas, onde o glicerol bruto foi esterilizado (18 minutos e 121°C) antes de ser inserido nos reatores. Segundo Sarma e colaboradores (2012), o simples fato de esterilizar o glicerol bruto em autoclave ajuda a eliminar grande quantidade de metanol presente (25% encontrado no trabalho de Ito et al., 2005), reduzindo grandemente o efeito inibitório ao crescimento microbiano e promovendo seu consumo elevado em um tempo curto de experimento.

Sarma e colaboradores (2013b), testaram glicerol bruto (10 g L⁻¹) proveniente de processos de transesterificação de resíduos de processamento de carne e óleos de restaurantes com 0,37% de teor de sabão, em reatores operados em batelada, pH 6,0, com cultura pura de

E. aerogenes, sob condições estéreis, com alterações nos meios de cultivo, como a adição de resíduos de tratamento de água, resíduos líquidos de cervejaria, águas residuais de indústrias de amido, bagaço de maçã e resíduos líquidos de matadouro. Os consumos de glicerol bruto variaram de 60% a 93%, valores próximos aos obtidos no presente estudo (Tabela 5.3). É importante salientar que o presente trabalho envolveu consórcios bacterianos nos ensaios, ao contrário do que foi trabalhado nos experimentos de Sarma e colaboradores com cultura pura.

5.3.3 Demanda Química de Oxigênio

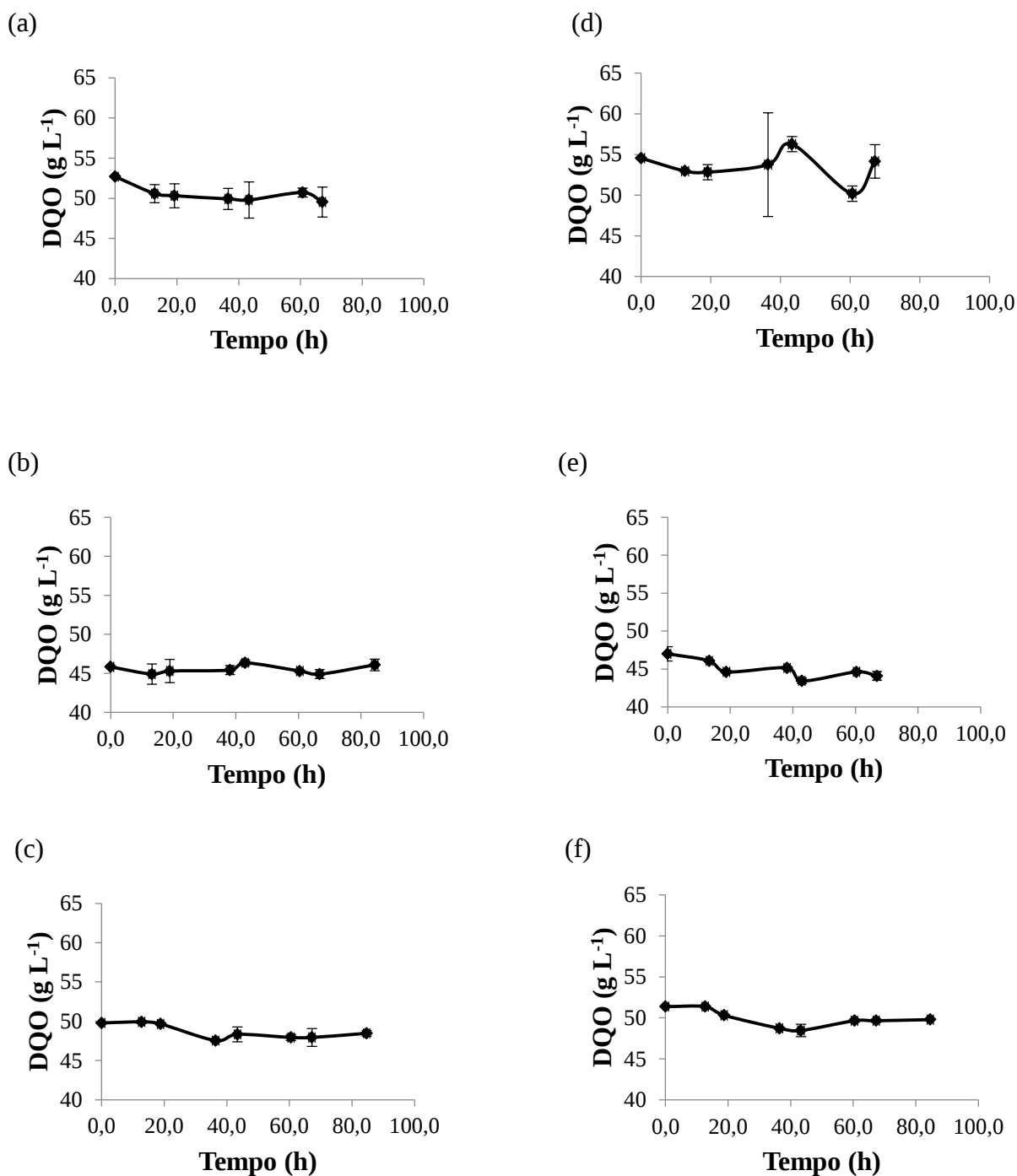
Os valores de DQO durante o início e final da operação não alteraram significativamente (Tabela 5.4); fato este que pode ser explicado pela rota metabólica do glicerol conhecida para os microrganismos fermentativos produtores de H_2 . Durante essa rota metabólica, alguns intermediários como etanol, butanol, acetato, butirato são produzidos como metabólitos do metabolismo oxidativo do glicerol (SARMA et. al, 2013a). Isto sugere que houve uma transformação do substrato inicial a outros compostos orgânicos voláteis causando a manutenção da DQO ao longo dos ensaios (Figura 5.7). Além disso, como não houve geração de metano, certamente, a ausência de microrganismos consumidores desses metabólitos como arqueias metanogênicas foi a principal causa da manutenção da DQO no meio líquido.

Tabela 5.4 - Valores de DQO dos ensaios de produção de H_2 para os inóculos (I) e (II) ao longo dos ensaios

Ensaio	Início da operação ($g\ L^{-1}$)	Final da operação ($g\ L^{-1}$)
Ensaio (I)-a	$52,70 \pm 0,00$	$49,52 \pm 1,87$
Ensaio (I)-b	$45,82 \pm 0,00$	$46,08 \pm 0,75$
Ensaio (I)-c	$49,79 \pm 0,00$	$47,93 \pm 1,12$
Ensaio (II)-a	$54,55 \pm 0,00$	$54,15 \pm 2,06$
Ensaio (II)-b	$47,01 \pm 0,93$	$44,10 \pm 0,56$
Ensaio (II)-c	$51,37 \pm 0,00$	$49,79 \pm 0,00$

Figura 5.7 - Variação temporal da DQO nos ensaios de produção de H_2

(a) Ensaio (I)-a, (b) Ensaio (I)-b, (c) Ensaio (I)-c, (d) Ensaio (II)-a, (e) Ensaio (II)-b e (f) Ensaio (II)-c

**Fonte:** Elaborada pela autora

Ensaio (I)-a (50% glicerol bruto + 50% glicerina), Ensaio (I)-b (80% glicerol bruto + 20% glicerina), Ensaio (I)-c (100% glicerol bruto), Ensaio (II)-a (50% glicerol bruto + 50% glicerina), Ensaio (II)-b (80% glicerol bruto + 20% glicerina), Ensaio (II)-c (100% glicerol bruto).

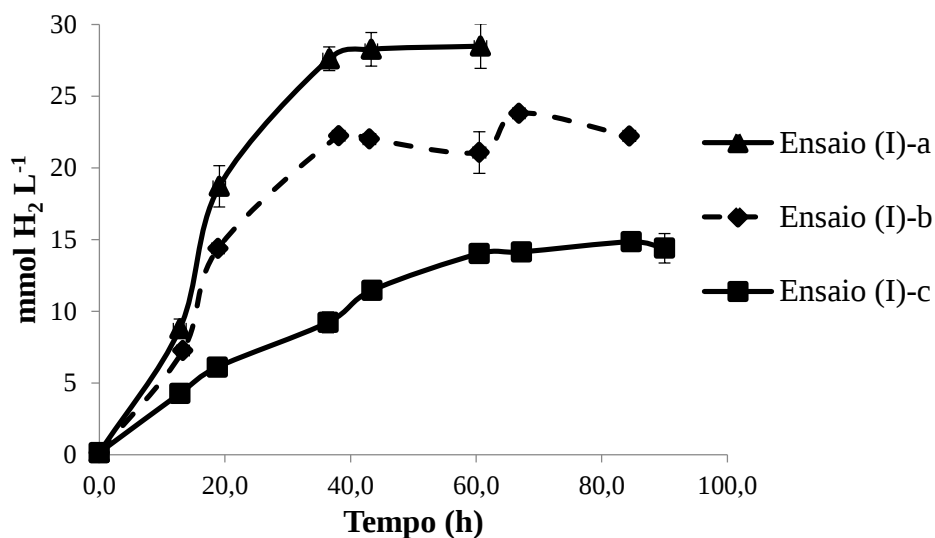
5.3.4 Produção de hidrogênio

Para ambos os inóculos (I e II), a fermentação se iniciou rapidamente, como pode ser visto pela redução da fase *lag* nos seis ensaios (Figura 5.8). Esse fato pode ser explicado por processos de reativação celular que foram realizados com os inóculos, previamente à operação dos reatores anaeróbios em batelada. Segundo Selembo e colaboradores (2009), o processo de reativação celular prévia à realização dos ensaios, com culturas mistas, contendo glicerina e glicerol bruto oriundo de plantas de produção de biodiesel a partir de óleo de soja, fez com que o tempo da fase *lag* reduzisse de 7-18 horas para 2-5 horas em seus experimentos, além da elevação nas gerações H_2 (53-57% para ensaios com glicerina e 59-61% para glicerol bruto), fato este justificado pela aclimação das bactérias ao substrato previamente à montagem dos ensaios.

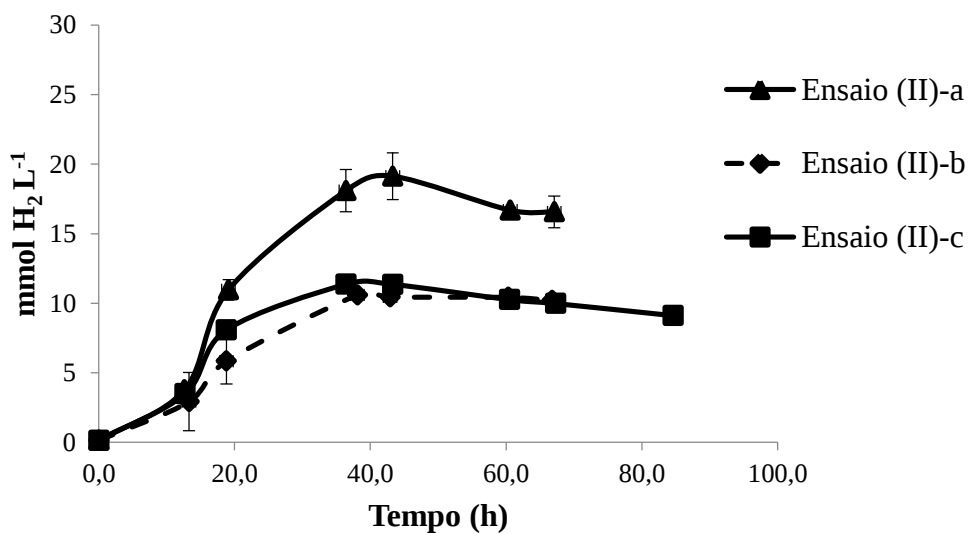
Figura 5.8 - Produção de H_2 ($mmol H_2 L^{-1}$) em função do tempo dos ensaios (h)

(a) Ensaios com inoculo (I) e (b) Ensaios com inóculo (II)

(a)



(b)



Fonte: Elaborada pela autora

Ensaio (I)-a (50% glicerol bruto + 50% glicerina), Ensaio (I)-b (80% glicerol bruto + 20% glicerina), Ensaio (I)-c (100% glicerol bruto), Ensaio (II)-a (50% glicerol bruto + 50% glicerina), Ensaio (II)-b (80% glicerol bruto + 20% glicerina), Ensaio (II)-c (100% glicerol bruto).

A Tabela 5.5 fornece dados experimentais dos reatores anaeróbios como o tempo de operação e a produção máxima de H_2 obtida durante cada ensaio.

Tabela 5.5 - Dados experimentais do tempo de operação dos ensaios e produção máxima de H₂

Ensaio	Tempo de operação (horas)	Produção máxima de H ₂ (mmol H ₂ L ⁻¹)
Ensaio (I)-a	60,00	28,481 ± 1,55
Ensaio (I)-b	84,00	23,800 ± 0,05
Ensaio (I)-c	90,00	14,842 ± 0,36
Ensaio (II)-a	67,00	19,135 ± 1,67
Ensaio (II)-b	67,00	10,448 ± 0,34
Ensaio (II)-c	84,00	11,363 ± 0,03

Ensaio (I)-a (50% glicerol bruto + 50% glicerina), Ensaio (I)-b (80% glicerol bruto + 20% glicerina), Ensaio (I)-c (100% glicerol bruto), Ensaio (II)-a (50% glicerol bruto + 50% glicerina), Ensaio (II)-b (80% glicerol bruto + 20% glicerina), Ensaio (II)-c (100% glicerol bruto).

Para os ensaios contendo o inóculo (I), houve uma diferença nítida da produção máxima de gás hidrogênio para as três condições impostas (a, b e c). Nos ensaios (I)-a, (I)-b e (I)-c foram observadas gerações de hidrogênio (mmol H₂ L⁻¹) de 28,5; 23,8; 14,9 durante 60, 84 e 90 horas de operação respectivamente. Observa-se que com o aumento nas proporções de glicerol bruto pré-tratado nos ensaios, a produção máxima diminuiu, tendo em vista que houve um aumento das impurezas presentes nesse glicerol bruto, que provavelmente interferiram na rota metabólica de geração de H₂ (Figura 5.8a). O mesmo comportamento foi observado para os ensaios realizados na presença do inóculo (II). Nos ensaios (II)-a, (II)-b e (II)-c foram observadas gerações de hidrogênio (mmol H₂ L⁻¹) de 19,2; 10,5; 11,4 durante 67, 67 e 84 horas de operação respectivamente, onde a produção máxima de H₂ foi atingida com o ensaio contendo a menor quantidade, em porcentagem, de glicerol bruto pré-tratado (Figura 5.8b).

No trabalho de Sarma e colaboradores (2013b) foram utilizadas cepas de *Enterobacter aerogenes* NRRL B 407 como inóculo para a montagem dos ensaios de geração de H₂ em batelada, com 10 g L⁻¹ de glicerol bruto a pH 6,0, onde a produção máxima atingida foi próxima a 83 mmol de H₂ L⁻¹. Valor este consideravelmente maior do que os resultados obtidos neste trabalho, tendo em vista que o autor trabalhou com concentrações maiores de glicerol bruto (10 g L⁻¹) enquanto que as concentrações de glicerol bruto utilizadas neste estudo variaram de 4,4 a 2,5 g L⁻¹. Outro fator que justifica o aumento da produção de H₂ no trabalho de Sarma et al. é a utilização de culturas puras na montagem dos ensaios, o que garante dizer que somente essas culturas estavam presentes nos reatores e que foram as responsáveis por consumirem o glicerol bruto e metabolizarem em grandes percentuais de H₂, já que o metabolismo do glicerol para culturas de *Enterobacter* é conhecido (SARMA et. al, 2012). Com a utilização de consórcios bacterianos havia outras culturas de bactérias que

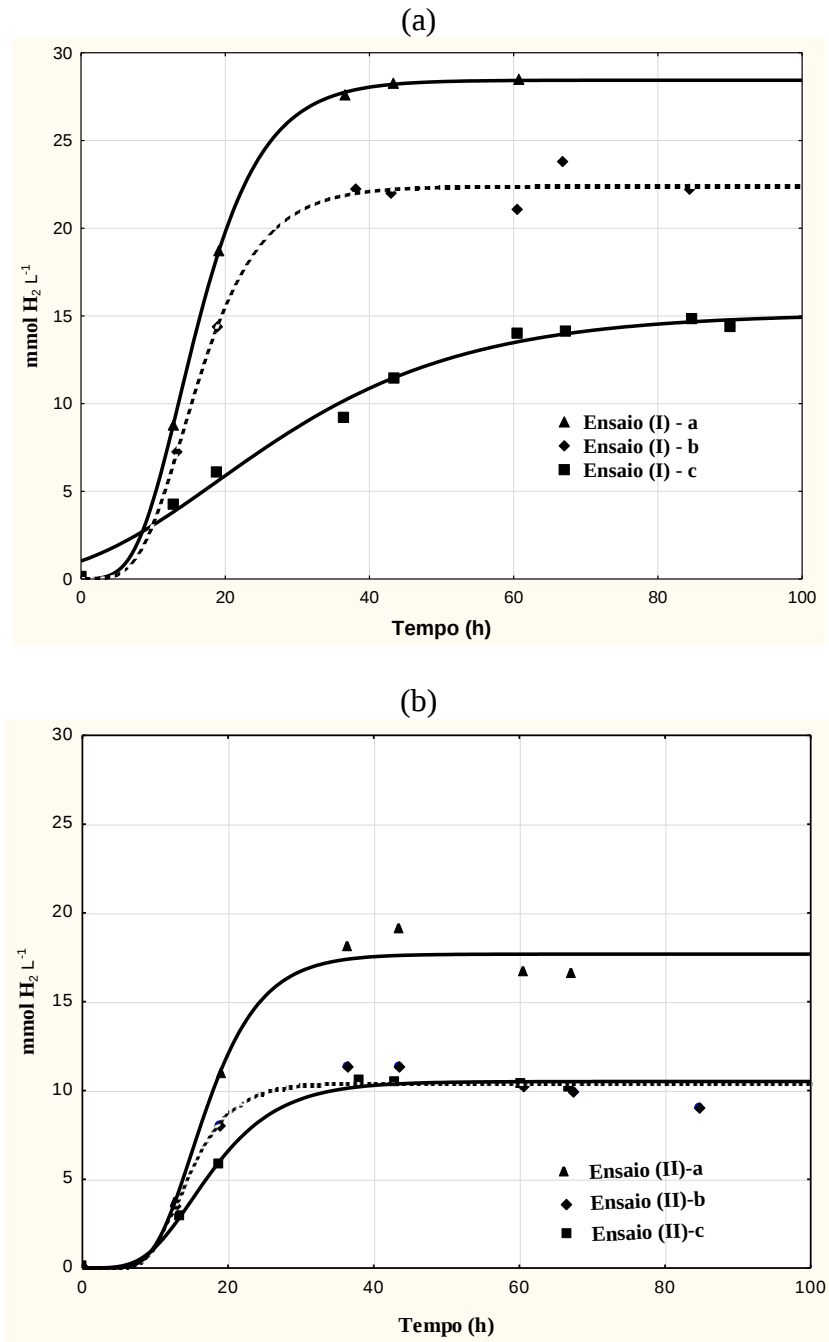
provavelmente alteraram a rota metabólica para a geração de outros subprodutos, o que acaba por influenciar geração mais reduzida deste biogás.

O estudo desenvolvido por Chookaew e colaboradores (2015) foi baseado na produção de H_2 a partir de $11,14 \text{ g L}^{-1}$ de glicerol bruto oriundo de produções de biodiesel, utilizando cultura pura *Klebsiella* sp. TR17 em reatores em batelada mantidos a 40°C e pH inicial de 8,0. A produção máxima atingida neste trabalho, para a fermentação desta cultura pura, foi de $64,24 \text{ mmol H}_2 \text{ L}^{-1}$. Novamente, vale ressaltar que esses valores superiores atingidos para a produção de H_2 devem-se à concentração elevada de glicerol bruto utilizado, aliado ao uso de cultura pura para a realização do experimento.

5.3.5 Cinética da produção de hidrogênio

Os valores das produções de hidrogênio para os ensaios e inóculos estudados foram ajustados de acordo com a equação de Gompertz que foi modificada no trabalho de Zwietering e colaboradores em 1990 (ZWIETERING et al., 1990). A reescrita deste modelo matemático contém parâmetros que são relevantes microbiologicamente possuindo significados biológicos, como, por exemplo, a inserção da velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$), duração da fase lag (λ) e o aumento logarítmico da população microbiana (A). Assim, no trabalho de Lay et al, (1998a), esses parâmetros foram novamente modificados para a produção de metano, onde no presente trabalho, esses parâmetros são nomeados a Potencial de Produção de H_2 (P), taxa máxima de produção de H_2 (R_m) e Tempo de Fase Lag (λ). A Figura 5.9 mostra os resultados obtidos para a produção de H_2 na função Gompertz modificada e os valores estão listados na Tabela 5.6.

Figura 5.1 - Comportamento da geração de H_2 através da função Gompertz modificada nos ensaios: (a) Ensaios com inoculo (I) e (b) Ensaios com inóculo (II)



Fonte: Elaborada pela autora

Ensaio (I)-a (50% glicerol bruto + 50% glicerina), Ensaio (I)-b (80% glicerol bruto + 20% glicerina), Ensaio (I)-c (100% glicerol bruto), Ensaio (II)-a (50% glicerol bruto + 50% glicerina), Ensaio (II)-b (80% glicerol bruto + 20% glicerina), Ensaio (II)-c (100% glicerol bruto).

Tabela 5.6 - Potencial de Produção de H₂ (P), Taxa Máxima de Produção de H₂ (R_m), Fase Lag (λ), limites inferior e superior e R² obtidos pela equação de Gompertz modificada

Ensaio	Parâmetros	Valor estimado	Limite inferior	Limite superior	R ²
Ensaio (I)-a (50% glicerol bruto+50% glicerina)	P (mmol)	28,434	28,167	28,701	1,000
	R _m (mmol h ⁻¹)	1,702	1,595	1,809	
	λ (h)	7,634	7,129	8,139	
Ensaio (I)-b (80% glicerol bruto+20% glicerina)	P (mmol)	22,377	21,301	23,452	0,996
	R _m (mmol h ⁻¹)	1,382	0,738	2,027	
	λ (h)	8,065	4,406	11,723	
Ensaio (I)-c (100% glicerol bruto)	P (mmol)	15,137	13,747	16,527	0,994
	R _m (mmol h ⁻¹)	0,292	0,215	0,368	
	λ (h)	-0,197	-6,527	6,133	
Ensaio (II)-a (50% glicerol bruto+50% glicerina)	P (mmol)	17,680	16,022	19,337	0,992
	R _m (mmol h ⁻¹)	1,251	0,436	2,067	
	λ (h)	9,821	5,570	14,073	
Ensaio (II)-b (80% glicerol bruto+20% glicerina)	P (mmol)	10,507	10,071	10,943	0,998
	R _m (mmol h ⁻¹)	0,598	0,396	0,801	
	λ (h)	8,617	5,989	11,246	
Ensaio (II)-c (100% glicerol bruto)	P (mmol)	10,408	9,395	11,422	0,983
	R _m (mmol h ⁻¹)	0,946	0,140	1,753	
	λ (h)	9,049	4,348	13,751	

Os valores encontrados para o coeficiente de correlação, R², durante o modelamento estatístico (Tabela 5.6) são todos superiores a 0,98. Isto sugere que a equação de Gompertz modificada foi capaz de descrever a evolução da produção de hidrogênio satisfatoriamente, além do que valores de R² superiores a 0,9 indicam exatidão e precisão nas medições ao longo dos ensaios (VARRONE et al., 2013; SIVAGURUNATHAN et al., 2016).

Para os Ensaios (I)-a, b e c, o potencial máximo da produção de gás hidrogênio foi, respectivamente, 28,434 mmol L⁻¹, 22,377 mmol L⁻¹ e 15,137 mmol L⁻¹, que são valores consistentes com os obtidos experimentalmente, 28,481 mmol L⁻¹, 23,800 mmol L⁻¹ e 14,842 mmol L⁻¹ (Tabela 5.5). Os potenciais máximos de produção de H₂ foram diminuindo com o

aumento da quantidade de glicerol bruto adicionado ao meio de cultivo. Este fato pode ser justificado da seguinte forma: proporção de glicerol bruto aumentando, aumenta assim a quantidade de impurezas presentes no meio, em sua maioria, composta de concentrações crescentes de metanol. A presença deste álcool no meio de cultivo é prejudicial ao consórcio, interferindo assim na rota metabólica de geração de hidrogênio.

O mesmo fato foi observado para os Ensaio (II)-a, b e c, onde o potencial máximo da produção de H_2 foi, respectivamente para cada ensaio, 17,680 mmol L^{-1} , 10,507 mmol L^{-1} e 10,408 mmol L^{-1} , o que corresponde aos valores obtidos experimentalmente, que são 19,135 mmol L^{-1} , 10,448 mmol L^{-1} e 11,363 mmol L^{-1} (Tabela 5.5).

Chookaew e colaboradores (2012) trabalharam com processos fermentativos envolvendo a espécie isolada *Klebsiella pneumoniae* TR17 para a geração de hidrogênio consumindo o glicerol bruto oriundo de uma planta de produção de biodiesel. O ensaio realizado em batelada sob a condição de 40°C, pH inicial 8,0, 20 g L^{-1} glicerol bruto e 2 g L^{-1} de extrato de levedura gerou uma produção de hidrogênio de 27,7 mmol $H_2 L^{-1}$. Já no trabalho de Pachapur et al. (2015b), a utilização de *Enterobacter aerogenes* e *Clostridium butyricum* para a produção de biohidrogênio envolvendo 15 g L^{-1} de glicerol bruto da produção de biodiesel e 5 g L^{-1} de lodo de polpa de maçã, gerou uma produção máxima de H_2 de 26,07 mmol L^{-1} . Os valores de produção máxima de H_2 de ambos os trabalhos são inferiores ao do Ensaio (I)-a do presente estudo, 28,434 mmol L^{-1} , sendo que foi utilizada uma menor concentração de glicerol (4,4 g L^{-1}) envolvendo consórcio de bactérias fermentativas, demonstrando que sob estas condições mais robustas foi possível gerar mais hidrogênio, ao contrário do que foi observado nos trabalhos anteriores mencionados.

As maiores produções de hidrogênio reportadas para o inóculo (I) podem ser explicadas com base na origem deste inóculo, sendo que ele foi proveniente de um reator UASB termofílico tratando resíduo industrial, vinhaça. Independentemente de sua origem, os principais componentes orgânicos presentes na vinhaça da cana-de-açúcar são relatados na literatura como sendo ácidos orgânicos (sobretudo de lactato e acetato), bem como álcoois (principalmente glicerol e etanol) e uma quantidade menor de carboidratos (MORAES et al., 2015; ESPÃNA-GAMBOA et al., 2012). Logo, pelo fato do inóculo (I) já estar acondicionado a um ambiente contendo glicerol, em decorrência do resíduo da vinhaça, este poderia ter sido o motivo pelo qual os microrganismos já estariam aclimatados ao glicerol, facilitando assim na sua geração de hidrogênio, sendo, portanto, superior à geração de hidrogênio envolvendo o inóculo (II).

5.3.6 Compostos orgânicos do meio líquido

O metabolismo do glicerol e a produção de H_2 podem ser direcionados por duas rotas, a oxidativa e a redutiva; ambas elucidadas para espécies de *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Clostridium*. Na rota oxidativa, o NAD^+ é reduzido a NADH produzindo o piruvato. O piruvato, dependendo do microrganismo, será quebrado em vários produtos (etanol, lactato, acetato, butirato e outros) ao longo da produção de hidrogênio. Etanol é o bioproduto comumente produzido pelas espécies de *Enterobacter* e *Clostridium* durante a geração de H_2 , consumindo o glicerol bruto (PACHAPUR et al., 2015a; MAINTINGUER; HATANAKA; OLIVEIRA, 2015).

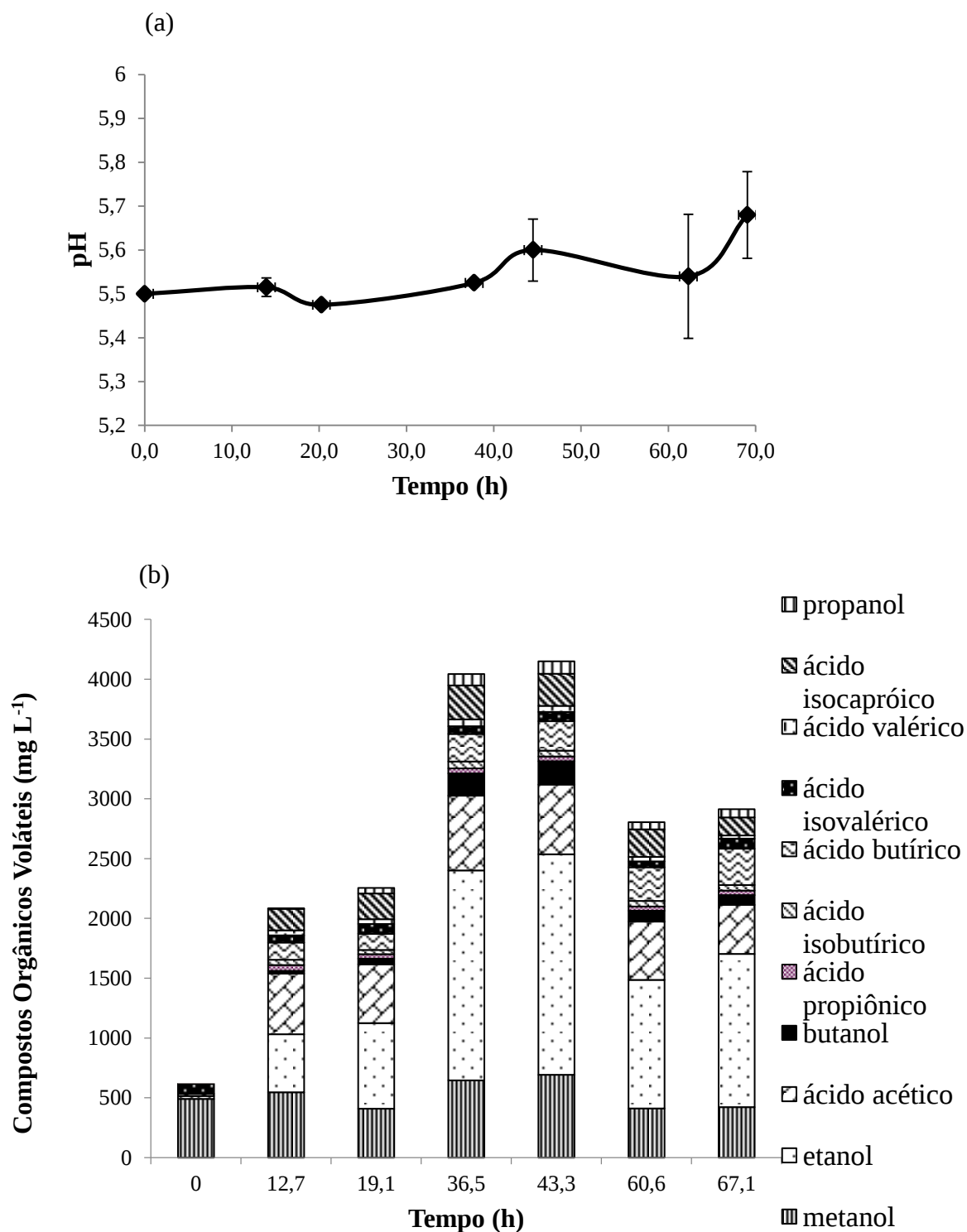
Para todos os ensaios realizados envolvendo os consórcios bacterianos (I) e (II), os valores de pH não variaram significativamente para alguns ensaios, como por exemplo para o Ensaio (II)-c, e para outros ensaios, houve uma variação, porém pouco significativa (Tabela 5.7), o que implica em gerações de compostos orgânicos em sua maioria, álcoois, pois se a geração fosse preferencialmente de ácidos, os valores de pH teriam reduzidos ao longo do ensaio (Figura 5.10, 5.11, 5.12, 5.13, 5.14 e 5.15).

Tabela 5.7 - Variação do pH durante os ensaios realizados para os inóculos I e II

Ensaio	Início da operação	Durante a operação	Final da operação
Ensaio (I)-a	5,52 ± 0,00	5,53 ± 0,05	5,68 ± 0,10
Ensaio (I)-b	5,51 ± 0,00	5,57 ± 0,08	5,70 ± 0,01
Ensaio (I)-c	5,51 ± 0,00	5,43 ± 0,09	5,61 ± 0,06
Ensaio (II)-a	5,52 ± 0,00	5,65 ± 0,15	5,92 ± 0,04
Ensaio (II)-b	5,51 ± 0,00	5,66 ± 0,11	5,81 ± 0,01
Ensaio (II)-c	5,51 ± 0,00	5,53 ± 0,13	5,50 ± 0,03

Ensaio (I)-a (50% glicerol bruto + 50% glicerina), Ensaio (I)-b (80% glicerol bruto + 20% glicerina), Ensaio (I)-c (100% glicerol bruto), Ensaio (II)-a (50% glicerol bruto + 50% glicerina), Ensaio (II)-b (80% glicerol bruto + 20% glicerina), Ensaio (II)-c (100% glicerol bruto).

Figura 5.10 - (a) Variação temporal de pH e (b) Produção acumulada de compostos orgânicos no meio líquido para o Ensaio (I)-a (50% glicerol bruto+50% glicerina)



Fonte: Elaborada pela autora

Figura 5.11 - (a) Variação temporal de pH e (b) Produção acumulada de compostos orgânicos no meio líquido para o Ensaio (I)-b (80% glicerol bruto+20% glicerina)

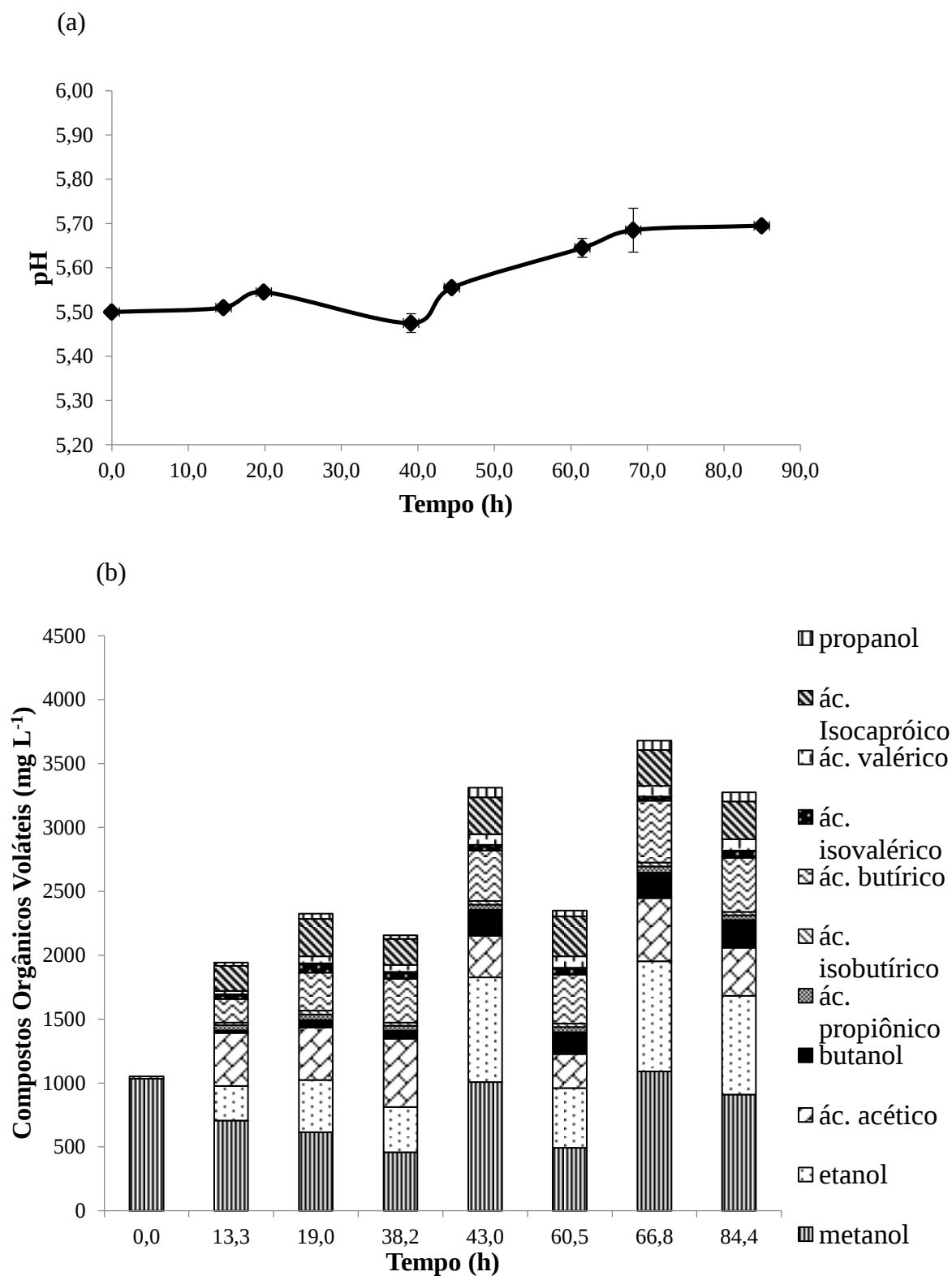


Figura 5.12 - (a) Variação temporal de pH e (b) Produção acumulada de compostos orgânicos no meio líquido para o Ensaio (I)-c (100% glicerol bruto)

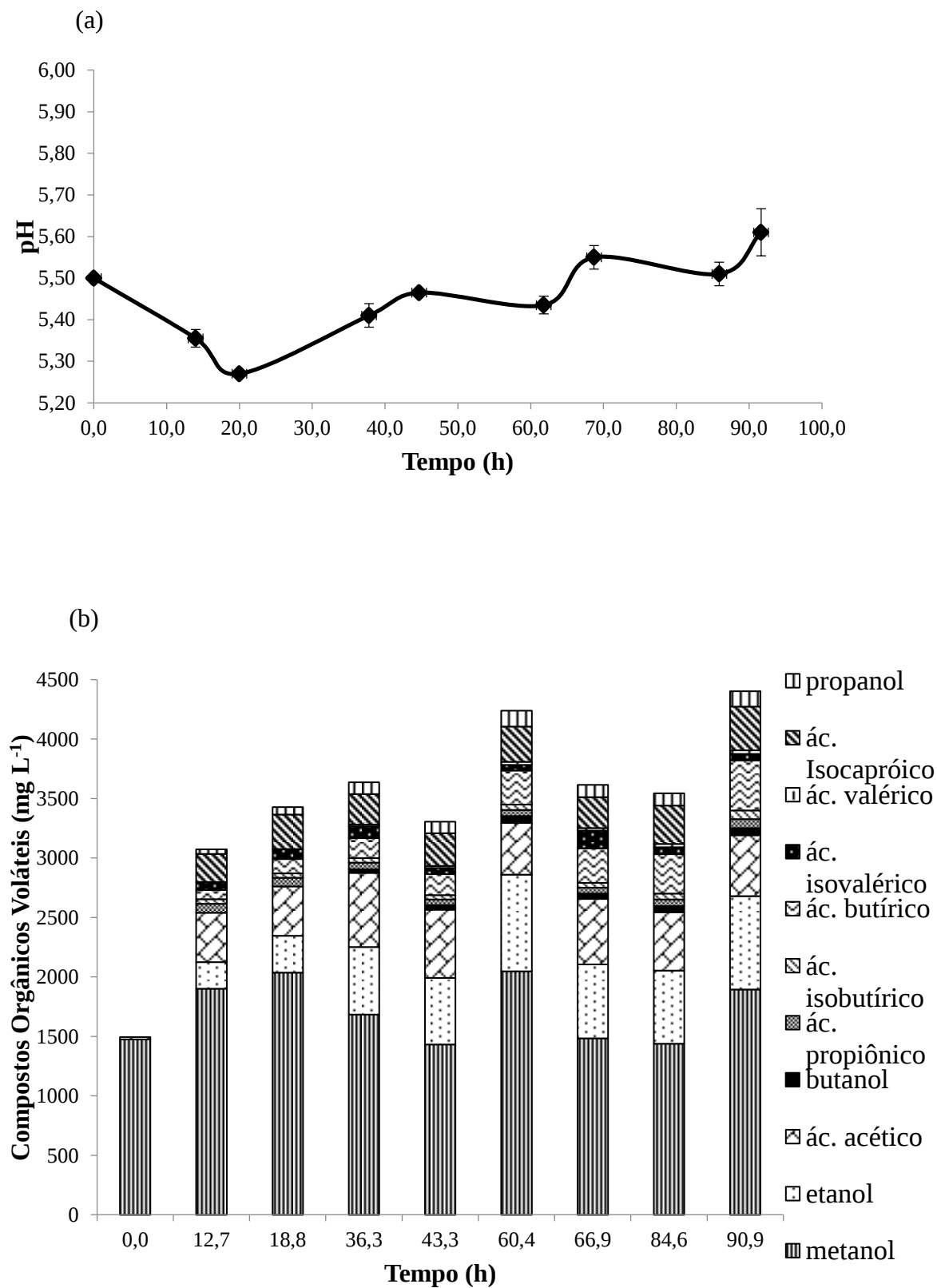


Figura 5.13 - (a) Variação temporal de pH e (b) Produção acumulada de compostos orgânicos no meio líquido para o Ensaio (II)-a (50% glicerol bruto+50% glicerina).

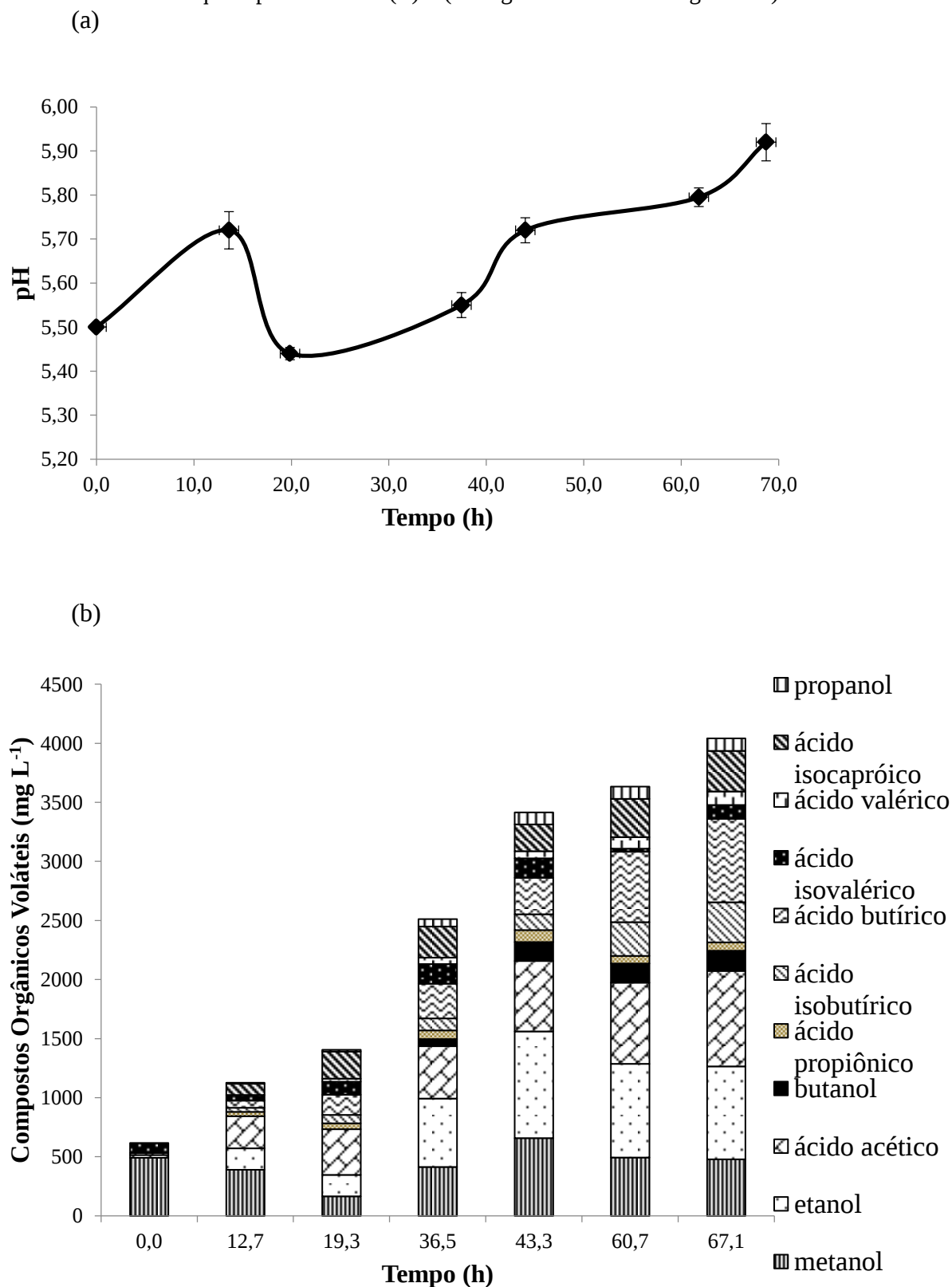
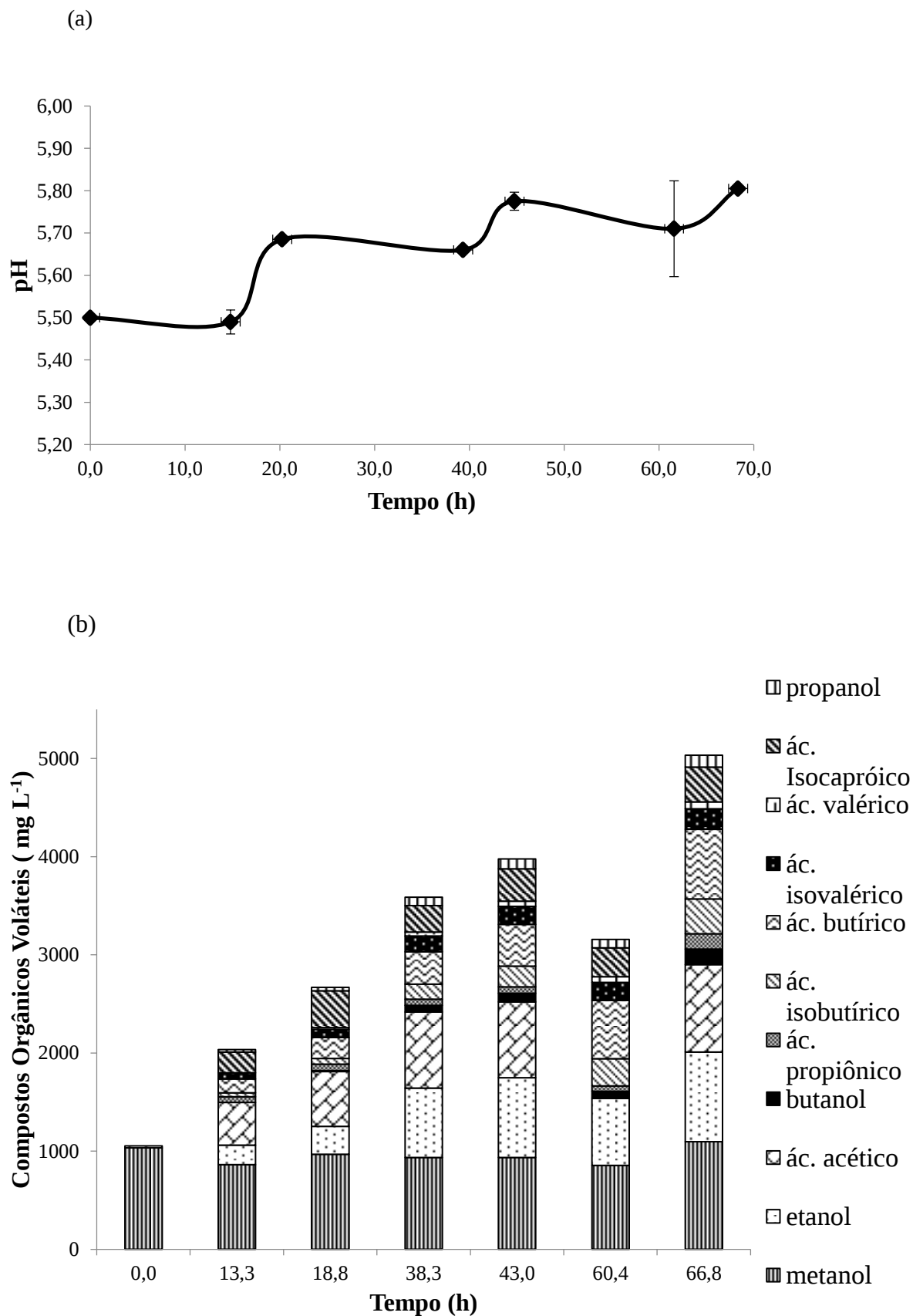
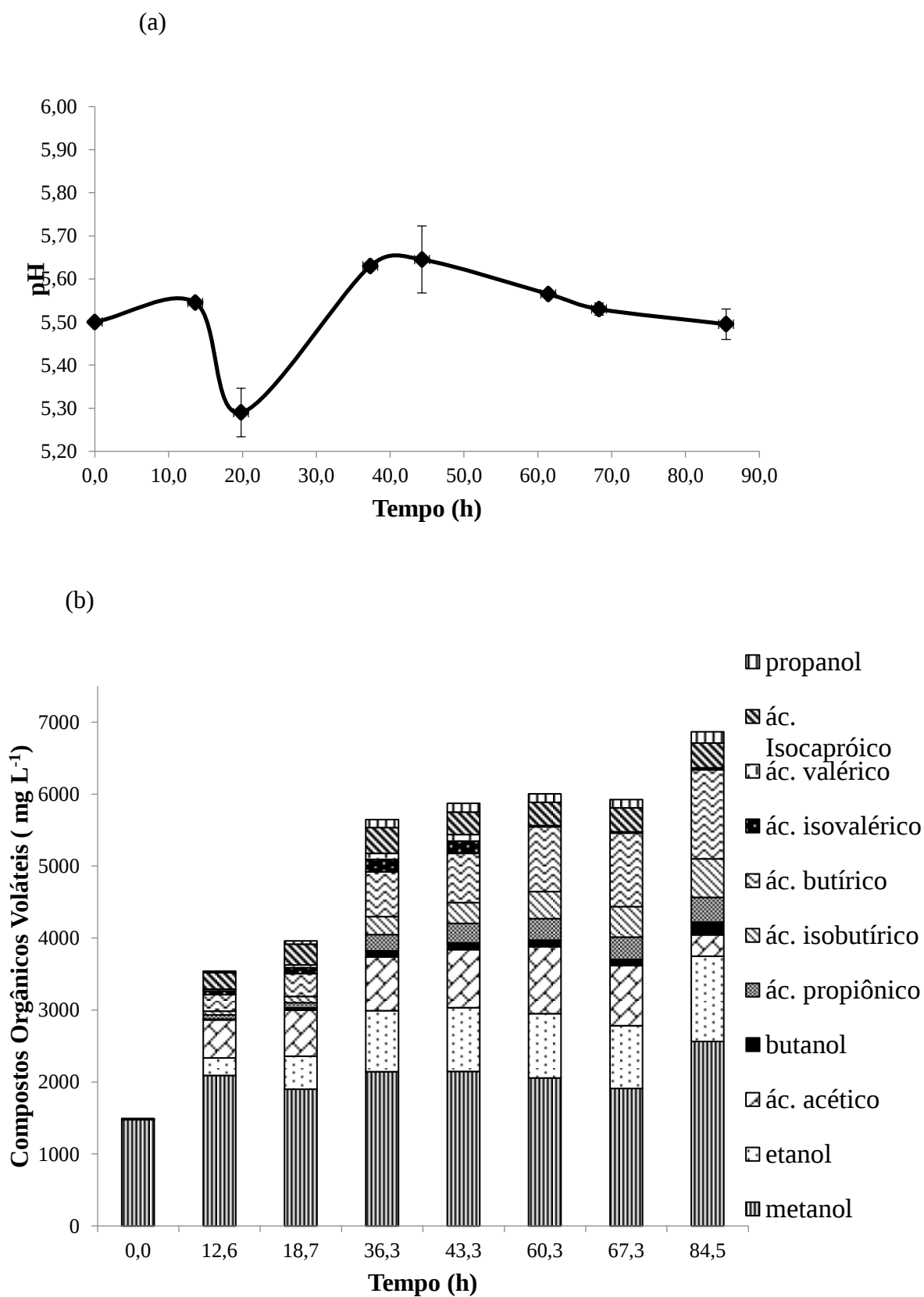


Figura 5.14 - (a) Variação temporal de pH e (b) Produção acumulada de compostos orgânicos no meio líquido para o Ensaio (II)-b (80% glicerol bruto+20% glicerina)



Fonte: Elaborada pela autora

Figura 5.15 - (a) Variação temporal de pH e (b) Produção acumulada de compostos orgânicos no meio líquido para o Ensaio (II)-c (100% glicerol bruto)

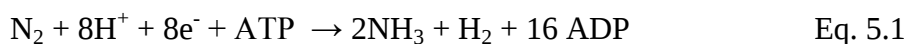


Observou-se que tanto para os ensaios envolvendo o inóculo (I) (Ensaio (I)-a, b e c), quanto para os ensaios envolvendo o inóculo (II) (Ensaio (II)-a, b e c) concentrações crescentes de metanol no meio foram em decorrência do aumento das proporções de glicerol bruto, fator este que também serviu para justificar a diminuição da produção de H₂ conforme discutido no item 5.3.4.

Segundo Botta (2012), a diversidade dos subprodutos gerados ao longo dos ensaios pode estar relacionada com a utilização de um consórcio microbiano misto.

Quanto à variação reduzida de pH, alguns compostos nitrogenados que foram adicionados para compor o meio de cultivo, como extrato de carne e peptona de carne, poderiam ter ocasionado a formação de amônia em condições de anaerobiose. Assim, concentrações reduzidas de amônia formada já poderiam ocasionar elevação do pH ao longo dos ensaios.

A atribuição de variação reduzida do pH também pode ser devido à formação de amônia em função da enzima nitrogenase presente no interior da célula microbiana e que é responsável pela geração de hidrogênio. A enzima nitrogenase reduz o nitrogênio (N₂) à amônia (NH₃) e é acompanhada pela redução obrigatória de prótons (H⁺) a hidrogênio (H₂) (MATHEWS et al., 2009), como visto pela equação 5.1 abaixo (KIM et al., 2011):



A Tabela 5.8 contém informações quanto aos principais compostos orgânicos gerados durante os ensaios de produções de H₂.

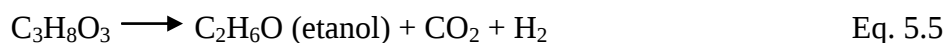
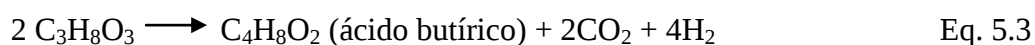
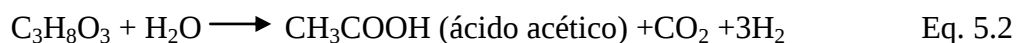
Tabela 5.8 - Principais compostos orgânicos voláteis gerados no início e final da operação durante as gerações máximas de H₂

Ensaio	Etanol (mg L ⁻¹)		Ácido Acético (mg L ⁻¹)		Ácido Butírico (mg L ⁻¹)		Produção máxima de H ₂ (mmol L ⁻¹)
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	
Ensaio (I)-a	487	1845	507	583	143	305	28,434
Ensaio (I)-b	270	862	415	494	185	484	22,377
Ensaio (I)-c	224	813	415	551	76	421	15,137
Ensaio (II)-a	183	903	272	807	59	705	17,680
Ensaio (II)-b	198	913	434	891	141	707	10,507
Ensaio (II)-c	245	1184	525	931	230	1237	10,408

Ensaio (I)-a (50% glicerol bruto + 50% glicerina), Ensaio (I)-b (80% glicerol bruto + 20% glicerina), Ensaio (I)-c (100% glicerol bruto), Ensaio (II)-a (50% glicerol bruto + 50% glicerina), Ensaio (II)-b (80% glicerol bruto + 20% glicerina), Ensaio (II)-c (100% glicerol bruto).

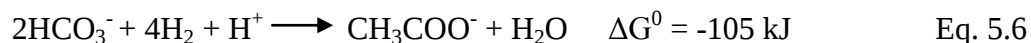
A geração de H_2 por bactérias fermentativas é acompanhada da formação de compostos orgânicos, como álcoois e ácidos, sendo estes os seus subprodutos metabólicos. Assim, podemos comparar a produção de H_2 com a geração dos compostos orgânicos voláteis presentes no meio líquido para os ensaios realizados.

Na maioria das rotas de bioconversão do glicerol, juntamente com os diferentes metabólitos, o H_2 é também produzido durante o metabolismo oxidativo. Das equações estequiométricas representadas (Equações 5.2 a 5.5) abaixo (MAINTINGUER; HATANAKA; OLIVEIRA, 2015), pode-se concluir que a geração de produtos finais altamente reduzidos é acompanhada por altos rendimentos de H_2 (SARMA et al., 2012).



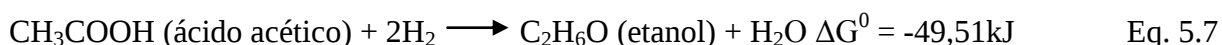
Observa-se que maiores rendimentos de H_2 são possíveis quando o ácido acético é gerado como produto final da fermentação do glicerol, sendo que 1 mol de glicerol geram 3 mols de H_2 nesta rota metabólica, seguido do ácido butírico quando 1 mol de glicerol geram 2 mol de H_2 , e do butanol e etanol, quando 1 mol de glicerol gera 1 mol de H_2 (MAINTINGUER; HATANAKA; OLIVEIRA, 2015).

Comparando-se o Ensaio (I)-a com o Ensaio (II)-a, cuja condição do meio de cultivo foi a mesma, as produções de H_2 foram diferentes, pois tratam-se de dois inóculos distintos, (I) e (II). Observou-se que houve elevação na concentração de ácido acético ao longo deste experimento para o inóculo (II). De acordo com as estequiometrias da fermentação do glicerol envolvendo a formação do ácido acético e ácido butírico (Equação 5.2 e 5.3, respectivamente), poderia prever-se que o aumento desses dois ácidos no Ensaio (II)-a levaria a maior produção de H_2 . Porém, para este mesmo ensaio, foi obtida geração de H_2 menor ($17,680 \text{ mmol } H_2 \text{ L}^{-1}$) que no Ensaio (I)-a ($28,434 \text{ mmol } H_2 \text{ L}^{-1}$). Isto pode ser explicado pelo fato de que o H_2 pode ter sido usado por bactérias homoacetogênicas para formar mais ácido acético. Enquanto, o tratamento à quente no inóculo foi suficiente para prevenir a metanogênese, não foi possível prevenir as perdas de H_2 devido à presença de bactérias homoacetogênicas que são formadoras de endósporos podendo sobreviver às condições extremas do pré-tratamento, como as espécies *C. aceticum* e *C. thermoautotrophicum*, que produzem ácido acético à partir de H_2 e CO_2 (Eq. 5.6) (OH et al., 2003).



As bactérias homoacetogênicas são caracterizadas por duas propriedades metabólicas especiais, que são: (i) produção de acetato como único produto orgânico e (ii) utilização de CO_2 como um aceptor inorgânico de elétrons para a síntese de acetato (LAY et al., 1998b).

Além da possibilidade deste tipo de bactéria consumidora de H_2 , a redução deste biogás poderia também ter ocorrido devido ao fato de que a produção de etanol a partir de ácido acético e H_2 é uma reação termodinamicamente favorável (Eq. 5.7). Pôde ser observado que houve um aumento da produção de etanol para todos os ensaios envolvendo o inóculo (II), onde a concentração final deste álcool foi maior para este tipo de inóculo do que os ensaios envolvendo o inóculo (I) (OH et al., 2003).



As mesmas considerações podem ser feitas na comparação do Ensaio (I)-b com o Ensaio (II)-b e para o Ensaio (I)-c com Ensaio (II)-c tendo em vista que se observou um aumento da geração de ácido acético e ácido butírico no Ensaio (II)-b e (II)-c seguida de aumento da formação de etanol para ambos. Logo, grande parte do H_2 formado pode ter sido utilizado por bactérias homoacetogênicas para formar ácido acético e/ou o ácido acético consumiu H_2 para gerar etanol, o que justifica a sua menor produção de H_2 comparada ao Ensaio (I)-b e (I)-c.

5.3.7 Determinação de 1,3- propanodiol

A Tabela 5.9 indica a relação entre as concentrações de 1,3-propanodiol com as porcentagens de glicerol consumido e as produções máximas de hidrogênio registradas ao longo dos ensaios.

Tabela 5.9 - Concentrações de 1,3-propanodiol ao final dos ensaios, consumos de glicerol e produção máxima de H₂ no final da operação dos ensaios

Ensaio	1,3-propanodiol (mg L ⁻¹)	Consumo de Glicerol (%)	Produção máxima de H ₂ (mmol L ⁻¹)
Ensaio (I)-a	0,00±0,00	26,9	28,434
Ensaio (I)-b	0,00±0,00	45,8	22,377
Ensaio (I)-c	0,01±0,00	56,2	15,137
Ensaio (II)-a	0,00±0,00	31,7	17,680
Ensaio (II)-b	0,07±0,02	59,0	10,507
Ensaio (II)-c	0,78±0,14	91,0	10,408

Observou-se que as produções de 1,3-propanodiol para alguns experimentos foram muito baixas e para outros não ocorreram. Para os ensaios nos quais as gerações desta substância aumentaram, foram registradas as maiores porcentagens de glicerol consumidas.

A formação de 1,3-propanodiol está relacionada ao metabolismo do glicerol pela rota redutiva por meio de microrganismos fermentativos. Antes de se chegar ao produto final desta rota, o 1,3-propanodiol, ocorre a formação de um composto intermediário, o 3-hidroxi-propionaldeído. Segundo Drożdżyńska e colaboradores (2011), a presença do 3-hidroxi-propionaldeído parece ser o inibidor mais forte da produção do 1,3-propanodiol. Este composto é normalmente um intermediário que não se acumula no interior da célula. Entretanto, sob condições de excesso de glicerol, ele pode ser excretado para o meio antes que se transforme no produto final.

Assim, pôde ser observado que quando houve uma porcentagem menor de glicerol consumido, havia um excesso de glicerol livre no meio líquido que não foi metabolizado pelos microrganismos. Tal fato interferiu na produtividade do 1,3-propanodiol, não sendo reportado nenhum valor para esta substância no meio líquido ao final dos ensaios I-(a) e II-(a), por exemplo, já que o excesso de glicerol fez com que o intermediário 3-hidroxi-propionaldeído fosse excretado para o meio impossibilitando a formação do produto final, o 1,3-propanodiol. Ao contrário dos ensaios com alta porcentagem de glicerol consumido (ensaios I-(c) e II-(c)), pouco glicerol livre permaneceu no meio líquido, o que possibilitou a geração do 1,3-propanodiol (Tabela 5.9).

O gás hidrogênio é gerado durante a bioconversão do glicerol através da rota oxidativa; entretanto, 1,3-propanodiol é produzido durante o metabolismo redutivo. Quando ambas as rotas existem no mesmo organismo, algumas quantidades de hidrogênio são consumidas para a produção do 1,3-propanodiol (SARMA et al., 2012). De acordo com

Selembo e colaboradores (2009), durante a fermentação do glicerol, para cada 1 mol de 1,3-propanodiol gerado, 1 mol de H_2 é consumido. Portanto, o rendimento final de H_2 gerado é reduzido pelo seu consumo direto.

Pode ser observado no presente estudo (Tabela 5.9) que para gerações mais elevadas de 1,3-propanodiol foram reportadas produções reduzidas de gás hidrogênio, como visto pelos ensaios I-(c) e II-(c). Sendo assim, para que houvesse a formação do 1,3-propanodiol nestes ensaios, uma quantidade de H_2 seria consumida, o que pode justificar a produção reduzida do biogás nos ensaios acima citados.

5.3.8 Caracterização Filogenética

A análise em plataforma Illumina foi realizada de modo a verificar a comunidade microbiana presente nos inóculos I e II. A Tabela 5.10 indica as taxonomias encontradas para ambos os inóculos estudados.

De acordo com a literatura, a maioria das bactérias identificadas em digestores anaeróbios geradores de H_2 é pertencente aos filos *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi* e *Proteobacteria* (ARIESYADY et al., 2007). As seções que seguem abaixo descrevem as principais características encontradas para os consórcios (I) e (II) na representados na Tabela 5.10, havendo, portanto, uma comparação com os resultados obtidos experimentalmente no decorrer dos ensaios.

Tabela 5.10 - Abundância relativa de Filo, Classe, Ordem, Família e Gênero para os inóculos I e II por meio da plataforma Illumina

Ordem Taxonômica	Descrição	Abundância relativa Inóculo I (%)	Abundância relativa Inóculo II (%)
Filo	<i>Firmicutes</i>	97,96	97,85
	<i>Proteobacteria</i>	1,57	1,76
Classe	<i>Clostridia</i>	91,81	94,70
	<i>Bacilli</i>	6,14	3,15
	<i>Gammaproteobacteria</i>	1,57	1,76
Ordem	<i>Clostridiales</i>	91,81	94,70
	<i>Lactobacillales</i>	6,14	3,15
	<i>Enterobacteriales</i>	1,57	1,76
Família	<i>Peptostreptococcaceae</i>	85,29	70,26
	<i>Clostridiaceae</i>	6,16	23,65
	<i>Enterococcaceae</i>	6,05	3,11
	<i>Enterobacteriaceae</i>	1,57	1,76
Gênero	Não classificado	87,24	77,21
	<i>Enterococcus</i>	6,03	3,05
	<i>Clostridium</i>	5,53	17,64

5.3.8.1 Filo *Firmicutes*

O Filo *Firmicutes* corresponde às bactérias Gram-positivas e é fenotipicamente diverso, onde as células podem ser esféricas ou retas, curvadas, em forma de hastes helicoidais ou filamentos, com ou sem flagelo e com ou sem endósporos resistentes ao calor. Elas são aeróbias facultativas ou anaeróbias estritas (SCHLEIFER, 2009). Este Filo, no presente trabalho, apresentou a maior abundância relativa para ambos os inóculos, ultrapassando 97% (Tabela 5.10).

Este Filo, conforme relatado na literatura, inclui os principais microrganismos que geram hidrogênio (RATTI et al., 2015a; MAINTINGUER et al., 2015; RATTI et al., 2015b). Assim, como visto nas seções anteriores, a geração de gás hidrogênio esteve intimamente relacionada aos microrganismos pertencentes a este Filo, que foram encontrados nos experimentos em grandes proporções. Ratti e colaboradores (2015a) estudaram a composição da comunidade bacteriana termofílica produtora de gás hidrogênio contida em reatores

alimentados com glicose. Por meio da análise do pirosequenciamento no trabalho de Ratti, foi encontrado o predomínio do Filo *Firmicutes* de 68,73% e 67,61% para os reatores contendo concentrações de glicose de 0,5 e 2,0 g L⁻¹ e os rendimentos obtidos foram 1,3 e 1,6 mol H₂ mol⁻¹ glicose, respectivamente. Ratti e colaboradores observaram ainda que a abundância relativa encontrada para o filo *Firmicutes* estava relacionada com a geração de hidrogênio obtida nos reatores.

O Filo *Firmicutes* contém as classes *Clostridia* e *Bacilli* (WIRTH et al., 2012). A classe *Clostridia* (91,8% para inóculo I e 94,7% para inóculo II) inclui o gênero de bactéria produtora de hidrogênio como *Clostridium* (RATTI et al., 2013). Tanto o gênero *Clostridium* quanto o gênero *Enterobacter* (pertencente ao filo *Proteobacteria*, conforme descrito na seção a seguir), correspondem a microrganismos amplamente estudados quando se trata da bioconversão do glicerol bruto à hidrogênio pelos processos de fermentação escura (PACHAPUR et al., 2015a; LO et al., 2013; SARMA et al., 2013c).

As espécies da classe *Clostridia* foram relatadas na literatura como as produtoras de gás hidrogênio durante a fase exponencial de seus crescimentos. Quando esta população alcança a fase de crescimento estacionária, o seu metabolismo desloca da produção de hidrogênio e ácido para a fase de produção de solvente (KAPDAN et al., 2006). Pesquisadores investigaram a diversidade bacteriana de microrganismos mesofílicos, que produzem hidrogênio, provenientes de lodos e encontraram a abundância da classe *Clostridia* de 64,6% (FANG et al., 2002).

De acordo com Ratti e colaboradores (2013), as culturas dominadas pela classe *Clostridia* podem ser facilmente obtidas por meio de choque térmico no lodo biológico. Como visto na seção 4.3.2, foi realizado o choque térmico nos lodos estudados, justificando deste modo, a sua abundância relativa elevada encontrada em ambos os inóculos (Tabela 5.10), cujo procedimento do pré-tratamento foi favorável para manutenção e sobrevivência desta classe de microrganismos. A classe *Clostridia* é fenotipicamente, quimiotaxonomicamente, fisiologicamente e ecologicamente diversa, contendo ambos os microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos e inclui a ordem *Clostridiales* (RAINEY, 2009 a).

Assim, conforme dito para a classe *Clostridia*, as bactérias pertencentes à classe *Bacilli* (6,14% e 3,15% para inóculos I e II, respectivamente) também são relatadas na literatura como produtoras de gás hidrogênio durante a sua fase exponencial de crescimento em experimentos operados em batelada (MAINTINGUER et al., 2015).

A classe *Bacilli* possui microrganismos Gram-positivos, que podem ou não formar endósporos e muitos crescem aerobiamente ou microaerofilicamente, sendo algumas

anaeróbias facultativas. Inclui a ordem *Lactobacillales*, que é composta de microrganismos Gram-positivos em forma de bacilos e cocos (LUDWIG et al., 2009a).

Bacteriocinas são peptídeos com atividade biológica, pertencentes às bactérias da ordem *Lactobacillales*, que apresentam propriedades antimicrobianas contra outras espécies de bactérias. Assim, a excreção de bacteriocinas por bactérias ácido lácticas podem inibir a produção de biohidrogênio pelas bactérias produtoras de hidrogênio, danificando a membrana celular de microrganismos como o *Clostridium* sp. (GOMES et al., 2016).

Alguns estudos reportados na literatura mostram que alguns fatores podem inibir a atividade da bacteriocina. Noike e colaboradores (2002) avaliaram o efeito de bactérias ácido lácticas (*Lactobacillus paracasei* e *Enterococcus durans*) na fermentação do hidrogênio de resíduos orgânicos. Foi verificada pelos autores que a inibição da produção de hidrogênio por microrganismos pertencentes ao gênero *Clostridium* foi reduzida quando a biomassa foi pré-tratada por 30 minutos a 50°C, condição suficiente para inativar a bacteriocina.

No trabalho de Zacharof e Lovitt (2012), embora a aplicação de temperaturas elevadas na biomassa, de 40, 60, 80 e 100°C, por períodos de 15, 30, 45 e 60 minutos, a atividade da bacteriocina foi afetada negativamente, porém ela permaneceu estável por algumas condições. A 40°C, a atividade da bacteriocina permaneceu inalterada, ao passo que a 60°C a atividade só foi afetada por tratamentos mais longos que 60 minutos. A 80°C foram observados efeitos negativos a 45 minutos e a 100°C os efeitos foram negativos independente da duração do tratamento.

Assim, na caracterização filogenética do presente estudo (Tabela 5.10) foi encontrada uma maior abundância relativa no inóculo (I) (6,14%) para microrganismos pertencentes à família *Lactobacillales*, quando comparado ao inóculo (II) (3,15%). Poderíamos prever que bacteriocinas estariam sendo formadas em maiores proporções no inóculo (I) do que no inóculo (II), já que elas são pertencentes à família *Lactobacillales*, e que assim, elas estariam inativando a atividade de microrganismos geradores de hidrogênio preferencialmente no inóculo (I). Porém, para este inóculo é que foram reportadas as maiores gerações de hidrogênio quando comparados ao inóculo (II). Conclui-se que a atividade da bacteriocina no inóculo (I) foi inativada pelas altas temperaturas do reator UASB termofílico (temperaturas de 50-60°C por um longo tempo de tratamento de resíduo da vinhaça), ambiente no qual elas foram coletas para a montagem dos ensaios.

A ordem *Lactobacillales* contem microrganismos usualmente anaeróbios facultativos além de incluir a família *Enterococcaceae* (LUDWIG et al., 2009 c).

A ordem *Clostridiales* contém as famílias *Peptostreptococcaceae* e *Clostridiaceae* (RAINEY, 2009a). Quanto à família *Clostridiaceae* (6,16% para inóculo I e 23,65% para inóculo II), os microrganismos a que pertencem são geralmente, obrigatoriamente anaeróbios e possuem forma de bacilo. Suas células são usualmente Gram-positivas, formam endósporos ou tem mostrado conter genes específicos para esporulação. Os *habitats* das quais seus membros foram isolados são muito diversos, como por exemplo, vários tipos de fezes, estrume, sedimentos de água doce e marinhos, lagos de sal, várias partes do corpo humano e lodo de esgoto (WIEGEL et al., 2009). Vale ressaltar que os inóculos trabalhados no presente estudo, I e II, são provenientes de lodos de estações de tratamento de água industrial e sanitária, respectivamente. Sendo assim, conforme a literatura, o *habitat* correspondente ao lodo de esgoto é propício para serem encontrados microrganismos da família *Clostridiaceae*, o que se comprovou pela análise de biologia molecular realizada (Tabela 5.10), sendo que a abundância relativa elevada destes respectivos microrganismos no inóculo II (23,65%) foi superior ao inóculo I (6,16%).

Os microrganismos pertencentes à família *Peptostreptococcaceae* (85,29% para inóculo I e 70,26% para inóculo II) são anaeróbios obrigatórios ou facultativos, Gram-positivos, morfologia de filamentos ou cocos (EZAKI et al., 2009).

Através das análises de microscopia óptica do presente estudo (Figura 5.4) foi possível observar que a morfologia predominante de ambos os inóculos foi Gram-positiva, com formação de endósporos e os ensaios de geração de hidrogênio foram realizados sob condições anaeróbias. Estas observações são compatíveis com a análise da caracterização filogenética pela biologia molecular (Tabela 5.10), tendo em vista que a abundância relativa elevada foi encontrada para a família *Peptostreptococcaceae* (85,29% para inóculo I e 70,26% para inóculo II) cujas características reportadas na literatura para esta família são compatíveis às encontradas no presente trabalho.

A família *Enterococcaceae* (6,05% e 3,11% para inóculos I e II, respectivamente) é composta de cocos Gram-positivos. Endósporos não são formados. Podem ser facultativas, anaeróbias ou microaerofílicas (LUDWIG et al., 2009b).

O gênero *Clostridium* (5,53% para inóculo I e 17,64% para inóculo II) pertence à família *Clostridiaceae*. Para microrganismos pertencentes a este gênero, é encontrada em sua fase de crescimento, uma morfologia em forma de haste, sendo células Gram-positivas, onde a maioria das espécies formam endósporos ovais ou esféricos. São usualmente quimiorganotróficos, produzem misturas de ácidos orgânicos e álcoois a partir de carboidratos e peptonas. Podem ser sacarolíticos, proteolíticos, nenhum dos dois ou ambos. Podem

metabolizar carboidratos, álcoois, aminoácidos, purinas, esteroides ou outros compostos orgânicos. Algumas espécies fixam o nitrogênio atmosférico. A maioria das espécies é obrigatoriamente anaeróbia, com temperatura de crescimento para sua maioria variando de 30 a 37°C (RAINEY, F. A.; HOLLEN, B. J.; SMALL, A., 2009).

A maioria dos estudos descreve o gênero *Clostridium* como o responsável pela produção de hidrogênio sob condições anaeróbias (MAINTINGUER et al., 2008). Segundo Maintinguer e colaboradores (2008), muitos fatores contribuem para a manutenção das espécies *Clostridium* nos reatores anaeróbios, como por exemplo, adições de peptona ao meio nutricional, tratamento à quente dos inóculos associados a um meio nutricional específico e o controle do pH a 5,5. Algumas destas medidas foram tomadas no presente trabalho, o que pode garantir a presença deste gênero em ambos os consórcios estudados como visto na análise de biologia molecular, com abundância relativa de 5,53% desse gênero para o inóculo I e 17,64% para o inóculo II.

Segundo Drożdżyńska e colaboradores (2011), os principais bioprodutos formados pelo gênero *Clostridium* durante o consumo do glicerol bruto são ácido acético e ácido butírico. Assim, de acordo com a tabela 5.10, a maior abundância relativa para microrganismos deste gênero foi encontrada no inóculo II. De acordo com a tabela 5.8 para a determinação dos compostos orgânicos voláteis no meio líquido, foram encontradas concentrações, ao final dos ensaios contendo 100% de glicerol bruto, para o inóculo I (Ensaio (I)-c) 551 mg L⁻¹ de ácido acético e 421 mg L⁻¹ de ácido butírico e para o inóculo II (Ensaio (II)-c) 931 mg L⁻¹ de ácido acético e 1237 mg L⁻¹ de ácido butírico. Portanto, produções mais elevadas de ácido acético e butírico, pelo inóculo II, estão relacionadas à maior abundância relativa encontrada para microrganismos do gênero *Clostridium*.

O gênero *Enterococcus* (6,03% e 3,05% para inóculos I e II, respectivamente) é proveniente da família *Enterococcaceae*. Este gênero é caracterizado por cocos Gram-positivos, ocorrendo separadamente, em pares ou em pequenas cadeias. Não são formadoras de endósporos. São anaeróbias facultativas, com uma preferência para condições anaeróbias. O intervalo de temperatura ótima para seu crescimento é mais específico, estando na faixa de 35-37°C. São muito resistentes à secagem. Crescimento quimiorganotrófico, onde geralmente requer nutrientes complexos. Possuem metabolismo fermentativo (SVEC et al., 2009).

Segundo Doi e colaboradores (2014), estudos fisiológicos têm mostrado que algumas espécies de *Enterococcus*, como a *Enterococcus faecalis* podem usar o glicerol como fonte de carbono e produzir acetato, acetoína, etanol e lactato como produtos finais. Com base no trabalho de Doi e colaboradores, esta cepa de *Enterococcus* estudada foi colocada em ambientes

contendo, separadamente, glicerol bruto e glicose na presença e na ausência de oxigênio. Quando a cultura foi cultivada em condições anaeróbias, a glicose foi convertida à lactato, mas, o glicerol foi convertido a etanol e formato ao invés de lactato. Estes resultados sugeriram que o metabolismo do glicerol, para este gênero de microrganismo, sob condições anaeróbias converteu o piruvato a etanol preferencialmente à lactato.

Não foram realizadas análises de determinação de lactato ou ácido láctico no meio líquido durante os ensaios realizados e, portanto, nada se pode afirmar a esse metabólito no presente estudo. Entretanto, no trabalho de Doi e colaboradores (2014), pode-se inferir que a presença de microrganismos do gênero *Enterococcus* esteve envolvida na formação de etanol, já que se tratou do consumo do glicerol bruto sob condições anaeróbias.

5.3.8.2 Filo *Proteobacteria*

A presença do filo *Proteobacteria* (que contém bactérias Gram-negativas) tem como registro, trabalhos envolvendo a operação de reatores anaeróbios em batelada gerando gás hidrogênio (MAINTINGUER et al., 2015 b). No presente trabalho, sua abundância relativa encontrada foi de 1,57% para inóculo I e 1,76% para inóculo II (Tabela 5.10).

Dentro da designação do filo *Proteobacteria* encontra-se a classe *Gammaproteobacteria* (LUDWIG et al., 2009 a). Esta classe, segundo Ratti e colaboradores (2013), inclui a espécie *Enterobacter*, dita na literatura como uma das grandes responsáveis pela geração de hidrogênio por processos fermentativos.

A classe *Gammaproteobacteria* (1,57% e 1,76% para inóculos I e II respectivamente) contém a ordem *Enterobacteriales* (GARRITY, et al. 2005), cuja porcentagem da abundância relativa para esta foi 1,57% e 1,76% para os inóculos I e II, respectivamente. Esta ordem contém a família *Enterobacteriaceae* (1,57% e 1,76% para os inóculos I e II, respectivamente).

Os microrganismos pertencentes à família *Enterobacteriaceae* possuem uma morfologia de bacilos Gram-negativos, não são formadores de endósporos ou microcistos. Eles crescem na presença ou na ausência de oxigênio. Crescem muito bem em meios de cultivo contendo peptona e extrato de carne. Quando fermentam glicose ou outros carboidratos, frequentemente produzem ácidos e gases (BRENNER et al., 2005).

Conforme identificado na microscopia de ambos os inóculos (Figura 5.4), os microrganismos Gram-negativos estavam presentes em menores quantidades. Sendo assim, esta análise foi compatível ao que foi encontrada na biologia molecular (Tabela 5.10), tendo

que vista que microrganismos Gram-negativos pertencem à família *Enterobacteriaceae*, do filo *Proteobacteria* cujas abundâncias relativas, para ambos os inóculos, não ultrapassaram 1,76%.

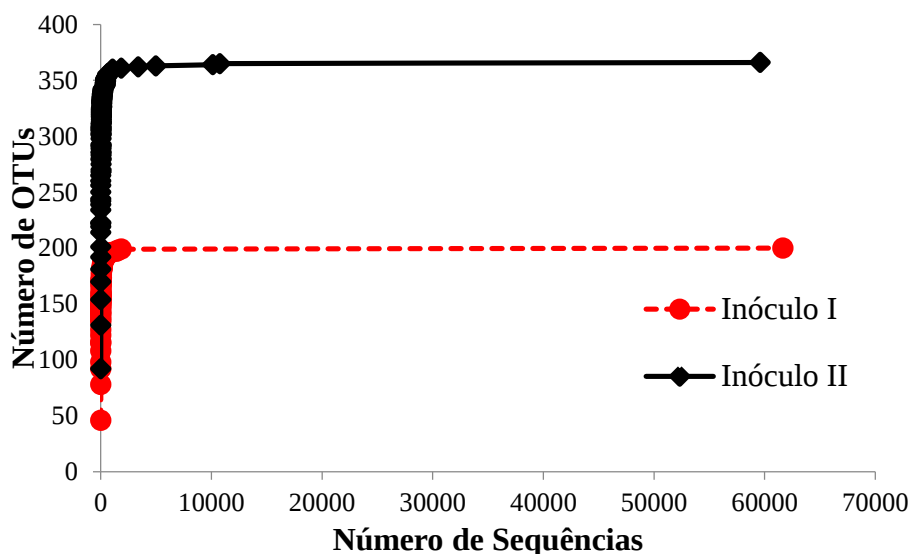
5.3.8.3 Diversidade e riqueza das espécies

A análise pelo “Illumina MiSeq pirosequenciamento” possibilitou a determinação da comunidade microbiana, como visto na seção anterior, bem como analisar os índices de diversidade e riqueza dos consócios I e II (Tabela 5.11). Esta análise gerou um total de 73878 (comprimento médio = $458,18 \pm 8,18$ pares de bases) e 105377 (comprimento médio = $452,87 \pm 8,04$ pares de bases) sequências bacterianas 16S rDNA com índice de similaridade 97% para ambas. Estas sequências formaram 200 OTUs (Unidades Taxonômicas Operacionais) para o inóculo I e 366 OTUs para o inóculo II.

Tabela 5.11 - Resumo das estimativas de riqueza e diversidade de espécies ao final dos ensaios (I)-c e (II)-c

Amostras	Índice Shannon_H	Índice Simpson_1-D	Chao-1	Curva de rarefação
Inóculo I	1,033	0,3054	772	200
Inóculo II	2,025	0,6584	1144	366

O estimador Chao representa a riqueza da comunidade bacteriana, enquanto o índice de Shannon e índice de Simpson indicam diversidade da comunidade. Quanto maior o índice de Shannon e o índice Simpson, maior é a diversidade da comunidade e quanto maior o índice Chao, maior a riqueza desta comunidade (XIE et al., 2016). Os níveis de riqueza bacteriana também podem ser determinados utilizando curvas de rarefação (RATTI et al., 2015a) (Figura 5.16). Uma curva de rarefação é feita por repetidas re-amostragens aleatórias do conjunto total de N indivíduos ou N amostras, estimando o número esperado de espécies em uma amostra de dentro do ambiente real. Essa curva expressa a riqueza máxima esperada no ambiente quando há a estabilização da curva.

Figura 5.2 - Curvas de rarefação para OTUs dos inóculos I e II

Fonte: Elaborada pela autora

Neste trabalho, as curvas de rarefação (Figura 5.16) exibiram padrões semelhantes para as duas amostras. Ambas as curvas tornaram-se relativamente planas com o aumento do número de sequências analisadas, que segundo Xie e colaboradores (2016), isto demonstra a racionalidade e precisão dos resultados. Além disso, foi possível observar que o inóculo II possui riqueza elevada no fenótipo bacteriano, tendo em vista que ele possui, na curva de rarefação, um maior número de OTUs, bem como apresentou valores superiores do estimador Chao que também representam a riqueza do consórcio.

Foi possível observar pela Tabela 5.11, que os índices de Shannon e Simpson para o inóculo II foram maiores do que os apresentados para o inóculo I. Esta diferença se deve, provavelmente, à fonte dos inóculos que foram distintas, sendo que, o inóculo I foi obtido de reatores termofílicos e o inóculo II proveniente de reatores mesofílicos. As temperaturas dos condicionamentos dos microrganismos em seu ambiente inicial são consideradas um fator importante na distinção das comunidades bacterianas de ambos os tipos de reatores envolvidos (GUO et al., 2014). Guo e colaboradores (2014) estudaram microrganismos termofílicos e mesofílicos em reatores anaeróbios, separadamente, para a digestão de sobras de alimentos como substratos, onde um comparativo foi feito para enfatizar as respostas microbiológicas com aumento das taxas de carga orgânica. Assim, os resultados de pirosequenciamento revelaram uma dinâmica microbiológica distinta em ambos os reatores. A riqueza de espécies bacterianas no reator mesofílico foi maior do que no reator termofílico, de acordo com seu estudo. Os processos termofílicos (50-60°C) restringiram um grupo de

microrganismos que sobreviveram nesta faixa específica de temperatura, ao contrário do que ocorre em reatores mesofílicos (30-40°C) onde a comunidade microbiana é mais diversificada. De acordo com as observações feitas no trabalho de Guo e colaboradores (2014), o inóculo II do presente trabalho foi proveniente de reatores mesofílicos e sendo assim, este apresentou uma comunidade microbiana diversificada, compatível ao que foi determinada pelos elevados índices Shannon e Simpson, comparados com o inóculo I. Entretanto, as condições termofílicas (inóculo I) selecionaram espécies geradoras de H₂, onde foram observados os melhores rendimentos e gerações máximas de H₂, conforme descrito a seguir.

5.3.9 Rendimento da geração de H₂

O rendimento de H₂ obtido neste estudo foi calculado a partir da relação entre o Potencial Máximo de Produção de H₂ (P), proveniente da equação de Gompertz modificada e glicerol que foi consumido durante a realização dos ensaios (Tabela 5.12).

Tabela 5.12 - Rendimentos de H₂ (mol de H₂ mol⁻¹ de glicerol) para os ensaios realizados

Ensaio	Rendimento (mol H ₂ mol ⁻¹ glicerol)
Ensaio (I)-a	2,2
Ensaio (I)-b	1,6
Ensaio (I)-c	0,8
Ensaio (II)-a	1,1
Ensaio (II)-b	0,6
Ensaio (II)-c	0,3

A Tabela 5.13 compara alguns estudos referentes à bioconversão do glicerol bruto à H₂ utilizando-se culturas mistas como fonte de inóculo com resultados obtidos no presente trabalho.

Mangayil e colaboradores (2015) realizaram estudos estatísticos a fim de se obter melhores rendimentos para a geração de H₂ a partir da otimização do meio de cultivo, com glicerol bruto, 1 g L⁻¹, por consórcio microbiano enriquecido composto principalmente de espécies de *Clostridium*. Os autores obtiveram rendimentos de 1,41 mol H₂ mol⁻¹ glicerol. Este rendimento de H₂ gerado no trabalho destes pesquisadores foi inferior ao obtido no Ensaio (I)-b (1,63 mol H₂ mol⁻¹ glicerol), quando se trabalhou com 2,6 g L⁻¹ de glicerol (80% correspondendo ao glicerol bruto e 20% à glicerina). Entretanto, o glicerol bruto obtido por

Mangayil continha um teor de glicerol de 45%, valor superior ao do presente estudo (10,41%).

Tabela 5.13 - Estudo comparativo da bioconversão do glicerol bruto à H₂

Substrato	Inóculo	Glicerol inicial	Condições experimentais			Metabólitos finais	Rendimento	Ref.
			Temp. (°C)	pH	Reator em			
Glicerol industrial da Finlândia (45% glicerol, 30% metanol, pH 12)	Lodo ativado (consórcio microbiano enriquecido contendo principalmente <i>Clostridium</i>)	1,0 g L ⁻¹	40	6,5	Batelada	Ácido acético, etanol e ácido butírico	1,41 mol H ₂ mol ⁻¹ glicerol	MANGAYIL et al. 2015
Glicerol industrial da Finlândia (45% glicerol, 30% metanol, pH 12)	Lodo ativado da estação de tratamento de água da Finlândia	1,0 g L ⁻¹	40	6,5	Batelada	Ácido acético, etanol e ácido butírico	1,10 mol H ₂ mol ⁻¹ glicerol	MANGAYIL et al., 2012
Glicerol bruto da produção de biodiesel no sul da Itália (90% glicerol)	Lodo (cultura mista) do tratamento de água da China	15,0 g L ⁻¹	37	7,9	Batelada	Etanol (8 g L ⁻¹)	0,96 mol H ₂ mol ⁻¹ glicerol	VARRONE et al., 2012
Oriundo da produção de biodiesel a partir de óleo vegetal (61,6% metanol, 26,5% glicerol, 5,8% KOH, 6,1% biodiesel)	Solo orgânico (culturas mistas), coletado de uma fazenda orgânica próximo à Universidade de Connecticut	7,0 g L ⁻¹	30	5,5	Batelada	0,65 mol 1,3-PD mol ⁻¹ glicerol	0,75 mol H ₂ mol ⁻¹ glicerol	LIU et al., 2013
Glicerol bruto oriundo da produção do biodiesel	Lodo de digestor anaeróbio obtido a partir de resíduos de sólidos urbanos	10 g L ⁻¹	37	6,0	Batelada	1,3-propanodiol, ácido butírico, ácido acético, ácido láctico e etanol	0,41 mol H ₂ mol ⁻¹ glicerol	SEIFERT et al., 2009
Bioproduto da transesterificação do óleo de soja para a produção de biodiesel, Pensilvânia, Estados Unidos (1300 mg L ⁻¹ DQO, 69,5% glicerol)	Culturas mistas (óleo de trigo)	3,0 g L ⁻¹	30	6,2	Batelada	0,59 mol 1,3-PD mol ⁻¹ glicerol	0,31 mol H ₂ mol ⁻¹ glicerol	SELEMBBO et al. 2009
Glicerol bruto advindo óleos residuais domésticos	Lodo granula termofílico UASB tratando resíduo de vinhaça.	3,0 g L ⁻¹ (100% glicerol bruto)	37	5,5	Batelada	813,0 mg L ⁻¹ etanol	0,80 mol H ₂ mol ⁻¹ glicerol	Presente estudo

No trabalho de Mangayil e colaboradores (2012) foram utilizados consórcios bacterianos provenientes de lodos ativados de estação de tratamento de águas residuais da Finlândia, onde esse inóculo foi incubado em meio nutricional contendo 1 g L⁻¹ de glicerol

bruto, proveniente de plantas de produção e biodiesel, a 40°C, pH 6,5. O rendimento obtido foi de 1,10 mol H₂ mol⁻¹glicerol. Este resultado foi próximo ao Ensaio (I)-c (100% glicerol bruto) com rendimento de 0,8 mol H₂ mol⁻¹glicerol e Ensaio (II)-a (50% glicerol bruto e 50% de glicerina) com rendimento de 1,10 mol H₂ mol⁻¹glicerol (Tabela 5.12).

O estudo desenvolvido por Varrone et al., (2012) consistiu em ensaios com culturas mistas e condições nutricionais otimizadas com glicerol bruto (15 g L⁻¹) oriundo da produção de biodiesel simultaneamente para produções máximas de hidrogênio e etanol fazendo o uso de ferramentas estatísticas. Os autores obtiveram, sem a presença de elementos traço, conversão de 97,7% do glicerol bruto com rendimentos de 0,96 mol H₂ mol⁻¹ glicerol gerando como subproduto principal 8 g L⁻¹ de etanol. Este trabalho se assemelha ao desenvolvido no presente estudo. O rendimento da produção de H₂ de Varrone e colaboradores se aproximou ao Ensaio (I)-c, 100% de glicerol bruto, (0,83 mol H₂ mol⁻¹ glicerol), onde, no presente estudo, foi testada concentração inicial de glicerol bruto de 3,0 g L⁻¹, com consumos de 56,2%; valores bem inferiores aos de Varrone (15 g L⁻¹ de glicerol bruto inicial e consumos de 97,7%). Isto demonstrou que o inóculo (I) apresentou grande potencialidade para a geração de H₂ frente à bioconversão do glicerol bruto à concentração reduzida.

Liu e colaboradores (2013) estudaram a bioconversão do glicerol bruto, oriundo da produção de biodiesel, em H₂ e 1,3-propanodiol utilizando solo orgânico como inóculo (cultura mista). O glicerol bruto foi separado em 4 fases de purificação sendo que todas estas foram estudadas a fim de se obter melhores produções de H₂ concomitantes às melhores gerações de 1,3-propanodiol (1,3PD), variando-se as concentrações de glicerol bruto em 3, 5 e 7 g L⁻¹. A fase do glicerol mais purificada (quando se retirou KOH, metanol e biodiesel) foi a que apresentou melhores rendimentos de H₂ (0,75 mol H₂ mol⁻¹ glicerol) e 1,3PD (0,65 mol 1,3-propanodiol mol⁻¹ glicerol) quando a concentração de glicerol foi de 7 g L⁻¹. Tais resultados foram inferiores aos obtidos neste presente estudo. O Ensaio (I)-c, com concentração inicial de 3,0 g glicerol bruto L⁻¹ apresentou um rendimento de geração de H₂ de 0,83 mol H₂ mol⁻¹glicerol, valor superior ao apresentado por Liu e colaboradores.

Seifert e colaboradores (2009) estudaram a geração de hidrogênio a partir de glicerol bruto oriundo da produção de biodiesel para processos fermentativos operados em reatores do tipo batelada. Assim, de acordo com seu estudo, foi possível analisar a influência da concentração de glicerol, nitrogênio e inóculo na geração de hidrogênio. Foram adicionadas concentrações crescentes de glicerol de 5,0 a 30,0 g L⁻¹ nos ensaios e os autores concluíram que a concentração inicial de glicerol não foi o fator limitante na produção de hidrogênio. Assim, foi definida uma concentração para a geração máxima de hidrogênio de 10,0 g L⁻¹. A

concentração da biomassa, expressa em g L^{-1} de STV (Sólidos Totais Voláteis), variou de 1,2 e $11,6 \text{ g L}^{-1}$, o que apresentou ser o fator importante para a geração de hidrogênio. Em concentrações mais elevadas foi observada queda brusca do biogás gerado. Este efeito foi correlacionado a volumes mais elevados de inóculo que continham mais carbono e, portanto, responsável pela produção de biomassa à custa do hidrogênio. Os resultados quanto à relação Carbono/Nitrogênio demonstraram que este valor não esteve correlacionado com a produção de hidrogênio gerado porque variando esta relação, o rendimento específico de hidrogênio apresentou alteração reduzida. O melhor rendimento na condição otimizada foi de $0,41 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}$ glicerol e inferior ao presente estudo (Tabela 5.13 Ensaio (I)-c).

Selembo e colaboradores (2009) examinaram a conversão de glicerol bruto, durante a fermentação anaeróbia a H_2 e 1,3-propanodiol, com a utilização de culturas mistas como fonte de inóculo. Foram obtidos rendimentos de $0,31 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}$ glicerol para concentração de entrada de $3,0 \text{ g L}^{-1}$ de glicerol. Todos os rendimentos obtidos no presente trabalho superaram os rendimentos do trabalho de Selembo. O Ensaio (I)-c (100% glicerol bruto) foi trabalhado sob condições muito próximas ao estudo de Selembo ($3,0 \text{ g L}^{-1}$ de glicerol bruto), sendo obtido um rendimento de $0,8 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}$ glicerol, superior ao do trabalho de Selembo. Isto demonstra que o presente estudo foi desenvolvido com sucesso quanto à obtenção de um inóculo capaz de atingir eficiências de geração de H_2 .

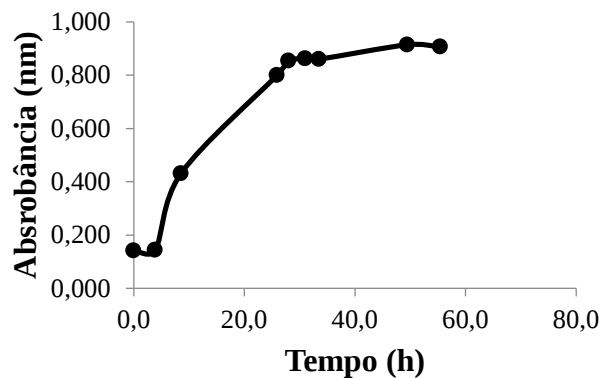
5.4 Ensaios de geração de H_2 para a cultura pura

Foi realizado um ensaio em duplicata para a cultura pura *Enterobacter* sp. isolada de trabalhos anteriores. As análises realizadas durante a operação dos ensaios estão descritas a seguir.

5.4.1 Análise do crescimento celular

Esta análise foi realizada somente com base na absorbância a 600 nm ao longo dos ensaios. Os resultados dos Sólidos Totais Voláteis (STV) para esta cultura não foram representativos e, por conseguinte, eles não foram indicados para esta análise. O crescimento celular foi estabilizado em torno de 28 horas de experimento (Figura 5.17). Nesse período foi verificada a fase exponencial do crescimento com subsequente consumo de nutrientes.

Figura 5.17 - Variação temporal do crescimento bacteriano no ensaio de produção de H_2 para cultura pura (100% glicerol bruto)

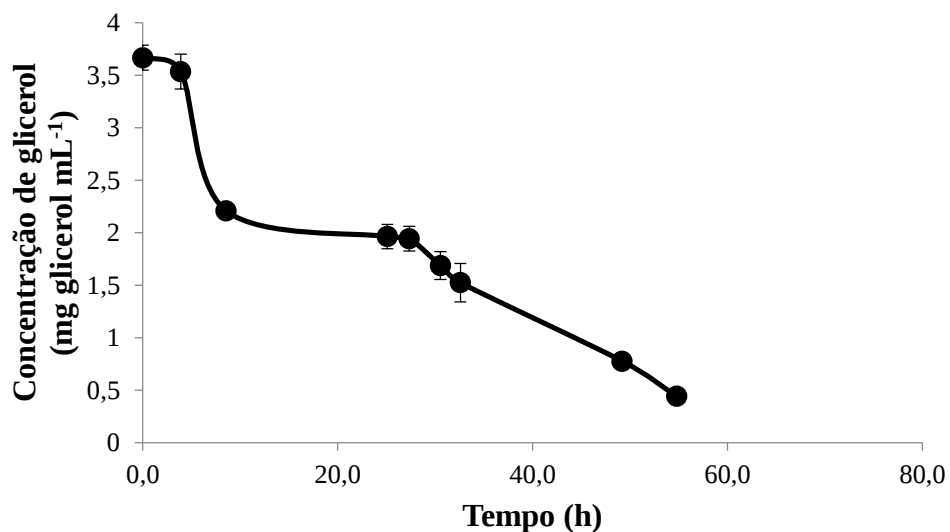


Fonte: Elaborada pela autora

5.4.2 Consumo do glicerol no ensaio de produção de H_2

Pelo fato de haver o consumo de glicerol ao longo do experimento (Figura 5.18), foi possível dizer que a cultura pura conseguiu se adaptar ao meio de cultivo.

Figura 5.18 - Concentração de glicerol ao longo do tempo para a cultura pura



Fonte: Elaborada pela autora

A Tabela 5.14 indica a concentração inicial e final de glicerol livre no ensaio envolvendo a cultura *Enterobacter* sp. bem como a porcentagem de consumo.

Tabela 5.14 - Concentração de glicerol livre durante operação do reator anaeróbio para a cultura pura

Ensaio	Início da operação (mg glicerol mL ⁻¹)	Final da operação (mg glicerol mL ⁻¹)	Glicerol consumido (%)
Ensaio cultura pura	3,66±0,00	0,44±0,01	88,0

Uma porcentagem elevada de glicerol bruto foi consumida ao longo do experimento. Porém, o seu consumo não foi completo e nem tão rápido, como reportado no trabalho de Ito e colaboradores (2005) no qual foi testada a cultura pura *Enterobacter aerogenes*. Para a montagem dos reatores em batelada do presente estudo, a concentração inicial de glicerol bruto foi maior, 3,66 g L⁻¹, do que a utilizada no trabalho de Ito e colaboradores (2005), 1,7 g L⁻¹. Assim, quanto maior a carga de entrada do glicerol bruto, mais contaminantes ele carrega consigo deixando o meio saturado de impurezas, sendo uma dificuldade para a atividade microbiológica, justificando deste modo o consumo do substrato ter sido incompleto e ocorrendo num tempo maior do que foi reportado pela literatura.

5.4.3 Demanda Química de Oxigênio (DQO)

O valor de DQO durante o início e final da operação não alteraram significativamente (Tabela 5.15). A mesma justificativa apresentada na seção 5.3.3, para a manutenção da DQO, se enquadra para este caso do ensaio com a cultura pura, onde houve uma transformação do substrato a metabólitos secundários não havendo a geração de metano.

Tabela 5.15 - Valor de DQO do ensaio de produção de H₂ para a cultura pura

Ensaio	Início da operação (g L ⁻¹)	Final da operação (g L ⁻¹)
Ensaio cultura pura	45,6 ± 1,80	42,6 ± 0,18

5.4.4 Produção de hidrogênio

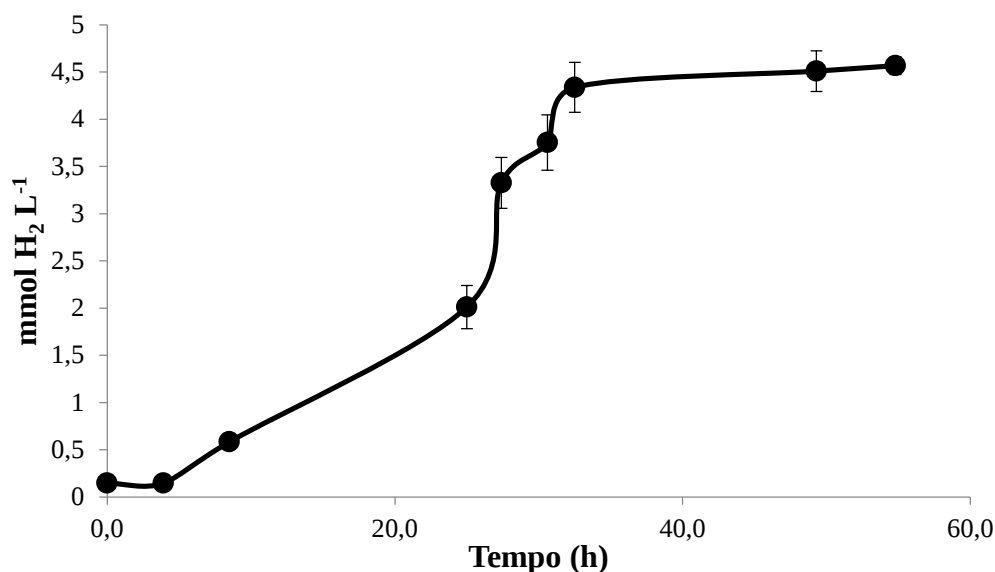
A tabela 5.16 abaixo representa a produção máxima de hidrogênio ao longo do ensaio.

Tabela 5.16 - Dado experimental do tempo de operação do ensaio e produção máxima de H₂

Ensaio	Tempo de operação (horas)	Produção máxima de H ₂ (mmol H ₂ L ⁻¹)
Ensaio cultura pura	54,8	4,57 ± 0,09

A figura 5.19 ilustra o perfil do ensaio envolvendo a cultura pura *Enterobacter* sp. na presença de 100% de glicerol bruto pré-tratado.

Figura 5.19 - Produção de H_2 ($mmol H_2 L^{-1}$) em função do tempo do ensaio (h) para a cultura pura



Fonte: Elaborada pela autora

A produção máxima de hidrogênio atingida foi de 4,57 $mmol H_2 L^{-1}$ ao longo de 54,8 horas de experimento. Vale ressaltar que a montagem deste ensaio com a cultura pura foi realizada sob a condição de um meio de cultivo contendo 100% de glicerol bruto pré-tratado. Em comparação com os ensaios (I)-c e (II)-c envolvendo os consórcios de bactérias na presença de 100% de glicerol bruto, o ensaio contendo a cultura pura ocorreu num tempo menor, de 54,8 horas de experimento até ser atingida a produção máxima de hidrogênio, comparando-se com 90 horas para o ensaio (I)-c e 84 horas para o ensaio (II)-c. Por se tratar de cultura pura, vale dizer que só esta espécie estava presente no ensaio, o que justifica o consumo do substrato elevado e de forma mais rápida do que os ensaios envolvendo as culturas mistas trabalhadas.

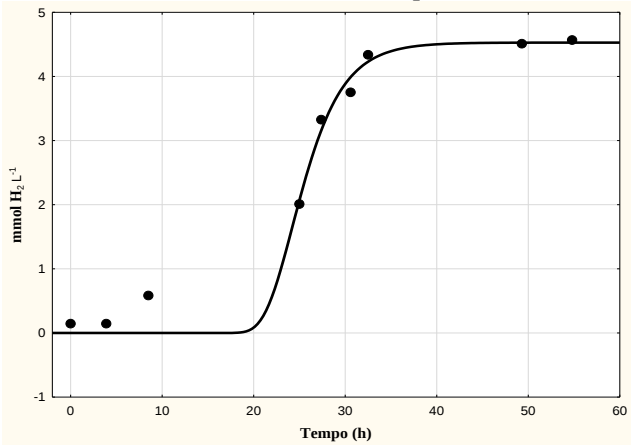
Comparando-se este ensaio de geração de hidrogênio envolvendo a cultura pura com os ensaios anteriormente realizados para os consórcios bacterianos I (14,84 $mmol H_2 L^{-1}$) e II (11,36 $mmol H_2 L^{-1}$), observou-se que pouco hidrogênio foi formado na presença da *Enterobacter* sp. (4,57 $mmol H_2 L^{-1}$). Uma possível justificativa para este fato se refere à sensibilidade da cultura pura frente aos contaminantes presentes no meio líquido oriundos do

glicerol bruto, como o metanol e sabões, por exemplo, que puderam ter sido tóxicos o suficiente para prejudicar o metabolismo desta espécie impedindo que grande quantidade de biogás fosse formada.

5.4.5 Cinética da produção de hidrogênio

Foi utilizada a equação Gompertz modificada para fim de ajustes dos dados experimentais (Figura 5.20 e Tabela 5.17)

Figura 5.20 - Comportamento da geração de H₂ através da função Gompertz modificada no ensaio envolvendo a cultura pura



Fonte: Elaborada pela autora

Tabela 5.17 - Potencial de Produção de H₂ (P), Taxa Máxima de Produção de H₂ (R_m), Fase Lag (λ), limites inferior e superior que o modelo calculou e R² obtidos pela equação de Gompertz modificada

Ensaio	Parâmetros	Valor estimado	Limite inferior	Limite superior	R ²
Ensaio cultura pura (100% glicerol bruto pré-tratado)	P (mmol)	4,527	4,054	5,000	0,991
	R _m (mmol h ⁻¹)	0,542	0,194	0,890	
	λ (h)	21,180	17,890	24,467	

O valor encontrado para o coeficiente de correlação, R², durante o modelamento estatístico (Tabela 5.17) foi superior a 0,98. Isto sugere que a equação de Gompertz modificada foi capaz de descrever a evolução da produção de hidrogênio satisfatoriamente, além do que valores de R² superiores a 0,9 indicam exatidão e precisão nas medições ao longo dos ensaios (VARRONE et al., 2013; SIVAGURUNATHAN et al., 2016).

Reungsang e colaboradores (2013) trabalharam com um glicerol bruto, oriundo de uma planta de produção de biodiesel a partir de óleo de fritura usado, para a geração

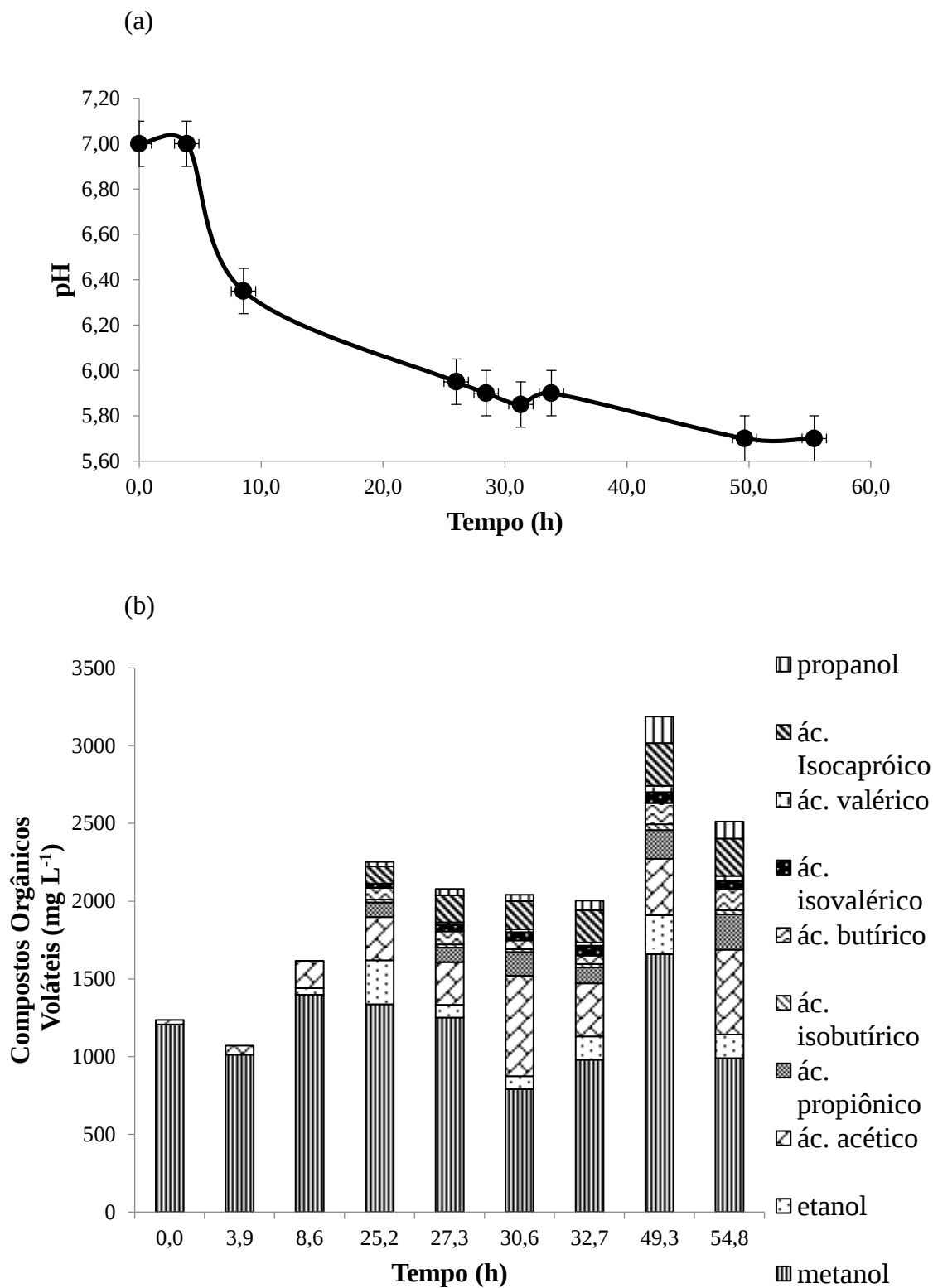
simultânea de hidrogênio e etanol utilizando a cultura pura *Enterobacter aerogenes*, espécie conhecida na literatura por possuir habilidade de produção de H_2 a partir de glicerol bruto. Foram utilizadas para o trabalho de Reungsang, ferramentas estatísticas a fim de se otimizar as condições de cultivo para a máxima geração de ambos os compostos. Assim, foi encontrada a seguinte condição: $1,0 \text{ g L}^{-1}$ de extrato de levedura, 37 g L^{-1} de glicerol bruto, pH inicial de 8,14 e temperatura de 37°C , obtendo-se uma máxima geração simultânea de $0,24 \text{ mmol H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e 120 mmol L^{-1} para etanol.

De acordo com o presente trabalho, foi encontrado um valor de $0,542 \text{ mmol H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para a taxa máxima de produção de hidrogênio. Este valor foi superior ao apresentado pelo estudo de Reungsang e colaboradores (2013) ($0,24 \text{ mmol H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), tendo em vista que os autores aplicaram concentrações elevadas de glicerol bruto (37 g L^{-1}), quando comparado ao presente estudo, com concentrações mais reduzidas ($3,66 \text{ g L}^{-1}$ de glicerol bruto) e assim foi possível obter taxa mais elevada de geração do biogás, já que menos impurezas são encontradas para concentrações reduzidas de glicerol bruto.

5.4.6 Compostos orgânicos do meio líquido

Análises foram feitas de acompanhamento do pH do meio líquido ao longo do ensaio contendo a cultura pura, bem como a geração de compostos orgânicos voláteis (Figura 5.21).

Figura 5.21 - (a) Variação temporal de pH e (b) Produção acumulada de compostos orgânicos no meio líquido para o Ensaio com cultura pura (100% glicerol bruto)



Fonte: Elaborada pela autora

Foi possível observar que houve redução do pH do meio à medida em que ácidos eram formados, como por exemplo, o ácido acético, onde sua concentração foi aumentando ao longo do experimento (Figura 5.21b).

O meio de cultivo passou por processo de esterilização onde ocorreu redução da concentração de metanol do meio líquido referente ao início do ensaio em comparação aos ensaios realizados para os consórcios de bactérias (I) e (II) nas mesmas condições de 100% de glicerol bruto pré-tratado (Tabela 5.18). O metanol evapora a 65°C e para um processo de esterilização em autoclave por 15 minutos à 121°C já é capaz de remover uma quantidade significativa de metanol do glicerol bruto (SARMA et al., 2012).

Tabela 5.18 - Concentração de metanol no meio líquido para o ensaio da cultura e os dois ensaios envolvendo o consórcio de bactérias (I) e (II) na condição de 100% de glicerol bruto

Ensaio	Concentração de Metanol inicial
	(mg L ⁻¹)
Ensaio Cultura Pura	1206
Ensaio (I)-c	1476
Ensaio (II)-c	1476

No trabalho de Sarma e colaboradores (2013 c), foi investigado o efeito de contaminantes presentes no glicerol bruto como o sabão e o metanol, durante a geração de hidrogênio e consumo do substrato envolvendo a cultura pura *Enterobacter aerogenes* NRRL B-407. Foi observado que a produção cumulativa de gás hidrogênio diminuiu conforme a concentração de glicerol bruto e o teor de metanol presente aumentavam. Segundo Sarma e colaboradores (2013 c), foi possível inferir que metanol no glicerol bruto ocasionou um forte efeito negativo para a produção de hidrogênio com cultura pura *E. aerogenes*, onde as produções para os testes realizados não ultrapassaram 2,00 mmol H₂ L⁻¹. Ao longo do experimento foi observado que para uma concentração de metanol por volta de 2 g L⁻¹, um consumo máximo de 70% de glicerol bruto foi detectado. Segundo Sarma e colaboradores (2013 c), certas concentrações de álcool, como o metanol, podem melhorar a permeabilidade celular e provavelmente ter melhorado assim a taxa de utilização do glicerol podendo ser uma razão para esta resposta de utilização frente a determinadas concentrações de metanol.

Seguindo esta mesma linha de raciocínio, no presente estudo, foi encontrada uma produção de hidrogênio reduzida (4,57 mmol H₂ L⁻¹) ao mesmo tempo em que foi mensurado consumo elevado de glicerol bruto (88%). Pode-se atribuir estes dados experimentais às

respostas geradas pela presença de metanol no meio líquido proveniente do glicerol bruto. Assim, para esta concentração de $1,2 \text{ g L}^{-1}$ de metanol, um forte efeito negativo para a geração de hidrogênio foi detectado, porém, um elevado consumo do substrato foi encontrado devido ao aumento da permeabilidade celular que melhorou a taxa de utilização do glicerol bruto.

5.4.7 Determinação de 1,3- propanodiol

A tabela 5.19 indica a relação entre as concentrações de 1,3-propanodiol com as porcentagens de glicerol consumido e as produções máximas de hidrogênio registradas ao longo do ensaio para a cultura pura e para os ensaios envolvendo os consórcios de bactérias sob as mesmas condições de 100% de glicerol bruto pré-tratado a fim de se fazer um comparativo entre os três ensaios.

Tabela 5.19 - Relação da geração de 1,3-propapodiol com a porcentagem de glicerol consumido e as produções máximas de H_2 para a cultura pura e para os ensaios (I)-c e (II)-c

Ensaio	Concentração de 1,3-propanodiol ao final da operação (mg L^{-1})	Glicerol consumido (%)	Produção máxima de H_2 (mmol L^{-1})
Ensaio cultura pura	$1,46 \pm 0,23$	88,0	4,53
Ensaio (I)-c	$0,01 \pm 0,00$	56,2	15,137
Ensaio (II)-c	$0,78 \pm 0,14$	91,0	10,408

Foi possível observar que houve uma maior geração de 1,3-propanodiol para a cultura pura ($1,46 \text{ mg L}^{-1}$) em comparação com os ensaios realizados envolvendo os consórcios de bactérias (I) e (II) ($0,01$ e $0,78 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente) sob as mesmas condições de operação e montagem dos ensaios (Tabela 5.19). Assim, conforme já discutido na seção 5.3.7, existem duas rotas envolvendo o processo fermentativo do glicerol bruto, a via redutiva e a via oxidativa. A molécula 1,3-propanodiol é obtida por meio da rota redutiva e para cada mol deste composto gerado, um mol de gás hidrogênio é consumido quando essas duas rotas coexistem (SARMA et al., 2012). Sendo assim, a rota preferencial dos ensaios envolvendo a cultura pura foi a rota redutiva, já que uma concentração mais elevada de 1,3-propanodiol foi gerado em virtude da concentração reduzida de gás hidrogênio produzida.

Além disso, uma grande porcentagem de glicerol bruto foi consumida (88%) ao longo do ensaio envolvendo a cultura pura, permanecendo pouco glicerol livre no meio líquido. Conforme Drożdżyńska e colaboradores (2011), um composto intermediário da rota de

produção do 1,3-propanodiol é considerado inibitório à sua geração quando é excretado pela bactéria na presença de um meio com concentração elevada de glicerol. Como havia uma concentração baixa de glicerol livre no meio líquido tendo em vista que uma grande parte foi consumida pela cultura pura, isso fez com que o composto intermediário não inibisse a geração do 1,3-propanodiol.

5.4.8 Rendimento da geração de H₂

O rendimento de H₂ obtido neste estudo foi calculado a partir da relação entre o Potencial Máximo de Produção de H₂ (P), proveniente da equação de Gompertz modificada e a concentração de glicerol que foi consumido ao longo dos ensaios (Tabela 5.20).

Tabela 5.20 - Rendimento da produção de H₂ (mol de H₂ mol⁻¹ de glicerol) para o ensaio envolvendo a cultura pura na condição de 100% de glicerol bruto pré-tratado

Ensaio	Rendimento (mol H ₂ mol ⁻¹ glicerol)
Ensaio cultura pura	0,13

A Tabela 5.21 compara alguns estudos referentes à bioconversão do glicerol bruto à H₂ utilizando-se a cultura pura *Enterobacter* sp. com o presente trabalho.

Tabela 5.21 - Estudo comparativo da bioconversão do glicerol bruto à H₂

Substrato	Inóculo	Glicerol inicial	Condições experimentais			Metabólitos finais	Rendimento	Ref.
			Temp. (°C)	pH	Reator em			
Glicerol bruto oriundo da produção de uma planta de produção de biodiesel	<i>Enterobacter aerogenes</i>	18,5 g L ⁻¹	37	6,8	Batelada	0,79 mol etanol mol ⁻¹ glicerol	0,84 mol H ₂ mol ⁻¹ glicerol	JITRWUNG et al., 2013
Glicerol bruto oriundo da produção do biodiesel a partir de óleo alimentar (45% glicerol; 15% metanol; pH 10,1)	<i>Enterobacter aerogenes</i>	9,9 g L ⁻¹	30	6,0	Batelada	0,88 mol etanol mol ⁻¹ glicerol	0,77 mol H ₂ mol ⁻¹ glicerol	SAKAI et al., 2007
Bioproduto da transesterificação do óleo de fritura usado para a produção de biodiesel (441,3 g L ⁻¹ glicerol; 230 g L ⁻¹ metanol; 10 g L ⁻¹ NaCl)	<i>Enterobacter aerogenes</i>	31,23 g L ⁻¹	37	8,14	Batelada	0,83 mol etanol mol ⁻¹ glicerol	0,12 mol H ₂ mol ⁻¹ glicerol	REUNGSANG et al. 2013
Glicerol bruto advindo óleos residuais domésticos	<i>Enterobacter</i> sp.	3,66 g L ⁻¹ (100% glicerol bruto)	37	7,0	Batelada	Ácido acético, etanol, ácido propiônico, propanol	0,13 mol H ₂ mol ⁻¹ glicerol	Presente estudo

Jitrwung e colaboradores (2013) realizaram um estudo para a otimização da concentração de sais presentes no meio de cultivo, KH₂PO₄, MgSO₄.7H₂O, CaCl₂.2H₂O e Na₂EDTA, a fim de se melhorar a produção de biohidrogênio do processo fermentativo do glicerol bruto, oriundo de uma planta de produção de biodiesel, envolvendo a cultura pura *Enterobacter aerogenes* ATCC 35029. Segundo este pesquisador, a presença destes sais ocasionou uma melhora significativa da geração de hidrogênio, além de ser reduzida a fase lag dos experimentos. Assim, como no presente estudo não foi utilizado nenhum sal adicional ao meio de cultivo, o rendimento obtido foi inferior ao do trabalho de Jitrwung. Porém, a utilização de componentes adicionais ao meio gera um encarecimento maior do que o método que foi utilizado no presente estudo com experimentos mais robustos e econômicos.

Sakai e colaboradores (2007) desenvolveram a geração simultânea de hidrogênio e etanol a partir do glicerol bruto, proveniente da produção de biodiesel, utilizando a cultura pura *Enterobacter aerogenes* NBRC12010 para este processo fermentativo em células bioeletroquímicas. O estudo da melhor condição para que se tivesse a produção máxima e simultânea de hidrogênio e etanol consistiu num valor de pH 6,0 para os experimentos realizados em batelada nos reatores eletroquímicos. Segundo Sakai e colaboradores, o sistema

bioeletroquímico converteu de forma eficaz os resíduos de glicerol a hidrogênio, etanol além de gerar eletricidade. Foi possível observar, por meio do rendimento obtido, que este tipo de sistema para a cultura pura conseguiu gerar de forma eficiente o biogás de interesse. Devido ao sistema mais robusto do presente trabalho, o rendimento alcançado foi inferior ao do estudo de Sakai, porém foi compatível com a metodologia utilizada para a realização deste presente estudo.

Na pesquisa desenvolvida por Reungsang e colaboradores (2013) foi estudada a capacidade da produção simultânea de hidrogênio e etanol a partir de glicerol bruto oriundo a produção de biodiesel a partir de óleo de fritura usado, envolvendo a cultura pura *Enterobacter aerogenes* KKU-S1. Por meio de ferramentas estatísticas foi possível otimizar os ensaios para a geração máxima simultânea de H₂ e etanol. Com isso, o rendimento obtido foi de 0,12 mol H₂ mol⁻¹ glicerol, valor próximo ao do presente estudo, sendo que para este último, foi utilizada uma concentração menor de glicerol (3,66 g L⁻¹) sob uma condição mais robusta proporcionando um resultado satisfatório quando comparado ao trabalho de Reungsang encontrado na literatura.

6 CONCLUSÕES

O glicerol bruto testado contém impurezas, que foram demonstradas durante a sua caracterização. Isto indica que o glicerol da planta piloto do Ibiotec possui grande parte de catalisador e reagentes acumulados, onde nem todos os componentes participaram de forma efetiva da reação de transesterificação, além do que esta quantidade de impurezas mostrou-se um grande desafio para a sua utilização como substrato durante a fermentação.

O pré-tratamento do glicerol bruto, que foi conduzido da forma mais simples e mais robusta possível, foi eficiente para o processo de geração de H_2 , separando as principais impurezas que poderiam ser nocivas à biomassa, como sabões e gorduras.

A realização do pré-tratamento dos inóculos foram eficientes, já que não foram detectadas as gerações de metano, implicando diretamente na eliminação das arqueias metanogênicas por meio do processo de pré-tratamento a quente. Assim foram obtidos com sucesso os consórcios de bactérias anaeróbias produtoras de hidrogênio.

Os resultados obtidos de rendimentos de geração de H_2 mais reduzidos nos ensaios com inóculo (II) e gerações mais elevadas de ácido acético, podem estar relacionados à presença de bactérias homoacetogênicas que consomem H_2 para gerar mais ácido acético. Além disso, as elevadas gerações de etanol nesses ensaios demonstraram que o H_2 pode ter sido requerido pelas moléculas de ácido acético geradas para formar etanol, numa reação termodinamicamente favorável.

A caracterização filogenética dos consórcios (I) e (II) possibilitou determinar a abundância relativa de cada Filo para as bactérias presentes nos consórcios. Assim, esses resultados foram condizentes com as análises posteriormente realizadas, onde para cada gênero de bactéria identificada, suas características tanto morfológicas quanto fisiológicas foram compatíveis ao que foi observado nos ensaios.

Os consórcios bacterianos se mostraram eficientes quanto à bioconversão do glicerol bruto pré-tratado à H_2 , gerando resultados de rendimentos equivalentes e até superiores aos encontrados na literatura.

Quanto ao uso da cultura pura na operação dos reatores anaeróbios em batelada na presença de 100% de glicerol bruto, este tipo de microrganismo se mostrou sensível à presença dos contaminantes encontrados no substrato. Sendo assim, isso refletiu diretamente na geração de hidrogênio e no rendimento deste biogás produzido.

De uma maneira geral foi demonstrado a possibilidade da manutenção da produção de biodiesel de uma forma sustentável, onde o grande co-produto gerado desse processo, o

glicerol bruto, foi usado com eficiência por microrganismos que fizeram o seu consumo ao mesmo tempo em que energia limpa foi gerada, sendo no referido caso, o hidrogênio.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Trabalhar com escalas maiores de reatores anaeróbios em batelada, visando um aumento da concentração do glicerol bruto nos ensaios de geração de hidrogênio, bem como avaliar o comportamento dos consórcios frente a uma concentração maior de resíduos.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. **Boletim mensal do biodiesel**. Rio de Janeiro, abr. 2016. 13 p. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/?pg=81532&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&1468960060980>>. Acesso em: 15 maio 2016.
- AHMADIAN, A.; EHN, M.; HOBER, S. Pyrosequencing: history, biochemistry and future. **Clinica Chimica Acta**, v. 363, n. 1/2, p. 83-94, Jan. 2006.
- AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. Official method Ca-2c-25, section C: moisture and volatile matter, air oven method. In: _____. **Official methods and recommended practices of AOCS**. 6th ed. Urbana, 2009.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; WATER ENVIRONMENT FEDERATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21th ed. Washington, DC, 2005.
- ANWAR, A.; GARFORTH, A. Challenges and opportunities of enhancing cold flow properties of biodiesel via heterogeneous catalysis. **Fuel**, v. 173, n. 1, p. 189-208, June 2016.
- AQUINO, S. F.; SILVA, S. Q.; CHERNICHARO, C. A. L. Considerações práticas sobre o teste de demanda química de oxigênio (DQO) aplicado à análise de efluentes anaeróbios. **Engenharia Sanitária Ambiental**, v. 11, n. 4, p. 295-304, out/dez 2006.
- ARIESYADY, H. D.; ITO, T.; OKABE, S. Functional bacterial and archeal community structures of major trophic groups in a full-scale anaerobic sludge digester. **Water Research**, v. 41, n. 7, p. 1554-1568, Apr. 2007.
- ARMOUGOM, F.; RAOULT, D. Exploring microbial diversity using 16S rRNA high-throughput methods. **Journal of Computer Science & Systems Biology**, v. 2, n. 1, p. 74-92, Feb. 2009.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6294**: óleos lubrificantes e aditivos: determinação de cinza sulfatada. Rio de Janeiro, 2008. 8 p.
- ASTM INTERNATIONAL. **D4017-02**: standard test method for water in paints and paint materials by the Karl Fischer titration method. West Conshohocken, 2015. 8 p.
- ATRIH A.; FOSTER S. J. Bacterial endospores the ultimate survivors. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 2/3, p. 217-223, 2002.
- BERGMANN, J. C.; TUPINAMBÁ, D. D.; COSTA, O. Y. A.; ALMEIDA, J. R. M.; BARRETO, C. C.; QUIRINO, B. F. Biodiesel production in Brazil and alternative biomass feedstocks. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 21, p. 411-420, May 2013.

BONDIOLI, P.; BELLA, D. L. An alternative spectrophotometric method for the determination of free glycerol biodiesel. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 107, n. 3, p. 153-157. Mar. 2005.

BOTTA, L. S. **Papel como fonte alternativa para produção anaeróbia de hidrogênio**. 2012. 138 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

BRASIL. Ministério da Ciência e Tecnologia. Portaria nº 702, de 30 de outubro de 2002. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 6 nov. 2002. Seção 1, p. 23. Disponível em: <<http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=06/11/2002&jornal=1&pagina=23&totalArquivos=88>> . Acesso em: 30 ago. 2015.

BRASIL. Ministério de Minas e Energia. **Programa nacional de produção e uso de biodiesel**. Brasília, DF. Disponível em: <<http://www.mme.gov.br/programas/biodiesel/menu/biodiesel/pnpb.html>> . Acesso em: 30 ago. 2015.

BRASIL. Presidência da República. Casa Civil. Lei nº 13.033, de 24 de setembro de 2014. Dispõe sobre a adição obrigatória de biodiesel ao óleo diesel comercializado com o consumidor final. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 25 set. 2014. Seção 1, p. 3. Disponível em: <<http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=25/09/2014&jornal=1&pagina=3&totalArquivos=120>> . Acesso em: 30 ago. 2015.

BRASIL. Presidência da República. Casa Civil. **Lei nº 13.263, de 23 de março de 2016**. Altera a Lei nº 13.033, de 24 de setembro de 2014, para dispor sobre os percentuais de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado no território nacional. Brasília, DF, 2016. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2015-2018/2016/Lei/L13263.htm> . Acesso em: 7 maio 2016.

BRENNER, D. J.; FARMER, J. J. Family I. Enterobacteriaceae Rahn 1937, Nom. Fam. Cons. Opin. 15, Jud. Comm. 1958a, 73; Ewing, Farmer, and Brenner 1980, 674; Judicial Commission 1981, 104. In: BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2nd ed. New York: Springer, 2005. v. 2, p. 587.

CAPORASO, J. G.; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F. D.; COSTELLO, E. K.; FIERER, N.; PEÑA, A. G.; GOODRICH, J. K.; GORDON, J. I.; HUTTLEY, G. A.; KELLEY, S. T.; KNIGHTS, D.; KOENIG, J. E.; LEY, R. E.; LOZUPONE, C. A.; McDONALD, D.; MUEGGE, B. D.; PIRRUNG, M.; REEDER, J.; SEVINSKY, J. R.; TURNBAUGH, P. J.; WALTERS, W. A.; WIDMANN, J.; YATSUENKO, T.; ZANEVELD, J.; KNIGHT, R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Methods**, v. 7, p. 335-336, May 2010.

CÉSAR, A. S.; BATALHA, M. O. Biodiesel in Brazil: history and relevant policies. **African Journal of Agricultural Research**, v. 5, n. 11, p. 1147-1153, June 2010.

CHI, Z.; PYLE, D.; WEN, Z.; FREAR, C.; CHEN, S. A laboratory study of producing docosahexaenoic acid from biodiesel-waste glycerol by microalgal fermentation. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 11, p. 1537-1545, Nov. 2007.

CHOOKAEW, T.; O-THONG, S.; PRASERTSAN, P. Biohydrogen production from crude glycerol by immobilized *Klebsiella* sp. TR17 in a UASB reactor and bacterial quantification under non-sterile conditions. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 18, p. 9580-9587, June 2014.

CHOOKAEW, T.; O-THONG, S.; PRASERTSAN, P. Biohydrogen production from crude glycerol by two stage of dark and photo fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, n. 24, p. 7433-7438, June 2015.

CHOOKAEW, T.; O-THONG, S.; PRASERTSAN, P. Fermentative production of hydrogen and soluble metabolites from crude glycerol of biodiesel plant by the newly isolated thermotolerant *Klebsiella pneumoniae* TR17. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 18, p. 13314-13322, Sept. 2012.

COLE, J. R. Q.; WANG, J. A.; FISH, B.; CHAI, D. M.; MCGARRELL, Y.; SUN, C. T.; BROWN, A.; PORRAS-ALFARO, A.; KUSKE, C. R.; TIEDJE, J. M. Ribosomal database project: data and tools for high throughput rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 1, p. D633-D642, 2013.

COSTA, J. B. **Produção biotecnológica de hidrogênio, etanol e outros produtos à partir do glicerol da reação de formação do biodiesel**. 2010. 84 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

CREMONEZ, P. A.; FEROLDI, M.; NADALETI, W. C.; ROSSI, E.; FEIDEN, A.; CAMARGO, M. P.; CREMONEZ, F. E.; KLAJN, F. F. Biodiesel production in Brazil: current scenario and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 42, p. 415-428, Feb. 2015.

DIYA'UDDEEN, B. H.; AZIZ, A. R. A.; DAUD, W. M. A. W.; CHAKRABARTI, M. H. Performance evaluation of biodiesel from used domestic waste oils: a review. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 9, n. 3, p. 164-179, May 2012.

DOI, Y.; IKEGAMI, Y. Pyruvate formate-lyase is essential for fumarate-independent anaerobic glycerol utilization in the *Enterococcus faecalis* strain W11. **Journal of Bacteriology**, v. 196, n. 13, p. 2472-2480, Apr. 2014.

DOUVANIS, A. S.; NTAIKOU, I.; LYBERATOS, G. Production of biohydrogen from crude glycerol in an upflow column bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 198, p. 701-708, Dec. 2015.

DROŹDŹYŃSKA, A.; LEJA, K.; CZACZYK, K. Biotechnological production of 1,3-propanediol from crude glycerol. **Journal of Biotechnological, Computational Biology and Bionanotechnology**, v. 92, n. 1, p. 92-100, 2011.

EDWARDS, R. A.; BRITO, B. R.; WEGLEY, L.; HAYNES, M.; BREITBART, M.; PETERSON, D. M.; SAAR, M. O.; ALEXANDER, S.; ALEXANDER, E.C. Jr.; ROHWER, F. Using pyrosequencing to shed light on deep mine microbial ecology. **BMC Genomics**, v. 7, n. 57, Mar. 2006. doi:10.1186/1471-2164-7-57.

ESPANA-GAMBOA, E.; MIJANGOS-CORTES, J.; BARAHONA-PEREZ, L.; DOMINGUEZ-MALDONADO, J.; HERNÁNDEZ-ZARATE, G.; ALZATE-GAVIRIA, L. Vinasses: characterization and treatments. **Waste Management & Research**, v. 29, n. 12, p. 1235-1250, 2011.

ETHIER, S.; WOISARD, K.; VAUGHAN, D.; WEN, Z. Continuous culture of the microalgae *Schizochytrium limacinum* on biodiesel-derived crude glycerol for producing docosahexaenoic acid. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 88-93, Jan. 2011.

EZAKI, T. Family VII. Peptostreptococcaceae. In: DE VOS, P.; GARRITY, G. M.; JONES, D.; KRIEG, N. R.; LUDWIG, W.; RAINEY, F. A.; SCHLEIFER, K.-H.; WHITMAN, W. B. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2nd ed. New York: Springer, 2009, v. 3, p. 1008.

FANG, H. H. P.; ZHANG, T.; LIU, H. Microbial diversity of a mesophilic hydrogen-producing sludge. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, n. 1, p. 112-118, Jan. 2002.

FAROOQ, M.; RAMLI, A.; SUBBARAO, D. Biodiesel production from waste cooking oil using bifunctional heterogeneous solid catalysts. **Journal of Cleaner Production**, v. 59, p. 131-140, Nov. 2013.

FORREST, A.; SIERRA, R.; HOLTZAPPLE, M. T. Effect of biodiesel glycerol type and fermentator configuration on mixed-acid fermentations. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 23, p. 9185-9189, Dec. 2010.

GARRITY, G. M.; BELL, J. A.; LILBURN, T. Class III. Gammaproteobacteria class.nov. In: BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2nd ed. New York: Springer, 2005, v. 2, p. 1.

GHIMIRE, A.; FRUNZO, L.; PIROZZI, F.; TRABLY, E.; ESCUDIE, R.; LENS, P. N. L.; ESPOSITO, G. A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: process parameters and use of by-products. **Applied Energy**, v. 144, p. 73-95, Apr. 2015.

GHOLAMI, Z.; ABDULLAH, A. Z.; LEE, K. T. Dealing with the surplus of glycerol production from biodiesel industry through catalytic upgrading to polyglycerols and other value-added products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 39, p. 327-341, Nov. 2014.

GOMES, S. D.; FUESS, L. T.; MAÑUNGA, T.; GOMES, P. C. F. L.; ZAIAT, M. Bacteriocins of lactic acid bacteria as a hindering factor for biohydrogen production from cassava flour wastewater in a continuous multiple tube reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 19, p. 8120-8131, May 2016.

GRIFFITHS, R. I.; WHITELEY, A. S.; O'DONNELL, A. G.; BAILEY, M. J. Rapid method for coextration of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA and rRNA-based microbial community composition. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5488-5491, Dec. 2000.

GUO, X. M.; TRABLY, E.; LATRILLE, E.; CARRÈRE, H.; STEYER, J. P. Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: a review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, n. 19, p. 10660-10673, Oct. 2010.

GUO, X.; WANG, C.; SUN, F.; ZHU, W.; WU, W. A comparison of microbial characteristics between the thermophilic and mesophilic anaerobic digesters exposed to elevated food waste loadings. **Bioresource Technology**, v. 152, p. 420-428, Jan. 2014.

GUPTA, A. R.; YADAV, S. V.; RATHOD, V. K. Enhancement in biodiesel production using waste cooking oil and calcium diglyceroxide as a heterogeneous catalyst in presence of ultrasound. **Fuel**, v. 158, p. 800-806, Oct. 2015.

HOSSEINI, S. E.; WAHID, M. A. Hydrogen production from renewable and sustainable energy resources: promising green energy carrier for clean development. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 57, p. 850-866, May 2016.

HU, S.; LUO, X.; WAN, C.; LI, Y. Characterization of crude glycerol from biodiesel plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 23, p. 5915-5925, May 2012.

HU, Z.; GRASSO, D. Water analysis: chemical oxygen demand. In: WORSFOLD, P.; TOWN SHEND, A.; POOLE, C. (Ed.). **Encyclopedia of analytical science**. 2nd ed. [S.l]: Elsevier, 2005. p. 325-330.

ILLUMINA. **An introduction to next-generation sequencing technology**. 2016. Disponível em: <http://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf>. Acesso em: 02 abr. 2016.

IM, W. Y.; KIM, D. H.; KIM, K. H.; KIM, M. S. Bacterial community analyses by pyrosequencing in dark fermentative H₂-producing reactor using organic wastes as a feedstock. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 10, p. 8330-8337, May 2012.

ITO, T.; NAKASHIMADA, Y.; SENBA, K.; MATSUI, T.; NISHIO, N. Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, n. 3, p. 260-265, Sept. 2005.

JITRWUNG, R.; VERRETT, J.; YARGEAU, V. Optimization of selected salts concentration for improved biohydrogen production from biodiesel-based glycerol using *Enterobacter aerogenes*. **Renewable Energy**, v. 50, p. 222-226, Feb. 2013.

KAPDAN, I. K.; KARGI, F. Bio-hydrogen production from waste materials. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 5, p. 569-582, Mar. 2006.

KIAKALAIEH, A. T.; AMIN, N. A. S.; MAZAHARI, H. A review on novel processes of biodiesel production from waste cooking oil. **Applied Energy**, v. 104, p. 683-710, Apr. 2013.

KIM, D. H.; KIM, M. S. Hydrogenases for biological hydrogen production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 18, p. 8423-8431, Sept. 2011.

KIVISTÖ, A.; SANTALA, V.; KARP, M. Hydrogen production from glycerol using halophilic fermentative bacteria. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 22, p. 8671-8677, Nov. 2010.

KRÖBER, M.; BEKEL, T.; DIAZ, N. N.; GOESMANN, A.; JAENICKE, S.; KRAUSE, L.; MILLER, D.; RUNTE, K. J.; VIEHÖVER, P.; PÜHLER, A.; SCHLÜTER, A. Phylogenetic characterization of a biogas plant microbial community integrating clone library 16S-rDNA sequences and metagenome sequence data obtained by 454-pyrosequencing. **Journal of Biotechnology**, v. 142, n. 1, p. 38-49, June 2009.

KUMAR, P.; SHARMA, R.; RAY, S.; MEHARIYA, S.; PATEL, S. K. S.; LEE, J. K.; KALIA, V. C. Dark fermentative bioconversion of glycerol to hydrogen by *Bacillus thuringiensis*. **Bioresource Technology**, v. 182, p. 383-388, Apr. 2015.

LAY, J.-J.; LI, Y.-Y.; NOIKE, T. Developments of bacterial population and methanogenic activity in a laboratory-scale landfill bioreactor. **Water Research**, v. 32, n. 12, p. 3673-3679, Dec. 1998a.

LAY, J.-J.; LI, Y.-Y.; NOIKE, T. Interaction between homoacetogens and methanogens in lake sediments. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 36, n. 5, p. 467-471, Aug. 1998b.

LEE, C. S.; AROUA, M. K.; DAUD, W. M. A. W.; COGNET, P.; LUCCHESI, Y. P.; FABRE, P. L.; REYNES, O.; LATAPIE, L. A review: conversion of bioglycerol into 1,3-propanediol via biological and chemical method. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 42, p. 963-972, Feb. 2015.

LI, C.; FANG, H. Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, n. 37, p. 1-39, Jan. 2007.

LIU, B.; CHRISTIANSEN, K.; PARNAS, R.; XU, Z.; LI, B. Optimizing the production of hydrogen and 1,3- propanediol in anaerobic fermentation of biodiesel glycerol. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 8, p. 3196-3205, Jan. 2013.

LIU, F.; FANG, B. Optimization of bio-hydrogen production from biodiesel wastes by *Klebsiella pneumoniae*. **Biotechnology Journal**, v. 2, n. 3, p. 374-380, Jan. 2007.

LO, Y. C.; CHEN, X. J.; HUANG, C. Y.; CHANG, J. S. Dark fermentative hydrogen production with crude glycerol from biodiesel industry using indigenous hydrogen-producing bacteria. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 35, p. 15815-15822, Nov. 2013.

LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H.; WHITMAN, W. B. Class I. Bacilli class.nov. In: DE VOS, P.; GARRITY, G. M.; JONES, D.; KRIEG, N. R.; LUDWIG, W.; RAINEY, F. A.; SCHLEIFER, K. H.; WHITMAN, W. B. (Ed.) . **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2nd ed. New York: Springer, 2009a. v. 3, p. 19-20.

LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H.; WHITMAN, W. B. Family IV. Enterococcaceae fam.nov. In: DE VOS, P.; GARRITY, G. M.; JONES, D.; KRIEG, N. R.; LUDWIG, W.; RAINEY, F. A.; SCHLEIFER, K. H.; WHITMAN, W. B. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2nd ed. New York: Springer, 2009b. v. 3, p. 594.

LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H.; WHITMAN, W. B. Order II. Lactobacillales ord.nov. In: DE VOS, P.; GARRITY, G. M.; JONES, D.; KRIEG, N. R.; LUDWIG, W.; RAINEY, F. A.; SCHLEIFER, K. H.; WHITMAN, W. B. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2nd ed. New York: Springer, 2009c. v. 3, p. 464.

LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H.; WHITMAN, W. B. Revised road map to the phylum *Firmicutes*. In: DE VOS, P.; GARRITY, G. M.; JONES, D.; KRIEG, N. R.; LUDWIG, W.; RAINEY, F. A.; SCHLEIFER, K. H.; WHITMAN, W. B. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2nd ed. New York: Springer, 2009d. v. 3, p. 1.

MAINTINGUER, S. I.; HATANAKA, R. R.; OLIVEIRA, J. E. de. Glycerol as a raw material for hydrogen production. In: BIERNAT, K. (Ed.). **Biofuels: status and perspective**. Rijeka: InTech, 2015. Chap. 22. doi: 10.5772/58662.

MAINTINGUER, S. I.; FERNANDES, B. S.; DUARTE, I. C. S.; SAAVEDRA, N. K.; ADORNO, M. A. T.; VARESCHE, M. B. Fermentative hydrogen production by microbial consortium. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 16, p. 4309-4317, Aug. 2008.

MAINTINGUER, S. I.; FERNANDES, B. S.; DUARTE, I. C. S.; SAAVEDRA, N. K.; ADORNO, M. A. T.; VARESCHE, M. B. A. Fermentative hydrogen production with xylose by *Clostridium* and *Klebsiella* species in anaerobic batch reactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 21, p. 13508-13517, Oct. 2011.

MAINTINGUER, S. I.; SAKAMOTO, I. K.; ADORNO, M. A. T.; VARESCHE, M. B. A. Bacterial diversity from environmental sample applied to bio-hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, n. 8, p. 3180-3190, Mar. 2015.

MANGAYIL, R.; KARP, M.; SANTALA, V. Bioconversion of crude glycerol from biodiesel production to hydrogen. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 17, p. 12198-12204, Sept. 2012.

MANGAYIL, R.; AHO, T.; KARP, M.; SANTALA, V. Improved bioconversion of crude glycerol to hydrogen by statistical optimization of media components. **Renewable Energy**, v. 75, p. 583-589, Mar. 2015.

MARBÁN, G.; VALDÉS-SÓLIS, T. Towards hydrogen economy? **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 32, n. 12, p. 1625-1637, Aug. 2007.

MARCHENKO, O. V.; SOLOMIN, S. V. The future energy: hydrogen versus electricity. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, n. 10, p. 3801-3805, Mar. 2015.

MARDIS, E. R. Next-generation DNA sequencing methods. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 9, p. 387-402, Sept. 2008.

MARU, B. T.; BIELEN, A. A. M.; CONSTANTÍ, M.; MEDINA, F.; KENGEN, S. W. M. Glycerol fermentation to hydrogen by *Thermotoga maritima*: proposed pathway and bioenergetic considerations. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 14, p. 5563-5572, May 2013.

MATHEWS, J.; WANG, G. Metabolic pathway engineering for enhanced biohydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 17, p. 7404-7416, Sept. 2009.

METSOVITI, M.; PARASKEVAIDI, K.; KOUTINAS, A.; ZENG, A. P.; PAPANIKOLAOU, S. Production of 1,3-propanediol, 2,3-butanediol and ethanol by a newly isolated *Klebsiella oxytoca* strain growing on biodiesel-derived glycerol based media. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 12, p. 1872-1882, Dec. 2012.

MORAES, B. S.; ZAIAT, M.; BONOMI, A. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil: challenges and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 44, p. 888-903, Apr. 2015.

NGO, T. A.; KIM, M. S.; SIM, S. J. High-yield biohydrogen production from biodiesel manufacturing waste by *Thermotoga neapolitana*. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 10, p. 5836-5842, May 2011.

NOIKE, T.; TAKABATAKE, H.; MIZUNO, O.; OHBA, M. Inhibition of hydrogen fermentation of organic wastes by lactic acid bacteria. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 27, n. 11/12, p. 1367-1371, Nov./Dec. 2002.

NTAIKOU, I.; ANTONOPOULOU, G.; LYBERATOS, G. Biohydrogen production from biomass and wastes via dark fermentation: a review. **Waste and Biomass Valorization**, v. 1, n. 1, p. 21-39, Mar. 2010.

OH, S. E.; GINKEL, S. V.; LOGAN, B. E. The relative effectiveness of pH control and heat treatment for enhancing biohydrogen gas production. **Environmental Science Technology**, v. 37, n. 22, p. 5186-5190, Oct. 2003.

ORGANISATION INTERNATIONALE DE LA VIGNE ET DU VIN. **International oenological codex**. Paris, 2016. Disponível em: <<http://www.oiv.int/public/medias/3318/codex-2016-en.pdf>>. Acesso em: 20 jul. 2016.

PACHAPUR, V. L.; SARMA, S. J.; BRAR, S. K.; BIHAN, Y. L.; BUELNA, G.; VERMA, M. Biohydrogen production by co-fermentation of crude glycerol and apple pomace hydrolysate using co-culture of *Enterobacter aerogenes* and *Clostridium butyricum*. **Bioresource Technology**, v. 193, p. 297-306, Oct. 2015a.

PACHAPUR, V. L.; SARMA, S. J.; BRAR, S. K.; BIHAN, Y. L.; BUELNA, G.; SOCCOL, C. R. Evidence of metabolic shift on hydrogen, ethanol and 1,3-propanediol production from crude glycerol by nitrogen sparging under micro-aerobic conditions using co-culture of *Enterobacter aerogenes* and *Clostridium butyricum*. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, p. 8669-8676, May 2015b.

PFLÜGL, S.; MARX, H.; MATTANOVICH, D.; SAUER, M. Heading for an economic industrial upgrading of crude glycerol from biodiesel production to 1,3-propanediol by *Lactobacillus diolivorans*. **Bioresource Technology**, v. 152, p. 499-504, Jan. 2014.

PINTO, A. C.; GUARIEIRO, L. L. N.; REZENDE, M. J. C.; RIBEIRO, N. M.; TORRES, E. A.; LOPES, W. A.; PEREIRA, P. A. P.; ANDRADE, J. B. Biodiesel: an overview. **Journal of the Brazilian Chemistry Society**, v. 16, n. 6, p. 1313-1330, Dec. 2005.

PYLE, D. J.; GARCIA, R. A.; WEN, Z. Producing docosahexaenoic acid (DHA)-rich algae from biodiesel-derived crude glycerol: effects of impurities on DHA production and algal biomass composition. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 56, n. 11, p. 3933-3939, June 2008.

RAINEY, F. A. Class II. Clostridia class. nov. In: DE VOS, P.; GARRITY, G. M.; JONES, D.; KRIEG, N. R.; LUDWIG, W.; RAINEY, F. A.; SCHLEIFER, K. H.; WHITMAN, W. B. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2nd ed. New York: Springer, 2009. v. 3, p. 736.

RAINEY, F. A.; HOLLEN, B. J.; SMALL, A. Genus I. Clostridium prazmowski 1880, 23^{AL}. In: DE VOS, P.; GARRITY, G. M.; JONES, D.; KRIEG, N. R.; LUDWIG, W.; RAINEY, F. A.; SCHLEIFER, K. H.; WHITMAN, W. B. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2nd ed. New York: Springer, 2009. v. 3, p. 738.

RATTI, R. P.; BOTTA, L. S.; SAKAMOTO, I. K. VARESCHE, M. B. A. Microbial diversity of hydrogen-producing bacteria in batch reactors fed with cellulose using leachate as inoculum. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 23, p. 9707-9717, Aug. 2013.

RATTI, R. P.; DELFORNO, T. P.; OKADA, D. Y.; VARESCHE, M. B. A. Bacterial communities in the thermophilic H₂-producing reactors investigated using 16S rRNA 454 pyrosequencing. **Microbiological Research**, v. 173, p. 10-17, Apr. 2015a.

RATTI, R. P.; DELFORNO, T. P.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B. A. Thermophilic hydrogen production from sugarcane bagasse pretreated by steam explosion and alkaline delignification. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, n. 19, p. 6296-6306, May 2015b.

REUNGSANG, A.; SITTIJUNDA, S.; ANGELIDAKI, I. Simultaneous production of hydrogen and ethanol from waste glycerol by *Enterobacter aerogenes* KCU-S1. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 4, p. 1813-1825, Feb. 2013.

RIBEIRO, M. C.; SOARES, M. M. S. R. **Microbiologia prática: roteiro e manual: bactérias e fungos**. Rio de Janeiro: Atheneu, 1993.

ROSSI, D. M.; COSTA, J. B. da; SOUZA, E. A. de; PERALBA, M. C. R.; SAMIOS, D.; AYUB, M. A. Z. Comparison of different pretreatment methods for hydrogen production using environmental microbial consortia on residual glycerol from biodiesel. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 8, p. 4814-4819, Apr. 2011.

SÁ, L. R. V.; CAMMAROTA, M. C.; FERREIRA-LEITÃO, V. S. Produção de hidrogênio via fermentação anaeróbia - aspectos gerais e possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais brasileiros. **Química Nova**, v. 37, n. 5, p. 857-867, abr. 2014.

SANAPAREDDY, N.; HAMP, T. J.; GONZALEZ, L. C.; HILGER, H. A.; FODOR, A. A.; CLINTON, S. M. Molecular diversity of a North Carolina wastewater treatment plant as revealed by pyrosequencing. **Applied Environmental Microbiology**, v. 75, n. 6, p. 1688-1696, Mar. 2009.

SANTORI, G.; NICOLA, G. D.; MOGLIE, M.; POLONARA, F. A review analyzing the industrial biodiesel production practice starting from vegetable oil refining. **Applied Energy**, v. 92, p. 109-132, Apr. 2012.

SANTOS, F. M. S. M. dos; SANTOS, F. A. C. M. dos. Combustível "hidrogênio". **Millenium**, n. 31, p. 252-270, 2005.

SARMA, S. J.; BRAR, S. K.; SYDNEY, E. B.; LE BIHAN, Y.; BUELNA, G.; SOCCOL, C. R. Microbial hydrogen production by bioconversion of crude glycerol: a review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 8, p. 6473-6490, Apr. 2012.

SARMA, S. J.; BRAR, S. K.; LE BIHAN, Y.; BUELNA, G. Bio-hydrogen production by biodiesel-derived crude glycerol bioconversion: a techno-economic evaluation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 36, n. 1, p. 1-10, Jan. 2013a.

SARMA, S. J.; BRAR, S. K.; LE BIHAN, Y.; BUELNA, G.; RABEB, L.; SOCCOL, C. R.; NACEUR, M.; RACHID, B. Evaluation of different supplementary nutrients for enhanced biohydrogen production by *Enterobacter aerogenes* NRRL B 407 using waste derived crude glycerol. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 5, p. 2191-2198, Feb. 2013b.

SARMA, S. J.; DHILLON, G. S.; BRAR, S. K.; BIHAN, Y. L.; BUELNA, G.; VERMA, M. Investigation of the effect of different crude glycerol components on hydrogen production by *Enterobacter aerogenes* NRRL B-407. **Renewable Energy**, v. 60, p. 566-571, Dec. 2013c.

SCHLEIFER, K. H. Phylum XIII. *Firmicutes* Gibbons and Murray 1978, 5 (*Firmicutes* [sic] Gibbons and Murray 1978, 5). In: DE VOS, P.; GARRITY, G. M.; JONES, D.; KRIEG, N. R.; LUDWIG, W.; RAINEY, F. A.; SCHLEIFER, K. H.; WHITMAN, W. B. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2nd ed. New York: Springer, 2009. v. 3, p. 19.

SEIFERT, K.; WALIGORSKA, M.; WOJTOWSKI, M.; LANIECKI, M. Hydrogen generation from glycerol in batch fermentation process. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 9, p. 3671-3678, May 2009.

SELEMBO, P. A.; PEREZ, J. M.; LLOYD, W. A.; LOGAN, B. E. Enhanced hydrogen and 1,3-propanediol production from glycerol by fermentation using mixed cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 104, n. 6, p. 1098-1106, Dec. 2009.

SEQUINEL, R. Caracterização físico-química da glicerina proveniente de usinas de biodiesel e determinação de metanol residual por CG com amostragem por *Headspace* estático. 2013. 103 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.

SINGH, S.; JAIN, S.; PS, V.; TIWARI, A. K.; NOUNI, M. R.; PANDEY, J. K.; GOEL, S. Hydrogen: a sustainable fuel for future of the transport sector. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 51, p. 623-633, Nov. 2015.

SIVAGURUNATHAN, P.; KUMAR, G.; PARK, J. H.; PARK, J. H.; PARK, H. D.; YOON, J. J.; KIM, S. H. Feasibility of enriched mixed cultures obtained by repeated batch transfer in continuous hydrogen fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 7, p. 4393-4403, Feb. 2016.

SPERLING, M. V. Características das águas residuárias. In: _____. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. 2. ed. Belo Horizonte: Minas Gerais, 1996. Cap. 2, p. 69-70.

SUZUKI, T.; SETA, K.; NISHIKAWA, C.; HARA, E.; SHIGENO, T.; NAKAJIMA-KAMBE, T. Improved ethanol tolerance and ethanol production from glycerol in a streptomycin-resistant *Klebsiella variicola* mutant obtained by ribosome engineering. **Bioresource Technology**, v. 176, p. 156-162, Jan. 2015.

SVEC, P.; DEVRIESE, L. A. Genus I. Enterococcus. In: DE VOS, P.; GARRITY, G. M.; JONES, D.; KRIEG, N. R.; LUDWIG, W.; RAINEY, F. A.; SCHLEIFER, K. H.; WHITMAN, W. B. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2nd ed. New York: Springer, 2009, v. 3, p. 594.

VALERIO, O.; HORVATH, T.; POND, C.; MISRA, M.; MOHANTY, A. Improved utilization of crude glycerol from biodiesel industries: synthesis and characterization of sustainable biobased polyesters. **Industrial Crops and Products**, v. 70, p. 141-147, Dec. 2015.

VARRONE, C.; GIUSSANI, B.; IZZO, G.; MASSINI, G.; MARONE, A.; SIGNORINI, A.; WANG, A. Statistical optimization of biohydrogen and ethanol production from crude glycerol by microbial mixed culture. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, p. 16479-16488, Mar. 2012.

VARRONE, C.; ROSA, S.; FIOCCHETTI, F.; GIUSSANI, B.; IZZO, G.; MASSINI, G.; MARONE, A.; SIGNORINI, A.; WANG, A. Enrichment of activated sludge for enhanced hydrogen production from crude glycerol. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 3, p. 1319-1331, Feb. 2013.

VIANA, M. B. **Produção de biogás a partir de glicerol oriundo de biodiesel**. 2011. 130 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

WIEGEL, J. Family I. Clostridiaceae. In: DE VOS, P.; GARRITY, G. M.; JONES, D.; KRIEG, N. R.; LUDWIG, W.; RAINEY, F. A.; SCHLEIFER, K. H.; WHITMAN, W. B. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2nd ed. New York: Springer, 2009, v. 3, p. 736.

WIRTH, R.; KOVÁCS, E.; MARÓTI, G.; BAGI, Z.; RÁKHELY, G.; KOVÁCS, K. L. Characterization of a biogas-producing microbial community by short-read next generation DNA sequencing. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 41, p. 1-16, June 2012.

XIE, X.; LIU, N.; YANG, B.; YU, C.; ZHANG, Q.; ZHENG, X.; XU, L.; LI, R.; LIU, J. Comparison of microbial community in hydrolysis acidification reactor depending on different structure dyes by Illumina MiSeq sequencing. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 111, p. 14-21, July 2016.

YAAKOB, Z.; MOHAMMAD, M.; ALHERBAWI, M.; ALAM, Z.; SOPIAN, K. Overview of the production of biodiesel from waste cooking oil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 18, p. 184-193, Feb. 2013.

ZHANG, A.; YANG, S. T. Propionic acid production from glycerol by metabolically engineered *Propionibacterium acidipropionici*. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 12, p. 1346-1351, Dec. 2009.

ZHANG, F.; ZHANG, Y.; CHEN, Y.; DAI, K.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M.; ZENG, R. J. Simultaneous production of acetate and methane from glycerol by selective enrichment of hydrogenotrophic methanogens in extreme-thermophilic (70°C) mixed culture fermentation. **Applied Energy**, v. 148, p. 326-333, June 2015.

ZHANG, X.; YUE, S.; ZHONG, H.; HUA, W.; CHEN, R.; CAO, Y.; ZHAO, L. A diverse bacterial community in an anoxic quinoline-degrading bioreactor determined by using pyrosequencing and clone library analysis. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 91, n. 2, p. 425-434, July 2011.

ZHOU, Y.; NIE, K. N.; ZHANG, X.; LIU, S.; WANG, M.; DENG, L.; WANG, F.; TAN, T. Production of fumaric acid from biodiesel-derived crude glycerol by *Rhizopus arrhizus*. **Bioresource Technology**, v. 163, p. 48-53, July 2014.

ZWIETERING, M. H.; JONGENBURGER, I.; ROMBOUTS, F. M.; RIET, K. V. Modeling of the bacterial growth curve. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1875-1881, June 1990.

ANEXO A- Obtenção das equações de crescimento microbiano

Tabela A.1 - Medidas de absorbância e massa seca de duplicata de reatores anaeróbios operados com 20 g L⁻¹ glicerol bruto pré-tratado com o inóculo (I).

ABS (600 nm)			MASSA SECA (Sólidos Totais Voláteis – g STV L ⁻¹)						
R1	R2	MÉDIA	R1			R2			MÉDIA
			ST	SFT	STV	ST	SFT	STV	STV
0,172	0,188	0,180	0,01396	0,00196	0,01200	0,01384	0,00187	0,01197	0,01199
0,358	0,388	0,373	0,01485	0,00200	0,01285	0,01492	0,00203	0,01289	0,01287
0,566	0,596	0,581	0,01586	0,00203	0,01383	0,01579	0,00206	0,01373	0,01378
0,712	0,744	0,728	0,01663	0,00216	0,01447	0,01674	0,00218	0,01456	0,01452
0,801	0,828	0,815	0,01706	0,00220	0,01486	0,01710	0,00222	0,01488	0,01487
0,928	0,912	0,920	0,01833	0,00299	0,01534	0,01847	0,00297	0,01550	0,01542

R1 e R2 – Duplicatas dos reatores

ST- sólidos totais = (P1-P0)/0,01, onde P0 é o peso da cápsula calcinada, P1 é o peso da cápsula com 10 mL de amostra deixada em estufa.

SFT – sólidos fixos totais = (P2-P0)/0,01, onde P2 é o peso da cápsula contendo a amostra calcinada.

STV – sólidos totais voláteis = (ST-SFT)

Figura A.1 – Obtenção da equação que relaciona absorbância e sólidos totais voláteis para reatores anaeróbios operados com o consórcio (I).

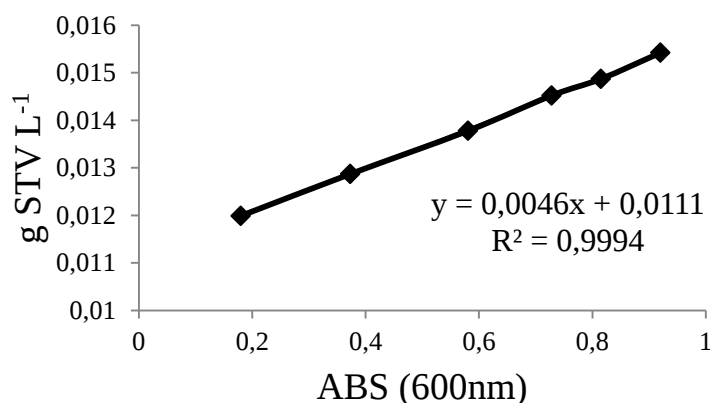


Tabela A.2 - Medidas de absorbância e massa seca de duplicata de reatores anaeróbios operados com 20 g L⁻¹ glicerol bruto pré-tratado com o inóculo (II).

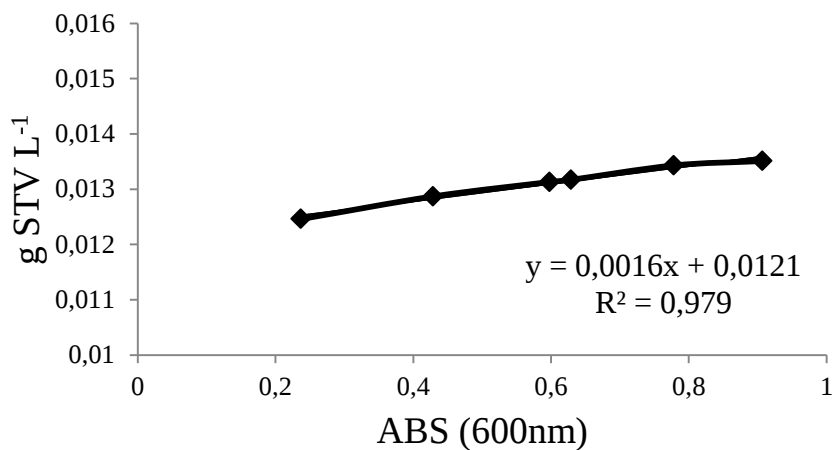
ABS (600 nm)			MASSA SECA (Sólidos Totais Voláteis – g STV L ⁻¹)						
R1	R2	MÉDIA	R1			R2			MÉDIA
			ST	SFT	STV	ST	SFT	STV	STV
0,242	0,231	0,237	0,01437	0,00195	0,01242	0,01442	0,00193	0,01249	0,01246
0,428	0,430	0,429	0,01488	0,00202	0,01286	0,01492	0,00204	0,01288	0,01287
0,593	0,602	0,598	0,01522	0,00208	0,01314	0,01521	0,00210	0,01311	0,01313
0,627	0,631	0,629	0,01530	0,00211	0,01319	0,01527	0,00213	0,01314	0,01317
0,784	0,771	0,778	0,01558	0,00217	0,01341	0,01562	0,00218	0,01344	0,01343
0,916	0,897	0,907	0,01570	0,00224	0,01346	0,01579	0,00224	0,01355	0,01351

R1 e R2 – Duplicatas dos reatores

ST- sólidos totais = (P1-P0)/0,01, onde P0 é o peso da cápsula calcinada, P1 é o peso da cápsula com 10 mL de amostra deixada em estufa.

SFT – sólidos fixos totais = $(P2-P0)/0,01$, onde P2 é o peso da cápsula contendo a amostra calcinada.
 STV – sólidos totais voláteis = $(ST-STF)$

Figura A.2 – Obtenção da equação que relaciona absorbância e sólidos totais voláteis para reatores anaeróbios operados com o consórcio (II).



ANEXO B- Obtenção da curva de hidrogênio

Temperatura ambiente = 294,00 K

Pressão ambiente = 703,30 mmHg

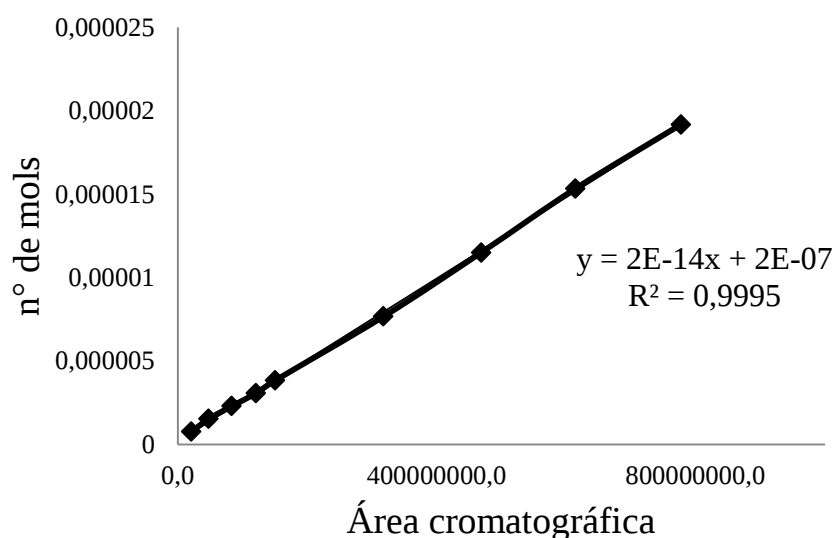
Constante dos gases = 62,36

$PV = nRT$

Tabela B.1 – Volumes de H₂ injetados e área cromatográfica obtida para curva de calibração de medidas de H₂ em cromatógrafo gasoso.

Volume de H ₂ (μL)	Área cromatográfica			Média da área cromatográfica	Nº de mols de H ₂
	R1	R2	R3		
20	21147259	23192256	18424976	20921497,0	7,6717E-07
40	46609777	52470742	45198231	48092916,7	1,53434E-06
60	81520104	81200932	88312599	83677878,3	2,30151E-06
80	131014402	116082747	115565608	120887585,7	3,06868E-06
100	149945777	150599854	150984684	150510105,0	3,83585E-06
200	316145532	322544444	315596179	318095385,0	7,6717E-06
300	464452634	473236709	469507264	469065535,7	1,15075E-05
400	611501192	618321577	614659557	614827442,0	1,53434E-05
500	760321810	807922739	764737773	777660774,0	1,91792E-05

R1, R2 e R3 – Triplicata das áreas cromatográficas

Figura B.1 – Obtenção da equação que relaciona n° de mols de H₂ com área cromatográfica.**ANEXO C- Determinação de ácidos e álcoois****Tabela C.1** – Equações das curvas de calibração e R²

y = fator de resposta

x = concentração (mg L⁻¹)

Ácido e álcoois	Equações das curvas de calibração (média entre as áreas das triplicatas)		R ²	
	Curva baixa	Curva alta	Curva baixa	Curva alta
Metanol	y=2506*x - 6399	y=3535*x - 230319	0,992	0,992
Etanol	y=9186*x - 16774	y=12700*x - 934693	0,995	0,981
Ácido acético	y=230*x - 2455	y=288*x - 26548	0,971	0,958
Isobutanol	y=53964*x + 35171	y=73949*x - 6000000	0,985	0,965
n-butanol	y=40171*x + 11793	y=68935*x - 7000000	0,987	0,959
Ácido propiônico	y=1341*x - 30418		0,999	
Ácido isobutírico	y=4481*x - 41925	y=7926*x - 499104	0,993	0,988
Ácido butírico	y=3151*x - 34828	y=6498*x - 446851	0,972	0,988
Ácido isovalérico	y=9073*x - 85443	y=19425*x - 2000000	0,981	0,979
Ácido valérico	y=7618*x - 70730	y=14171*x - 632725	0,976	0,969
Ácido capróico	y=18016*x - 113133	y=26822*x - 541770	0,975	0,997
Propanol	y=24849*x - 117926		0,9478	

Fator de resposta = área do ácido/área padrão interno

Padrão interno para álcoois = 1-butanol, 1-propanol, etanol, metanol.

Padrão interno para ácidos = ácido acético, butírico, capróico, crotônico, isobutírico, isovalérico, propiônico, valérico.

ANEXO D- Obtenção da curva de calibração para DQO

Tabela D.1 – Medidas de absorvância e concentração (mg L^{-1}) para a análise da curva de calibração de DQO, realizados em duplicata.

Concentrações (mg L^{-1})	Absorvâncias (620nm)		Média das absorvâncias
50	0,012	0,005	0,0085
150	0,022	0,025	0,0235
400	0,08	0,08	0,08
600	0,135	0,135	0,135
800	0,208	0,181	0,1945

Figura D.1 – Obtenção da curva de calibração de DQO.

