

Kamili Oliveira Santana

Reaproveitamento do glicerol bruto de usinas de biodiesel em
processos fermentativos de geração de H₂

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

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Sandra
Imaculada Maintinguer
Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Lorena
Oliveira Pires

Araraquara
2017

FICHA CATALOGRÁFICA

S231r Santana, Kamili Oliveira
Reaproveitamento do glicerol bruto de usinas de biodiesel em processos fermentativos de geração de H₂ / Kamili Oliveira Santana. – Araraquara : [s.n.], 2017
122 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Sandra Imaculada Maintinguer
Coorientador: Lorena Oliveira Pires

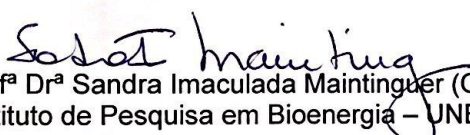
1. Hidrogênio. 2. Glicerina. 3. Fermentação. 4. Biodiesel. 5. Digestão anaeróbia. I. Título.

KAMILI OLIVEIRA SANTANA

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

Araraquara, 24 de fevereiro de 2017.

BANCA EXAMINADORA


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


Prof^a Dr^a Denise Bevilaqua
Instituto de Química – UNESP, Araraquara - SP


Prof^a Dr^a Maria Bernadete Amâncio Varesche
Escola de Engenharia – USP, São Carlos - SP

DADOS CURRICULARES

Nome: Kamili Oliveira Santana

Filiação Valdir José Santana e Elizabeth de Oliveira Santana

Nascimento 15/08/1992 – Mundo Novo/Ba - Brasil

Nome em citações bibliográficas:

Santana, K. O.; K.O. Santana; K. Santana ou Kamili Oliveira Santana; Oliveira Santana, Kamili.

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

Formação Acadêmica/Titulação

- 2015-2017** Mestrado em Biotecnologia
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP Araraquara, Brasil. Título: Reaproveitamento do glicerol bruto de usinas de biodiesel em processos fermentativos de geração de H₂.
Orientadora: Prof^a Dr^a. Sandra Imaculada Maintinguer
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Lorena Oliveira Pires
Bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).
Grande área: Química. Área: Bioenergia.
- 2010-2013** Graduação em Tecnologia em Biocombustíveis pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo.
Título: Imobilização de lipase em fibra de coco verde (Cocos nucifera) para produção de ésteres e suas vantagens econômicas.
Orientador: Prof^o. Dr^a. Claudia Regina Cançado Sgorlon Tininis.
Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Formação Complementar

- 2015-2015** Seminário Técnico de Cromatografia: HPLC - GC - PR. (Carga horária: 8h). ALLCROM, Brasil.
- 2013- 2013** Logística Básica. (Carga horária: 100h).
Serviço Nacional de Aprendizagem do Transporte, SENAT, Brasil.
- 2012- 2012** Curso de Atualização em Produção e Uso de B100. (Carga horária: 4h).
Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel, RBTB, Brasil.
- 2012- 2012** Planejamento fatorial aplicado à síntese de Biodiesel. (Carga horária: 20h).
Instituto Federal de São Paulo, IFSP, Brasil.

2011- 2011 RMN e outras técnicas analíticas. (Carga horária: 24h).
Instituto Militar de Engenharia, IME, Brasil.

Atuação profissional

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP

2015 - Atual Vínculo: Bolsista. Enquadramento funcional: Aluno de Mestrado.
Carga horária: 40. Regime: Integral

Analytical Technology

2012- 2012 Vínculo: Estagiário. Enquadramento funcional: Analista laboratorial.
Carga horária: 40. Regime: Integral

Instituto Federal de São Paulo – IFSP

2010 - 2013 Vínculo: Aluno de Graduação. Enquadramento funcional: Aluno de
Iniciação Científica. Carga horária: 20. Regime: Parcial

Projetos de pesquisa

2015- Atual Reaproveitamento do glicerol bruto de usinas de biodiesel em processos
fermentativos de geração de H₂
Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.

2011- 2013 Grupo de Pesquisa em Bioprocessos Industriais
Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.

2009- 2010 Grupo de Pesquisa Aplicada Relacionada à Cadeia Produtiva de
Combustíveis Renováveis
Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

RODRIGUES, C. V.; **SANTANA, K. O.**; NESPECA, M. G.; OLIVEIRA, J. E. de.;
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, p. 14641-14651, 2016.

SANTANA, K. O.; RODRIGUES, C. V. ; NESPECA, M. G. ; OLIVEIRA, J. E. de. ; PIRES,
L. O. ; MAINTINGUER, S. I. Produção biológica de gás hidrogênio a partir de glicerol bruto
e esgoto sanitário. Ciência & Tecnologia: Fatec-JB (Online), v. 8, p. 1, 2016.

RODRIGUES, C. V.; **SANTANA, K. O.**; NESPECA, M. G.; OLIVEIRA, J. E. de.; MAINTINGUER, S. I. Aplicação de glicerol bruto pré-tratado em processos biológicos de geração de H₂. *Ciência & Tecnologia: Fatec-JB (Online)*, v. 8, p. 1, 2016.

SANTANA, K. O.; TININIS, A. Biodiesel: mercado, tendências, panoramas e lacunas do setor industrial. *Sinergia (IFSP. Online)*, v. 14, p. 114-125, 2013.

Trabalhos completos publicados em anais de congressos

SANTANA, K. O.; RODRIGUES, C. V. ; CASTELBLANCO, M. N. ; PIRES, L. O. ; MAINTINGUER, S. I. Produção de hidrogênio e 1,3-PD por codigestão de glicerol bruto. In: 6º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel 9º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel, 2016, Natal. Biodiesel: 10 anos de pesquisa, desenvolvimento e inovação no Brasil, v. 1, p. 757-758, 2016.

SANTANA, K. O.; TREVIZANELLI, R. S. Avaliação da composição do óleo de *Elettaria cardamomum*. In: 8º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel, 2012, Salvador. Anais do 8º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel, 2012.

SANTANA, K. O.; SILVA, D. C. Avaliação do potencial de extração e da composição do óleo de espécies nativas do Nordeste. In: 8º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel, 2012, Salvador. Anais do 8º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel, 2012.

SANTANA, K. O.; TREVIZANELLI, R.S.; SGORLON, G.T. Avaliação da composição do óleo de *Pinus pinea* L. por cromatografia gasosa e espectrometria de massas. In: 8º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel, 2012, Salvador. Anais do 8º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel, 2012.

SANTANA, K. O.; TININIS, A. Teste de catálise enzimática utilizando *Yarrowia lipolytica* na síntese de biodiesel a partir de óleo reutilizado. In: 8º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel, 2012, Salvador. Anais do 8º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel, 2012.

SANTANA, K. O.; SGORLON, G. T.; NASCIMENTO, M. Avaliação do rendimento e da composição do óleo de *Moringa oleífera*. In: 8º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel, 2012, Salvador. Anais do 8º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel, 2012.

SANTANA, K. O.; NASCIMENTO, M.; SGORLON, G.T.; TININIS, A. Aplicação da fibra de coco no tratamento de óleo residual e avaliação do potencial em aplicações alternativas. In: 8º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel, 2012, Salvador. Anais do 8º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel, 2012.

Resumos expandidos publicados em anais de congressos

SANTANA, K. O.; RODRIGUES, C. V. ; PIRES, L. O. ; MAINTINGUER, S. I. Caracterização de glicerol bruto gerado a partir de óleo reciclado para geração de 1,3-propanodiol. In: Congresso de Iniciação Científica e Tecnológica do IFSP, 2016, Matão. Congresso de Inovação, Ciência e Tecnologia do IFSP, 2016.

RODRIGUES, C. V.; **SANTANA, K. O.;** de OLIVEIRA, J. E.; MAINTINGUER, S. I. Geração de biohidrogênio a partir de glicerol bruto utilizando consórcios de bactérias anaeróbias fermentativas e cultura pura *Enterobacter* sp. In: Congresso de Iniciação Científica e Tecnológica do IFSP, 2016, Matão. Congresso de Iniciação Científica e Tecnológica do IFSP, 2016.

SANTANA, K. O.; RODRIGUES, C. V.; CASTELBLANCO, M. N.; MAINTINGUER, S. I. Culturas mistas de bactérias anaeróbias geradoras de H₂ aplicadas no consumo de glicerol bruto gerado em usinas de biodiesel a partir de óleos residuais domésticos. In: Congresso de Inovação, Ciência e Tecnologia do IFSP, 2016, Matão. Congresso de Inovação, Ciência e Tecnologia do IFSP, 2016.

Resumos publicados em anais de congressos

SANTANA, K. O.; TININIS, A.; SGORLON, C. T. C. Avaliação da extração, síntese e caracterização de biodiesel *Jatropha curcas* com auxílio de quimiometria. In: 52º Congresso Brasileiro de Química. Associação Brasileira de Química. Recife, 2012.

Apresentações de Trabalho

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. 2016. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

SANTANA, K. O.; RODRIGUES, C. V.; NESPECA, M. G.; de OLIVEIRA, J. E. ; PIRES, L. O.; MAINTINGUER, S. I. Biological hydrogen production from raw glycerol and wastewater. 2016. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

SANTANA, K. O.; RODRIGUES, C. V.; CASTELBLANCO, M. N.; MAINTINGUER, S. I. Culturas mistas de bactérias anaeróbias geradoras de H₂ aplicadas no consumo de glicerol bruto gerado em usinas de biodiesel a partir de óleos residuais domésticos. 2016. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

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, 2016. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

SANTANA, K. O.; RODRIGUES, C. V ; PIRES, L. O.; MAINTINGUER, S. I. Caracterização de glicerol bruto gerado a partir de óleo reciclado para geração de 1,3-propanodiol. 2016. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

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).

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/Outra).

SANTANA, K. O.; SILVA, D. C. Avaliação do potencial de extração e da composição do óleo de espécies nativas do Nordeste, 2012. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

SANTANA, K. O.; TREVIZANELLI, R. S.; SGORLON, G. T. Avaliação da composição do óleo de *Pinus pinea* por cromatografia gasosa e espectrometria de massas, 2012. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

SANTANA, K. O.; SOUSA, S. R.; TININIS, A.; SGORLON, C. T. C . Teste de catálise enzimática utilizando *Yarrowia lipolytica* na síntese de biodiesel a partir de óleo reutilizado. 2012. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

SANTANA, K. O.; SGORLON, G. T.; NASCIMENTO, M. Avaliação do rendimento e da composição do óleo de *Moringa oleífera*. 2012. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

SANTANA, K. O.; SGORLON, G.T. ; TININIS, A. ; SGORLON, C.T.C ; Nascimento, M. . Aplicação da fibra de coco no tratamento de óleo residual e avaliação do potencial em aplicações alternativas. 2012. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

SANTANA, K. O.; SGORLON, G. T. Purificação da glicerina proveniente da produção de biodiesel usando adsorventes naturais, 2012. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

SANTANA, K. O.; SILVERIO, E. N. Transferência de tecnologia na produção de xilitol a partir do bagaço de cana-de-açúcar: avaliação da purificação do hidrolisado, 2011. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

SANTANA, K. O.; SANTOS, L. K. Avaliação da extração de óleo via soxhlet de *Pterodon polygalaeflorus*, 2011. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

MANSINI, L. H. A.; **SANTANA, K. O.**; SANTOS, L. K. Extração por solvente do óleo da oleaginosa cártamo (*Carthamus tinctorius*). 2011. (Apresentação de Trabalho/Seminário).

SANTOS, L. K.; **SANTANA, K. O.**; MANSINI, L. H. A. Extração do óleo da sucupira (*Pterodon polygalaeflorus Benth*), 2011. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).

MANSINI, L. H. A.; SILVERIO, E. N.; **SANTANA, K. O.** Avaliação de pré-tratamentos do bagaço de cana-de-açúcar para produção de bioetanol, 2011. (Apresentação de Trabalho/Outra).

SANTOS, L. K.; **SANTANA, K. O.**; MANSINI, L. H. A. Avaliação do hexano e do etanol na extração do óleo da *Pterodon polygalaeflorus*, 2011. (Apresentação de Trabalho/Outra).

SANTANA, K. O.; SANTOS, L. K. Avaliação da extração química via soxhlet de *Delonix*. 2011. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

SANTANA, K. O.; TININIS, C. S. C. T. Isolamento de levedura a partir de bagaço de cana – de-açúcar em diferentes estágios de processamento. 2011. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

AGRADECIMENTOS

Cada palavra escrita nesse texto possui a participação de pessoas que, citadas ou não aqui, fizeram parte de sua construção.

À minha estimada orientadora Profa. Dra. Sandra Imaculada Maintinguer e co-orientadora Profa. Dra. Lorena Oliveira Pires, guias intelectuais, pela confiança, pela excelente orientação, pela incansável paciência, inestimável competência e por me proporcionarem um dos bens mais valiosos: o conhecimento. “Feliz daquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina” (Cora Coralina).

À minha família. Aos meus pais Elizabeth e Valdir, e aos meus irmãos, Abner, Ana Carolina e Miguel, pela convivência, carinho e amor. Aos meus amigos, em especial Carol, e Natália pelo companheirismo e ajuda na rotina de laboratório. Obrigada pela descontração, companheirismo e por fazerem o local de trabalho um ambiente agradável. Weslei pela ajuda com as análises e dúvidas químicas. A Equipe CEMPEQC por ceder os laboratórios e materiais, possibilitando o bom andamento do projeto. Ana Paula, Elisa e Julio, colegas de Rio Claro que me receberam todas as vezes que precisei.

Menção honrosa à minha namorada e amiga Luise Vitória por sempre acreditar no que há de melhor em mim, por toda paciência e pelo amor dedicado.

Aos funcionários do Instituto de Química, em especial Marquinho e Zilda, por me socorrerem nos momentos mais inusitados.

Aos membros da banca de qualificação, Prof. Dr. Rodrigo Sequinel e Profa. Dra. Valeria Reginatto Spiller, que contribuíram com preciosas sugestões para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos especialistas, “anônimos”.

À CAPES pela bolsa de mestrado.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste projeto, muito obrigada.

Meus sinceros agradecimentos.



RESUMO

O glicerol bruto é um coproduto formado em volumes elevados na produção do biodiesel pela rota de transesterificação (cerca de 10% do volume total). Quando utilizado na forma bruta (baixo grau de pureza) é uma matéria-prima barata e renovável, podendo ser utilizada na produção de energia limpa, como na geração de H_2 . Entretanto, esse resíduo geralmente apresenta concentrações elevadas de sabões e metanol advindos do processo de obtenção do biodiesel. Devido a isto, o glicerol bruto foi codigerido com esgoto sanitário doméstico como estratégia para melhorar o rendimento de H_2 , fornecer nutrientes e diluir compostos potencialmente inibitórios. Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi avaliar a geração de H_2 , Ácidos Graxos Voláteis (AGV's) e álcoois em reatores anaeróbios em batelada utilizando glicerol bruto, sem a aplicação de meio de cultivo sintético. Foram utilizados consórcios de bactérias geradoras de H_2 provenientes de sistemas biológicos de tratamento de resíduo de avícola. O glicerol utilizado nos experimentos foi obtido a partir de transesterificação do óleo de cozinha doméstico reciclado, e, devido a isto, suas características físico-químicas representaram um grande desafio, uma vez que possuía contaminantes em concentrações elevadas, incluindo sabões e metanol. Previamente foi realizada a caracterização do glicerol. Os reatores foram alimentados com glicerol bruto diluído em esgoto sanitário nas seguintes concentrações (g DQO L^{-1}): 20, 40, 60, 80, 160, 240 e 320. A geração de H_2 foi acompanhada por sistema de deslocamento de volume. Foram avaliadas a remoção da Demanda Química de Oxigênio (DQO) e o consumo do glicerol, além da análise morfológica e o plaqueamento dos consórcios de bactérias geradoras de H_2 no final dos ensaios. A geração de H_2 ocorreu em todos os reatores, no entanto, para cargas orgânicas mais elevadas foram observados menores rendimento de H_2 . Em contrapartida, a remoção da DQO aumentou com o aumento da carga orgânica aplicada, assim como as taxas de consumo de glicerol livre. Também ocorreu a mudança no perfil dos produtos orgânicos formados, passando da predominância de ácido butírico para ácido acético. Não foi detectada a presença CH_4 nos reatores. Nas contagens das culturas por plaqueamento foram verificadas colônias de bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* sp. e *Clostridium* sp.

Palavras-chave: Codigestão. Fermentação. Consórcio microbiano. 1,3-propanodiol. Esgoto sanitário.

ABSTRACT

Raw glycerol is a co-product formed at high volumes in biodiesel production by the transesterification route (about 10% of the total volume). When used in crude form (low purity) is a cheap and renewable raw material, and can be used in the production of clean energy, as in H₂ generation. However, this residue usually presents high concentrations of soaps and methanol coming from the process of obtaining the biodiesel. Because of this, crude glycerol was co-digested with household sanitary sewage as a strategy to improve H₂ yield, provide nutrients and dilute potentially inhibitory compounds. In this sense, the objective of this work was to evaluate the generation of H₂, Volatile Fatty Acids (VFA) and alcohols in anaerobic reactors in batch using crude glycerol, without the application of synthetic culture medium. Consortia of H₂-generating bacteria from biological systems of treatment of poultry residue were used. The glycerol used in the experiments was obtained from transesterification of recycled cooking oil, and due to this, its physico-chemical characteristics presented a great challenge, since it had contaminants in high concentrations, including soaps and methanol. The characterization of glycerol was previously performed. The reactors were operated with crude glycerol diluted in sanitary sewage in the following concentrations (g COD L⁻¹): 20, 40, 60, 80, 160, 240 and 320. The removal of the Chemical Oxygen Demand (COD) and the consumption of glycerol were evaluated, as well as the morphological analysis and the plating of the consortia of bacteria generating H₂. The H₂ generation occurred in all reactors, however, for higher organic loads, lower H₂ yields were observed. On the other hand, the removal of COD increased with the increase of the applied organic load, as well as the rates of consumption of free glycerol. There was also a change in the profile of the organic products formed, from the predominance of butyric acid to acetic acid. No CH₄ presence was detected in the reactors. In the counts of the cultures by plating were verified colonies of bacteria belonging to the genus *Lactobacillus* sp. and *Clostridium* sp.

Keywords: Co-digestion. Fermentation. Microbial consortium. 1,3-propanediol. Sanitary sewage.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Reação de transesterificação de triacilglicerídeos	21
Figura 2 - <i>Commodities</i> químicas produzidas a partir do glicerol.....	23
Figura 3 - Via metabólica de por <i>Clostridium</i> sp. na digestão anaeróbia de diferentes substratos.....	31
Figura 4 - Perfil típico da dinâmica dentro das fermentações com geração de H ₂	34
Figura 5 - Produção de AGV's derivados de resíduos e algumas aplicações.....	41
Figura 6 - Síntese química de 1,3-PD	42
Figura 7 - Vias bioquímicas de fermentação de glicerol	43
Figura 8 - Esquema de montagem e operação dos reatores	54
Figura 9 - Sistema de medição volumétrica para quantificação do H ₂ gerado	56
Figura 10 - Plaqueamento em meio de cultivo específico em jarra de anaerobiose	59
Figura 11 - Produção acumulada temporal de H ₂ (nº mmol H ₂ L ⁻¹)	68
Figura 12 - Comportamento da geração de H ₂ através da função Gompertz modificada nos ensaios: a) 20 g DQO L ⁻¹ , b) 40 g DQO L ⁻¹ , c) 60 g DQO L ⁻¹ , d) 80 g DQO L ⁻¹ , e) 160 g DQO L ⁻¹ , f) 240 g DQO L ⁻¹ , g) 320 g DQO L ⁻¹	70
Figura 13 - Metabólitos gerados ao final da operação dos reatores	77
Figura 14 - Produção da 1,3-PD e ácido acético em função do aumento da carga orgânica	83
Figura 15 - Microscopia óptica de amostra do reator de reativação utilizando coloração de Gram.....	85
Figura 16 - Concentração celular de <i>Lactobacillus</i> sp. e <i>Clostridium</i> sp. após crescimento de colônias em meio específico	86
Figura 17 - Imagem das placas contendo meio Neomicina Nagler (NN), específico para o crescimento de bactérias do gênero <i>Clostridium</i> sp.	88
Figura 18 - Imagem das placas contendo meio Desoxicolato Sulfeto de Hidrogênio Lactose (DHL) específico para o crescimento de bactérias do gênero <i>Enterobacter</i> sp.	88
Figura 19 - Imagem das placas contendo meio Lactobacilli Selectivo (LBS) específico para o crescimento de bactérias do gênero <i>Lactobacillus</i> sp.	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação entre fermentação, foto-fermentação e digestão anaeróbia	27
Tabela 2 - Rendimentos estequiométricos de H_2 por conteúdo de monômeros dentro da fermentação	33
Tabela 3 - Reações de consumo de H_2 e suas respectivas energias livres de Gibb sob condições de 25 °C, 1 M, 1 bar	39
Tabela 4 - Valores teóricos de produção de CO_2 , quantidade de NaOH necessária para reter todo o CO_2 potencialmente produzido durante cada ensaio e a quantidade utilizada para montagem dos ensaios	55
Tabela 5 - Caracterização do glicerol bruto utilizado para produção de H_2	60
Tabela 6 - Resultados dos ensaios realizados na caracterização do esgoto sanitário utilizado para produção de H_2	63
Tabela 7 - Quantificação do glicerol livre durante operação dos reatores	64
Tabela 8 - Quantificação da DQO durante a operação dos reatores anaeróbios	65
Tabela 9 - Valores acumulados da produção de H_2	66
Tabela 10 - Dados da cinética da geração de H_2 a partir do modelo de Gompertz	69
Tabela 11 - Análise comparativa da geração de H_2 a partir de glicerol em relação à literatura	72
Tabela 12 - Valores de pH ao final da operação dos respectivos reatores	75
Tabela 13 - Produção acumulada de compostos orgânicos no meio líquido	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1,3-PD 1,3-propanodiol

ACÁCIA Cooperativa de Catadores de Materiais Recicláveis

AGL Ácidos Graxos Livres

ANP Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis

AOCS *American Oil Chemists' Society*

ASTM *American Society for Testing and Materials*

DQO Demanda Química de Oxigênio

FID Detector de Ionização por Chama

LA Ácido Linoleico

MONG Matéria Orgânica Não Glicerol

PYG *Peptone Yeast Glycose*

SV Sólidos Voláteis

TCD Detector de Condutividade Térmica

TOGA *Transformer Oil Gas Analyser*

UASB *Upflow Anaerobic Sludge Blanket*

UFC Unidade Formadora de Colônia

UNIARA Centro Universitário de Araraquara- SP

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 O biodiesel.....	20
2.2 Óleos reciclados	21
2.3 O glicerol.....	22
2.4 Esgoto sanitário.....	24
2.5 Aspectos gerais da digestão anaeróbia.....	24
2.6 Codigestão.....	27
2.7 Produção biológica de H ₂	29
2.7.1 Produção biológica de H ₂ por digestão anaeróbia	30
2.7.2 Acúmulo de metabólitos intermediários	35
2.7.3 Consórcios microbianos.....	37
2.7.4 Produção biológica de H ₂ e processos convencionais	40
2.8 O 1,3-propanodiol	41
3 OBJETIVOS.....	46
3.1 Objetivo Geral.....	46
3.2 Objetivos Específicos	46
4 MATERIAL E MÉTODOS	47
4.1 Amostras de glicerol	47
4.2 Amostras de esgoto sanitário	47
4.3 Caracterização do glicerol bruto e esgoto sanitário	47
4.3.1 Demanda Química de Oxigênio (DQO)	48
4.3.2 pH a 10%.....	48
4.3.3 Glicerol livre	48
4.3.4 Umidade e materiais voláteis	49
4.3.5 Água.....	49
4.3.6 Sabões.....	49
4.3.7 Cinzas	50
4.3.8 Metanol	50
4.3.9 Matéria Orgânica Não Glicerínica (MONG)	51
4.3.10 Sólidos totais.....	52
4.4 Ensaios para produção biológica de H ₂ em reatores anaeróbios em batelada	53
4.4.1 Testes preliminares	53
4.4.2 Montagem dos reatores	53
4.4.3 Sistema de medição volumétrica de H ₂	54
4.4.4 Equação de Gompertz	56
4.5 Análises físico-químicas	57
4.5.1 Análise qualitativa do biogás	57
4.5.2 Quantificação do 1,3-PD.....	57
4.5.3 Quantificação dos compostos orgânicos	58
4.6 Microscopia	58
4.7 Quantificação de culturas anaeróbicas por plaqueamento	58
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
5.1 Caracterização do glicerol.....	60
5.2 Caracterização do esgoto sanitário.....	63
5.3 Ensaios de produção de H ₂	63
5.3.1 Testes preliminares	63
5.3.2 Consumo do glicerol.....	64

5.3.3 Remoção da DQO	65
5.3.4 Geração de H ₂	65
5.3.5 Cinética da produção de H ₂	68
5.3.6 pH	75
5.3.7 Perfil dos compostos orgânicos formados	76
5.3.8 Geração do 1,3-PD	82
5.4 Caracterização do consórcio	84
5.4.1 Microscopia	84
5.4.2 Plaqueamento	85
6 CONCLUSÕES	90
7 PESPECTIVAS FUTURAS	91
REFERÊNCIAS	92
ANEXO A - Determinação de Ácidos e Alcoóis por GC/FID	108
ANEXO B- Curva de calibração para análise da DQO	110
ANEXO C- Procedimento para realização da análise de glicerol livre	111
ANEXO D - Protocolo para contagem em placas	115

1 INTRODUÇÃO

Com o desenvolvimento da economia global ocorre a maior exploração dos recursos naturais para produção de bens e serviços. Nas últimas décadas esse cenário acarretou a intensificação dos debates acerca das questões ambientais e os conceitos de sustentabilidade, além de impulsionarem a mudança mundial das matrizes energéticas, principalmente com a substituição dos combustíveis fósseis.

No Brasil, um dos reflexos dessa tendência foi a criação da Lei nº 11.097 de 13 de janeiro de 2005, que introduziu o biodiesel na matriz energética brasileira como um substituto parcial do diesel fóssil comercial. A partir daí foram criados parâmetros quanto ao controle da qualidade a serem atendidos pelos diversos agentes econômicos responsáveis pela comercialização do biodiesel em território nacional. A Resolução da Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, nº 45, de 25 de agosto de 2014, além de dispor desses parâmetros, definiu o biodiesel como combustível composto por alquil ésteres de ácidos carboxílicos de cadeia longa, obtido a partir da reação de transesterificação ou esterificação de matérias graxas, de origem vegetal ou animal.

Após a transesterificação são formados os ésteres (biodiesel) e o glicerol. A proporção biodiesel:glicerol é aproximadamente 9:1. Com desenvolvimento da indústria do biodiesel, ocorreram mudanças na dinâmica do mercado do glicerol, que se tornou um excedente. Diferentemente ao que ocorre com a maioria dos processos industriais, a oferta do glicerol não é determinada pela sua demanda, mas pela demanda global de processos onde ele é gerado, como na produção de sabões, detergentes, e, mais recentemente, o biodiesel. Considerando que em 2014 a produção de biodiesel foi de 4,2 bilhões de litros, estima-se a geração de 467 milhões de litros de glicerol pelas usinas (YANG; HANNA; SUN, 2012). No Brasil, a indústria do biodiesel foi responsável pela produção de cerca de 350 mil toneladas de glicerol em 2013, sendo 40 mil destinadas ao mercado interno e o excesso exportado para países como a China, que importou por volta de 230 toneladas de glicerol em 2014 (SCHWENGBER et al., 2016).

Álcoois alifáticos de cadeia curta (principalmente metanol) e catalisador alcalino (como NaOH ou KOH) são utilizados no processo de produção de biodiesel e também acabam fazendo parte da composição do glicerol bruto ao final da reação. Embora a maior parte das impurezas possam ser removidas, os tratamentos são dispendiosos e representam um obstáculo para a aplicação do glicerol bruto. Em sua forma purificada possui um valor de

mercado elevado e mais de 2000 aplicações industriais (SILES LÓPEZ et al., 2009). No entanto, a maior parte dessas aplicações exige um elevado grau de pureza, sendo necessário um investimento financeiro, o que nem sempre é uma opção viável para o produtor. Por outro lado, o glicerol bruto (resíduo) também apresenta grandes oportunidades para novas aplicações e vem ganhando atenção devido a seu preço. A glicerina loira é o glicerol de maior pureza que o glicerol bruto, contendo aproximadamente 75% de glicerol livre, cloretos (máx. 10 ppm), cinzas (máx. 10%), resíduos orgânicos (máx. 3%), álcalis (máx. 0,4%) e umidade (máx. 10%), atualmente é cotada a R\$ 650,00/tonelada e o glicerol bruto, com pureza abaixo de 30%, em R\$ 220,00/tonelada (CENTRO DE REFERÊNCIA DA CADEIA DE BIOCOMBUSTÍVEIS PARA AGRICULTURA FAMILIAR, 2016).

A aplicação do glicerol na síntese de produtos de maior valor agregado vem sendo bastante investigada dentro de processos biotecnológicos, nos quais é possível utilizá-lo na forma bruta, representando uma alternativa promissora para sua gestão eficaz (CHATZIFRAGKOU; PAPANIKOLAOU, 2012).

Diversos processos para aplicação do glicerol são descritos na literatura, como a combustão, a compostagem, a digestão anaeróbia e processos de conversão termo-químico biológicos, sendo que a fermentação ganha bastante atenção devido à vasta gama de produtos gerados como etanol, ácidos orgânicos, H_2 , dentre outros, sem geração de subprodutos tóxicos.

O H_2 é considerado uma alternativa ideal para combustíveis fósseis devido à sua elevada densidade de energia por massa (142 kJ/g) e por ter uma combustão limpa, formando apenas H_2O (XIA et al., 2015). Cerca de 40% da produção mundial de H_2 é obtido a partir de gases naturais, 30% a partir de óleo diesel e nafta, 18% a partir do carvão, 4% a partir de eletrólise e cerca de 1% a partir de biomassa. Dentro desse cenário, os processos biológicos de geração de H_2 ganham cada vez mais importância pois utilizam energia e recursos renováveis, além de temperatura amenas e pressão atmosférica (SINHA; PANDEY, 2011). Os rendimentos de H_2 utilizando glicerol como fonte de carbono são maiores que nos processos que utilizam açúcares, graças ao elevado grau de redução dos átomos de carbono (TRCHOUNIAN; TRCHOUNIAN, 2015). Apesar disso, os efeitos das impurezas contidas no glicerol afetam a resposta bioquímica dos microrganismos, tornando sua utilização um grande desafio dentro desses processos, podendo limitar os rendimentos (MU et al., 2006; SAMUL; LEJA; GRAJEK, 2014).

A presença de metanol, sabões e outros constituintes do resíduo contribuem para a instabilidade e falha dos processos biológicos (UPRETY; DALLI; RAKSHIT, 2017). Além

disso, o glicerol ainda apresenta concentrações elevadas de carbono (aproximadamente 1500 g L⁻¹), elevada viscosidade e baixa concentração de sais minerais, fontes de nitrogênio e vitaminas, além de apresentar elevada viscosidade (SANTOS et al., 2013; CHI et al., 2007), inviabilizando o seu consumo “*in natura*” por microrganismos. A codigestão apresenta-se como uma alternativa para sua digestão, na qual o resíduo pode ser diluído em misturas adequadas de cosubstratos, como esgoto sanitário ou água residuária.

Processos de produção biológica de H₂ utilizando matérias-primas mais baratas são mais eficientes e aumentam a competitividade desses processos. Em comparação com os processos convencionais e já bem estabelecidos de produção de H₂, a codigestão apresenta maior simplicidade, menor necessidade de energia, taxas elevadas de produção e a possibilidade de aplicação de resíduos como substrato. Sendo assim, o objetivo do trabalho foi avaliar a geração de H₂ utilizando um consórcio de bactérias anaeróbias a partir de misturas de glicerol bruto formado na produção de biodiesel combinado com esgoto sanitário em reatores anaeróbios em batelada, mantidos à 30° C, sem utilização de meio de cultivo sintético, evitando custos adicionais no processo proposto. Para tanto, foi utilizado consórcio de bactérias anaeróbias de lodo granular metanogênico obtido após pré-tratamento térmico.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O biodiesel

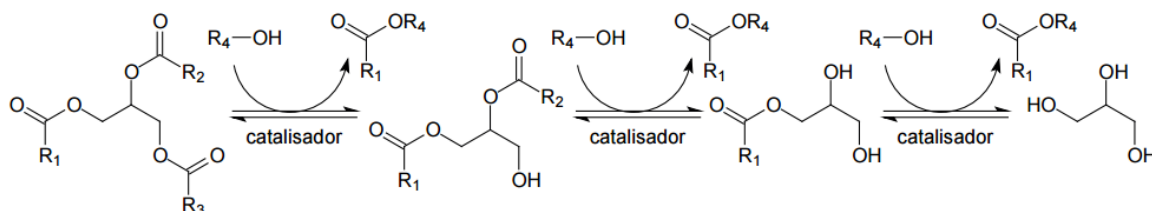
Biodiesel é um biocombustível já consolidado como uma fonte de energia na matriz energética brasileira. Enquanto os derivados da cana perderam cerca de 13% da participação na matriz, o biodiesel apresentou crescimento de 175% entre os anos de 2008 e 2015 (PARENTE JUNIOR, 2016).

No ano de 2004, o Governo Federal instituiu o “Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel” que previa a adição do biodiesel ao diesel comercial. Atualmente, a Lei nº 13.033, de 24 de novembro de 2014 prevê a adição obrigatória de 10% até 2019, como uma estratégia econômica, visando melhorar a qualidade ambiental e promover o progresso social com o fortalecimento dos programas de agricultura familiar e geração de emprego e renda. A iniciativa também visa cumprir as metas internacionais de redução das emissões de gases de efeito estufa (GEE). Segundo informações do Ministério do Meio Ambiente, a medida permitirá uma diminuição nas emissões de 48 a 60 milhões de toneladas de CO₂ até 2020 (ANTUNES, 2016).

Sua produção nacional reduziu a importação de diesel em 30%, representando um *superavit* de R\$ 2,6 bilhões. Além disso, o impulso da produção do biodiesel equilibrou a oferta de óleo vegetal no país com o descolamento entre a crescente demanda por farelo e a moderada demanda por óleo, ocorrendo fenômeno parecido dentro do mercado de carnes com a gordura animal (PARENTE JUNIOR, 2016).

O biodiesel pode ser obtido a partir de vários processos, mas a transesterificação (alcoolise de triacilglicerídeos) é o método mais utilizado comercialmente. Consiste numa reação entre matérias-primas graxas (ex: uma molécula de triacilglicerídeo) com 3 moléculas de um álcool primário (frequentemente etanol ou metanol) catalisada com uma base forte, onde são geradas 3 moléculas de ésteres alquílicos e uma glicerol (APPLEBY, 2006). A base reage com o hidrogênio do álcool primário, formando um intermediário alcoóxido, um nucleofílico que ataca o carbono da ligação carboxila (C=O) do triacilglicerídeo. Monoglicérideos e diglicérideos são intermediários dentro da reação de transesterificação, que ocorre em 3 etapas reversíveis que atinge conversões acima de 95% (SUAREZ et al., 2007) (Figura 1).

Figura 1 - Reação de transesterificação de triacilglicerídeos



Fonte: Suarez et al., 2007.

O glicerol é separado da fração de ésteres resultantes (biodiesel), correspondendo a aproximadamente 10% do volume de biodiesel produzido (MOTA; SILVA; GONÇALVES, 2009). Comumente apresenta coloração escura e quantidades variáveis de sabão, catalisador, álcool, monoacilglicerídeos, diacilglicerídeos, triacilglicerídeos, polímeros, água e ésteres (SCHWENGBER et al., 2016).

2.2 Óleos reciclados

Segundo relatório lançado pela Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo (SABESP), o Brasil produz aproximadamente 6,1 bilhões de litros de óleos vegetais anualmente, 1/3 utilizado para fins comestíveis. O consumo *per capita* é por volta de 20 litros/ano, resultando em 3 bilhões de litros de óleos, sendo que apenas de 2,5 a 3,5% desse total é reciclado. Apesar da elevada disponibilidade, óleos vegetais reciclados, sebo e outras matérias primas com teor elevado de ácidos graxos livres resultam num glicerol de qualidade inferior, por conterem uma quantidade maior de contaminantes que não são retirados em processos de refino (APPLEBY, 2006).

O óleo de fritura/residual apresenta uma coloração escura, maior viscosidade e acidez, decorrentes da exposição às temperaturas elevadas (SANIBAL; MANCINI-FILHO, 2002). Tais características, associadas ao uso de catalisadores alcalinos, propiciam a formação de sabões e ácidos graxos na fase glicerínica, tornando o glicerol mais impuro e com índices de contaminantes elevados, restringindo sua aplicação (BEATRIZ; YARA; LIMA, 2011).

Óleos refinados resultam em um glicerol de pureza mais elevada, no entanto possuem valor de aquisição elevado. O preço do biodiesel depende principalmente da disponibilidade da matéria-prima, desta forma, apesar dos inconvenientes, os óleos reciclados são uma

alternativa economicamente atraente já que possuem baixo custo de aquisição e representam fonte de geração de emprego e renda. Além disso, o uso desses óleos é uma maneira sustentável de destinar os óleos residuais (FREITAS, 2008).

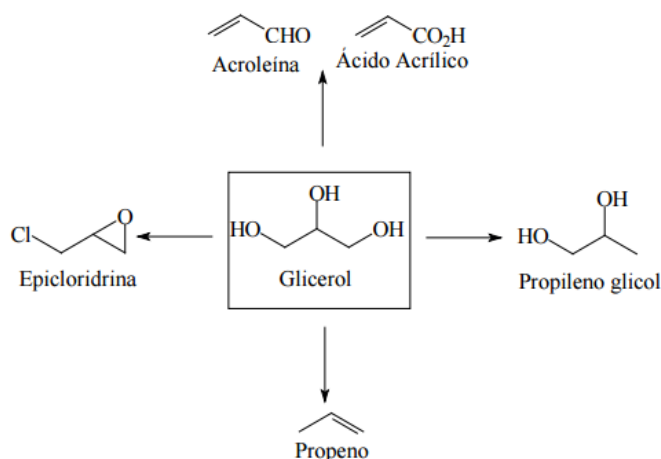
2.3 O glicerol

O termo glicerol é atribuído ao composto químico 1,2,3-propanotriol (ou propano-1,2,3-triol), um álcool trihidroxilado descoberto por Scheele em 1779. É encontrado naturalmente na forma combinada em moléculas de triacilglicerídeos de origem animal ou vegetal, sendo recuperado na forma de coproduto quando essas moléculas sofrem reações de saponificação, hidrólise e produção de ácidos graxos, ou ainda quando são transesterificados utilizando álcoois. Comercialmente, pode ser obtido a partir da síntese de propileno (BEATRIZ; YARA; LIMA, 2011).

O termo glicerina é o nome comercial utilizado para designar o glicerol após sua purificação (pureza mínima de 95%). Suas principais aplicações são na síntese de resinas e ésteres (18%), indústrias farmacêutica (7%), de cosméticos (40%), de alimentos (24%) dentre outros (11%). A maior demanda é para mercados de produtos de uso pessoal, higiene dental e alimentos, que exigem uma elevada pureza do glicerol. Antes do advento da indústria do biodiesel, o glicerol possuía a aplicação química bem reduzida, sendo usada principalmente na fabricação de explosivos (nitroglicerina) e resinas (BIOCOMBUSTÍVEIS, 2005).

A glicerina é uma matéria-prima comumente aplicada na fabricação de *commodities* ou na produção de especialidades químicas (Figura 2). Na fabricação de *commodities* ela pode ser transformada em propeno, 1,2-propanodiol, epicloridrina, acroleína e ácido acrílico. Nas especialidades podem ser produzidos éteres, acetais/cetais, ésteres e carbonato de glicerina (RAMOS; CÉSAR-OLIVEIRA; MOTA, 2016).

Figura 2 - Commodities químicas produzidas a partir do glicerol



Fonte: Ramos, César-Oliveira e Mota, 2016.

Embora o glicerol não seja um produto químico perigoso, contém resíduos de catalisador, metanol, água, sais e outras impurezas da matéria-prima, atrapalhando o seu escoamento. Na União Européia algumas usinas de biodiesel enfrentaram problemas em se livrar do excesso de glicerol devido ao colapso dos preços (DHARMADI; MURARKA; GONZALEZ, 2006). Quando descartado na natureza na forma de resíduo, pode ser um poluente em potencial, já que em contato com corpos d'água dificulta a oxigenação dos ambientes aquáticos. Quando queimado, pode resultar na emissão de acroleína, composto químico tóxico e cancerígeno (QUANTO..., 2006).

Sua purificação é realizada a partir do seu refino pela destilação seguida de um tratamento com carvão ativado ou colunas de troca iônica. Comumente é realizado um tratamento ácido para neutralização das bases e para remoção de AGL. As etapas envolvidas no processo de purificação acarretam no encarecimento do produto (KOCSSIOVA; CVENGOS, 2006). Os custos com a purificação e a abundante oferta impulsionaram o desenvolvimento de pesquisas a cerca da expansão de rotas biotecnológicas onde ele pudesse ser aplicado para geração de produtos que substituíssem as *commodities* tradicionais.

O glicerol pode ser utilizado como substrato em processos biotecnológicos, sendo uma fonte de carbono para microrganismos em bioconversão, com uma relação C/N que varia entre 248 e 275 (ANDRIAMANOHIARISOAMANANA et al., 2016). Aliado a isto, a criação de biorrefinarias capazes de coproduzir produtos de maior valor econômico é uma alternativa de significativa viabilidade econômica para a utilização do glicerol. Neste sentido, muitos estudos já são conduzidos com glicerol, tais como: (1) conversão em propilenoglicol e acetona utilizando processos termo-químicos (DASARI et al., 2005); (2) esterificação com álcoois ou alenos e produção de componentes contendo oxigênio para utilização em

combustíveis ou solventes (KARINEN; KRAUSE, 2006); (3) conversão microbiana em 1,3-propanodiol (3-PD) utilizado como um ingrediente de base de poliésteres (BARBIRATO et al., 1998; ITO et al., 2005) e; (4) transformação em butanol (BIEBL, 2001), ácido propiônico (DISHISHA; ALVAREZ; HATTI-KAUL, 2012), etanol e formiato (JARVIS; MOORE; THIELE, 1997), ácido succínico (LEE et al., 2001), di-hidroxiacetona (CLARET et al., 1994), poli-hidroxicanoatos (KOLLER et al., 2005), H_2 e etanol (ITO et al., 2005).

2.4 Esgoto sanitário

A disposição do esgoto sanitário em corpos d'água pode acarretar na eutrofização dos corpos d'água devido à presença de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo (VON SPERLING, 2005). Ambos são essenciais para o crescimento de microrganismos, tornando o esgoto sanitário promissor para aplicação em processos de codigestão. O glicerol bruto, em especial, é um coproduto pobre nesses nutrientes e possui carga orgânica elevada. Sua mistura com o esgoto sanitário pode potencializar o desempenho da sua digestão diluindo possíveis componentes inibidores da atividade microbiana presentes no glicerol, já que o esgoto sanitário é um efluente altamente diluído (SANTOS et al., 2013; CHI et al., 2007).

2.5 Aspectos gerais da digestão anaeróbia

A digestão anaeróbia é um processo onde o material orgânico é dissolvido e quimicamente convertido pelos microrganismos para manutenção do seu metabolismo, sendo gerados biogás e biomassa microbiana. Hidratos de carbono complexos como celulose, amido, lípidos, fibras e proteínas são convertidos em compostos mais simples (açúcares, glicerol, AGL e aminoácidos) possibilitando a assimilação pelas células. Proteínas de elevado peso molecular são hidrolisadas em aminoácidos, que são importantes fontes de nitrogênio e melhoram a atividade biológica e o crescimento dos microrganismos. Os compostos orgânicos são oxidados por enzimas hidrolíticas secretadas por bactérias, dividindo as cadeias moleculares maiores em unidades monoméricas. Parcela considerável da demanda química de oxigênio é convertida em CH_4 como produto final (WILLIAM; GENE, 1986).

A degradação da matéria orgânica em sistema anaeróbio ocorre em quatro etapas: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese. É através dessa oxidação dos compostos

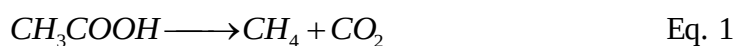
orgânicos que a célula obtém energia química, que por sua vez é transformada em ATP, principal transportador energético celular (KRISHNA, 2013).

Na hidrólise ocorre a degradação de compostos orgânicos complexos e insolúveis, transformando-os em pequenas moléculas que podem ser transportadas e assimiladas pelas células microbianas. Os processos hidrolíticos são catalisados por enzimas extra-celulares (como celulase, protease e lipase). Pode ser conduzida em sistemas aeróbios, anaeróbios, térmicos, químicos ou enzimáticos. A estabilização dos resíduos orgânicos não ocorre durante esta etapa; há apenas a conversão da matéria orgânica em formas solúveis que possam ser utilizadas pelas bactérias (WILLIAM; GENE, 1986).

Na acidogênese os compostos orgânicos mais simples são convertidos em AGV's de cadeia curta (acético, butírico e propiônico, principalmente), ácido láctico, H_2 , CO_2 , dentre outros. Os produtos formados variam de acordo com as bactérias envolvidas no processo, bem como com as condições ambientais. Nesse processo podem atuar bactérias anaeróbias facultativas, bactérias anaeróbias estritas ou ambas. O H_2 é produzido pelas bactérias acidogênicas, tolerantes a ampla gama de condições ambientais, menos sensíveis a variações de pH e de crescimento relativamente mais rápido em relação aos microrganismo que atuam nas etapas acetogênica e metanogênica. O H_2 produzido na acidogênese é consumido na acetogênese, onde as bactérias homoacetogênicas usam o H_2 como substrato para produção de acetato. De forma geral, nesta etapa ocorre a conversão dos produtos da acidogênese em substratos para a produção de CH_4 (metanogênese, etapa seguinte): acetato, CO_2 e H_2 (TOERIEN; HATTINGH, 1969; NOVAES, 1986; WILLIAM; GENE, 1986).

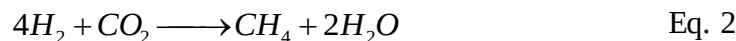
A metanogênese é a etapa final do processo e é considerada a mais importante e sensível. Os AGV's são consumidos por Arquéias, pertencentes a um domínio dos seres vivos muito semelhante às bactérias. As arqueias metanogênicas são divididas em dois grupos em função da afinidade pelos substratos: i) as acetoclásticas e as ii) hidrogenotróficas.

O grupo acetoclástico utiliza acetato ou metanol para gerar CH_4 , sendo a reação geral (NOVAES, 1986; MORGAN; EVISON; FORSTER, 1991):



O grupo acetoclástico compreende dois gêneros principais: *Methanosarcina* e *Methanosaeta*. Cerca de 2/3 do CH_4 produzido dentro desse processo é derivado da conversão de acetato pelas acetoclásticas. Na maioria das circunstâncias o acetato é o produto final comum da acidogênese, pois é facilmente convertido em CH_4 na etapa metanogênica.

As hidrogenotróficas utilizam H_2 e CO_2 na produção do CH_4 , de acordo com a seguinte reação global (NOVAES, 1986; MORGAN; EVISON; FORSTER, 1991):



Esta via também é conhecida como respiração anaeróbia, pois CO_2 é o aceptor de elétrons. As hidrogenotróficas são de rápido crescimento, com tempo de geração mínimo de 6 horas e contribuem com 1/3 do CH_4 formado. Esse grupo é responsável por manter baixas concentrações de H_2 dissolvido, favorecendo a degradação dos ácidos (MOSEY, 1983). Na presença de sulfatos e nitratos, as bactérias redutoras de sulfato (SRB) e bactérias redutoras de nitrato (NRB) podem utilizar o H_2 como doador de elétrons, gerando sulfuretos e amoníaco, respectivamente (VALDEZ-VAZQUEZ; POGGI-VARALDO, 2009).

É importante ressaltar que existe fermentação e a foto-fermentação, sendo que ambas são distintas da digestão anaeróbia. A digestão anaeróbia é bem estabelecida, de baixo custo de operação; enquanto a fermentação é uma das etapas da digestão, onde é formado o H_2 e não depende de luz; já na foto-fermentação o fornecimento de luz é um dos principais parâmetros para a sua aplicação (XIA et al., 2015). As vantagens de digestão anaeróbia incluem a baixa produção de lodo biológico, baixas demanda de nutrientes, eficiência elevada e a produção de biogás. A Tabela 1 compara os 3 processos, fermentação, foto-fermentação e digestão anaeróbia.

Durante a geração de H_2 nos processos fermentativos ocorre a formação de AGV's e álcoois, que podem ser utilizados como substrato em processos de foto-fermentação. Nos sistemas híbridos a fermentação e foto-fermentação são realizadas separadamente, gerando mais H_2 ou CH_4 em sistemas metanogênicos.

Tabela 1 - Comparação entre fermentação, foto-fermentação e digestão anaeróbia

Parâmetros	Fermentação	Foto-fermentação	Digestão anaeróbia
Substratos	Os hidratos de carbono, proteínas e glicerol	Açúcares e AGV	Matéria orgânica
Produtos	H ₂ , AGV, e CO ₂	H ₂ e CO ₂	CH ₄ e CO ₂
Rendimento de gás	4 mol de H ₂ /mol de glicose	12 mol H ₂ /mol de glicose	3 mol CH ₄ /mol de glicose
Rendimento energético bruto do gás	Baixo (6,4 kJ/g de glicose)	Alta (19,1 kJ/g de glicose)	Alta (14,8 kJ/g de glicose)
Taxa de produção energética volumétrica	Alta	Baixa	Média
Exigência luminosa	Não	Sim	Não
Tecnologia	Piloto	Piloto	Bem estabelecida

Fonte: Adaptado de XIA et al., 2015.

2.6 Codigestão

O sucesso da digestão anaeróbia a partir de material orgânico depende, principalmente, do conteúdo de substratos que podem ser convertidos em biogás, sendo sua composição química e biodegradabilidade fatores-chave dentro do processo. Vários estudos são realizados utilizando mono-substratos, mas pode haver um desequilíbrio nutricional, a falta de microrganismos diversificados ou ainda o efeito de fatores operacionais que diminuem a eficiência e o rendimento (HAGOS et al., 2016).

A codigestão é um método de tratamento onde diferentes substratos são misturados e digeridos. É uma prática que aumenta a eficiência energética dos processos e melhora o desempenho da fermentação, pois fornece nutrientes que faltam ao substrato inicial, promovendo sinergismos positivos (PARK; LI, 2012). Essa mistura de resíduos com características complementares ainda fornece uma quantidade equilibrada de nutrientes, melhora a capacidade tampão do sistema, reduz os custos com o controle do processo, dispensa o uso de suplementos nutricionais e aumenta a viabilidade da digestão (MARONE et al., 2015), sendo recomendada para contornar problemas causados por resíduos recalcitrantes (ASTALS et al., 2014).

A codigestão também pode melhorar o desempenho da fermentação porque: i) dilui compostos tóxicos que possam estar presentes; ii) eleva a carga de matéria orgânica biodegradável; iii) adiciona nutrientes essenciais; iv) ajusta a razão C/N; v) possibilita a manipulação dos substratos mistos; vi) melhora a estabilização do processo; vii) eleva a sinérgia dos microrganismos. Existe também a vantagem econômica pelo uso compartilhado de equipamentos combinada à maior produção de biogás e a possibilidade da aplicação de maiores cargas orgânicas (ASTALS et al., 2014; KWIETNIEWSKA; TYS, 2014; SHAH et al., 2015) e pode aumentar a produção de biogás de 25% a 400% em relação a mono-digestão dos mesmos substratos (CAVINATO et al., 2010; SHAH et al., 2015).

Uma das misturas mais comuns é a de frações orgânicas de resíduos urbanos e dejetos animais como forma de melhorar a relação C/N, alcalinidade e capacidade tampão, bem como a produção de gás (HARTMANN; AHRING, 2005). Alemahdi e colaboradores (2015) avaliaram a produção de H_2 por codigestão de palha de arroz e lodos ativados utilizando inóculo submetido a pré-tratamento térmico e observaram que a produção de H_2 aumentou em 70,97%. A adição da palha de arroz ao lodo ativado como fonte de carbono melhorou a relação C/N e concentração de material orgânico dentro dos reatores.

A digestão anaeróbia do glicerol bruto é limitada devido a sua composição química (baixo teor de N e pH básico), mas quando codigerido com outros substratos pode ser facilmente biodegradado elevando potencial gerador de biogás (ASTALS et al., 2011).

Na literatura já existem trabalhos onde o glicerol é utilizado para codigestão de diferentes resíduos orgânicos com a obtenção de resultados promissores. A maior parte desses estudos refere-se à codigestão com resíduos sólidos urbanos (FOUNTOULAKIS; PETOUSHI; MANIOS, 2010), dejetos suínos e culturas energéticas (HOLM-NIELSEN et al., 2008) e outros dejetos animais (AMON et al., 2006). Vale salientar que pesquisas com glicerol bruto codigerido com demais resíduos orgânicos ainda são escassas.

Andriamanohiarisoamanana et al. (2016) investigaram o desempenho da mistura de dejetos bovinos e glicerol bruto utilizando digestor de 60 m^3 operando a $55\text{ }^\circ\text{C}$ para a produção de biogás e observaram que a produção dobrou com a combinação dos dois resíduos, com uma produção de CH_4 de $0,323\text{ m}^3/\text{kg VS}$ obtidos em 4,2% (v/v) de glicerol. foi obtida energia líquida média de 25 kWh/d a partir da mistura, enquanto a digestão dos dejetos sem adição do glicerol exigiu fornecimento de querosene e eletricidade para as operações do digestor.

Razaviarani e colaboradores (2013) também avaliaram o efeito da adição de volumes crescentes de glicerol sobre o desempenho de digestores em escala piloto (volume ativo de

1.200 L) em condições mesofílicas (36°C) por 20 dias codigerindo lodo de esgoto municipal. O digestor controle foi alimentado apenas com lodo de esgoto municipal, enquanto o digestor teste recebeu lodo e glicerol como cosubstrato. As taxas de produção de biogás no digestor teste foram 1,65 e 1,83 vezes maiores que no digestor controle e no digestor sem adição de glicerol, respectivamente. As taxas de remoção de DQO no digestor teste foram 1,82 e 1,63 vezes maiores que no digestor controle e no digestor sem adição de glicerol, respectivamente. Os autores observaram uma instabilidade no sistema quando a proporção de glicerol na alimentação do digestor esteve entre 31% e 46%.

Outros autores sugerem que a viabilidade do glicerol como cosubstrato em processos de digestão anaeróbia depende também das características do glicerol utilizado e das condições operacionais. O glicerol foi testado em misturas com lodo de esgoto anaeróbio em sistema mesofílico e termofílico, sendo que em temperaturas termofílicas a mistura teve impacto negativo sobre a estabilidade e o desempenho do processo, mesmo em concentrações mais reduzidas, enquanto que em temperaturas mesofílicas foi observado maior estabilidade e aumento de 148% na produção de biogás com misturas de até 1% v/v de glicerol (representando cerca de 27% da DQO total do sistema). Misturas superiores não acarretaram em melhoria significativa (SILVESTRE; FERNÁNDEZ; BONMATÍ, 2015).

Segundo avaliação técnico-econômica, o custo com meio de cultivo sintético representa até 50% dos custos totais, incluindo operação e equipamentos em processos biotecnológicos. Portanto, o uso de materiais alternativos e mais baratos como nutriente suplementar nas bioconversões é uma forma de garantir a sustentabilidade, viabilidade e economicidade desses processos (SARMA et al., 2013a).

2.7 Produção biológica de H₂

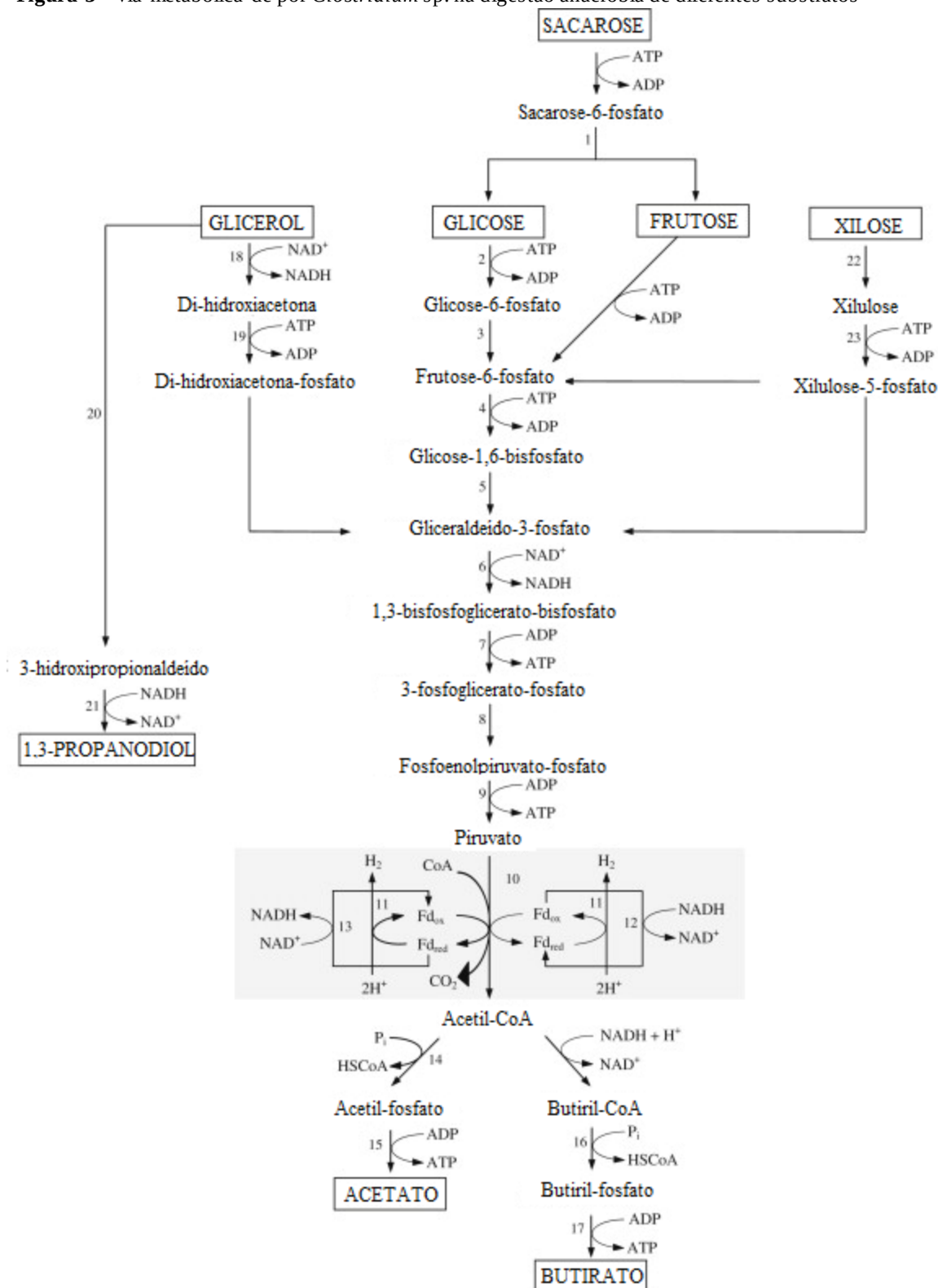
A produção biológica de H₂ pode ocorrer por diversos tipos de processos, como a i) biofotólise direta da água, a ii) biofotólise indireta da água por cianobactérias, iii) fotofermidação de compostos orgânicos com bactérias fotossintéticas, iv) fermentação anaeróbia e v) sistemas híbridos onde são combinadas etapas envolvendo bactérias fotossintéticas e bactérias fermentativas.

A fermentação é relatada na literatura com os maiores rendimentos quando comparada à outros processos biológicos. Possui geração contínua, sem inibição por ausência de iluminação, possibilita o emprego de diferentes resíduos como substrato, não é necessário o emprego de mecanismo de oxigenação do meio, já que é um processo anaeróbio, além de haver a geração de metabólitos de interesse comercial, como ácidos orgânicos e solventes (DAS; VEZIROGLU, 2008; VALDEZ-VAZQUEZ; POGGI-VARALDO, 2009; SÁ et al., 2014).

2.7.1 Produção biológica de H_2 por digestão anaeróbia

A fermentação corresponde ao primeiro passo de digestão anaeróbia e conduz simultaneamente para a produção de grande quantidade de H_2 e AGV's, ácidos graxos com seis ou menos átomos de carbono. É um processo que ocorre para a manutenção do equilíbrio redox intracelular, através da reoxidação de equivalentes redutores, havendo a produção de ATP na ausência de oxigênio. A partir da oxidação dos substratos, a célula obtém energia para o crescimento e a reprodução, com consequentemente liberação de elétrons. Em ambientes aeróbios, o oxigênio é reduzido e água é formada como produto, já em ambientes anaeróbios outros compostos atuam como aceptores desses elétrons, como prótons, que são reduzidos a H_2 (HAWKES et al., 2002; ANGENENT et al., 2004; HALLENBECK, 2009). Diferentes substratos podem ser utilizados para produção de produtos intermediários e H_2 (Figura 3).

Figura 3 - Via metabólica de por *Clostridium* sp. na digestão anaeróbia de diferentes substratos



Indicadas na figura as enzimas: 1) Sacarose-6-fosfato hidrolase; 2) Hexoquinase; 3) Fosfoglicose isomerase; 4) Fosfofrutoquinase; 5) Aldolase; 6) gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase; 7) Fosfoglicerocinase; 8) α enolase; 9) Oxidorredutase piruvato quinase; 10) Piruvato-ferredoxina; 11) Hidrogenase; 12) NAD(P)H-ferredoxina redutase; 13) Ferredoxina-NAD(P)-redutase; 14) Fosfotranscetilase quinase; 15) Acetato linase; 16) Fosfotransbutilase quinase; 17) Butirato quinase; 18) Glicerol desidrogenase; 19) ADN-quinase; 20) Glicerol desidratase; 21) 1,3-PD desidrogenase; 22) Xilose isomerase; 23) Xiluloquinase.

Fonte: Adaptado de Sá et al., 2013.

Glicerol, pentoses, hexoses e sacarose, seguem a via de Embden Meyerhof (glicólise) para produção de H_2 . No metabolismo da sacarose ocorre uma etapa de hidrólise anterior a via glicolítica, onde ela é transformada em glicose e frutose pelo enzima invertase. A glicose é fosforilada por ATP, formando glucose-6-fosfato, que depois é convertido a frutose-6-fosfato. A frutose é diretamente fosforilada a frutose-6-fosfato e, em uma segunda etapa de fosforilação, ocorre a formação de frutose-1,6-bifosfato, que é convertida em gliceraldeído-3-fosfato pela ação da enzima aldolase. As hexoses são metabolizadas pela via glicolítica com formação de 2 mol de piruvato e 2 mol de NADH para cada mol de hexose transformado. A enzima piruvato ferredoxina oxidoreductase promove a descarboxilação oxidativa liberando elétrons que são utilizados pelas enzimas hidrogenases na geração de 2 mol de H_2 por mol de hexose. A pressão parcial dentro do sistema exerce importante papel de regulação da dinâmica na geração de H_2 , pois o NADH produzido na via glicolítica tem a oxidação favorecida em pressões mais reduzidas. Sob pressões elevadas, o NADH é oxidado para formação de compostos orgânicos, como o ácido butírico, desfavorecendo a formação de H_2 (HAWKES et al., 2002; ANGENENT et al., 2004; HALLENBECK, 2009).

No caso das pentoses, utilizando a xilose como exemplo, esta é convertida à xilulose, que é fosforilada pela produção de ATP à xilulose-5-fosfato através da via da pentose fosfato, que envolve uma cadeia de reações onde a xilulose-5-fosfato é convertida a gliceraldeído-3-fosfato, e, posteriormente em piruvato. Apenas o glicerol é reduzido a di-hidroxiacetona e fosforilado em di-hidroxiacetona-fosfato antes de ser convertido em gliceraldeído-3-fosfato. A partir do gliceraldeído-3-fosfato, ocorre a formação de piruvato, que por sua vez é clivado pela ação da enzima piruvato-ferredoxina oxidoreductase na presença da coenzima A (CoA) para formação do acetil-CoA, ferredoxina reduzida (FD vermelho) e CO_2 . A partir do acetil-CoA pode ocorrer a fosfotransacetilase ou fosfotransbutilase, gerando acetato, butirato e ATP (SÁ et al., 2013).

Quando o glicerol é utilizado como substrato, as concentrações intracelulares de ATP e NADH aumentam, levando à produção de solventes, como 1,3-PD. Consequentemente, ocorre a diminuição da produção de ácidos orgânicos e H_2 (AKUTSU et al., 2009).

Menos de 1/3 da energia da glicose pode ser convertido em H_2 na fermentação, ao passo que mais de 2/3 da energia permanece no efluente na forma de produtos solúveis (MOTTE et al., 2015).

Na Tabela 2 estão demonstrados os rendimentos estequiométricos de H_2 por conteúdo de monômeros na fermentação. Os açúcares apresentam os mesmos valores de produtividade

(497,8 mL de H₂), enquanto o rendimento estequiométrico do glicerol (730,4 mL de H₂) é mais elevado.

Tabela 2 - Rendimentos estequiométricos de H₂ por conteúdo de monômeros dentro da fermentação

Substrato	mL H₂/g monômero*	mol H₂/mol monômero
Glicose	497,8	4
Xilose	497,8	10/3
Glicerol	730.4	3

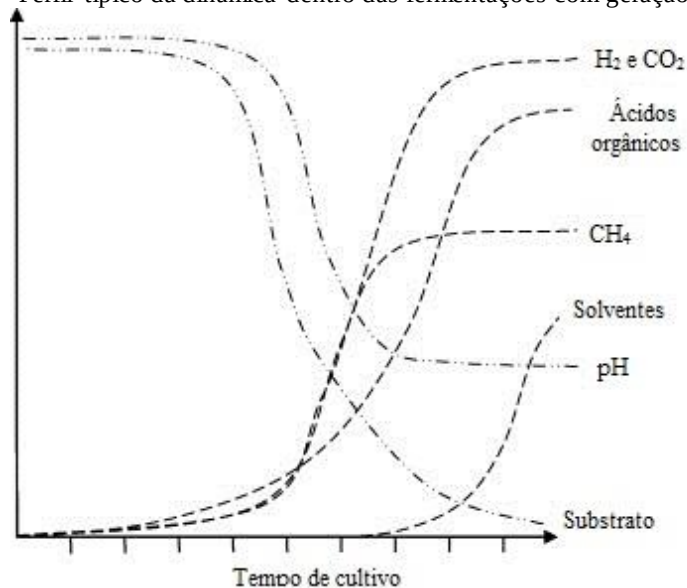
* Cálculo baseado nos pesos moleculares de H₂ (2 g/mol), glicose (180 g/mol), xilose (150 g/mol) e glicerol (92 g/mol).

Fonte: Adaptado de Xia et al., 2015.

O processo de digestão anaeróbia do glicerol vem sendo investigado por vários autores para geração de diferentes produtos (KALIA et al., 1994; VARRONE et al., 2012; SARMA et al., 2013b; KUMAR et al., 2015; LEE et al., 2015; MARONE et al., 2015; PACHAPUR et al., 2015; RAZAVIARANI; BUCHANAN, 2015; TRCHOUNIAN; TRCHOUNIAN, 2015).

As bactérias envolvidas na geração de H₂, também chamadas de formadoras de ácido, podem produzir ácido acético, propiônico ou butírico de acordo com o nível de H₂ no biogás. As reações que acontecem na etapa acetogênica não são termodinamicamente favoráveis sob condições ambientais padrões (pH neutro, 25°C e 1 atm), sendo assim, para que ocorra a geração do propionato, butirato e etanol deve haver a remoção de H₂ do sistema, promovendo o deslocamento da reação para formação de acetato, H₂ e CO₂ (íon bicarbonato). A remoção deve ser suficiente para manutenção de uma faixa de pressão de H₂ entre 10⁻⁴ e 10⁻⁶ atm, possibilitando a degradação desses produtos de forma exergônica e a liberação de energia suficiente para as bactérias acetogênicas (LETTINGA et al., 1980).

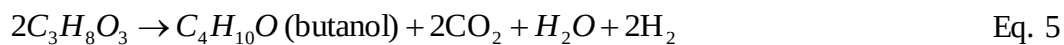
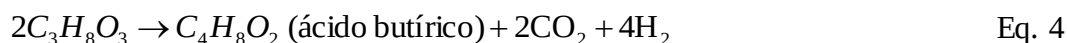
O teor de H₂ no meio também determina a proporção intracelular de NAD e NADH, importante na regulação das reações metabólicas (VAVILIN; RYTOW; LOKSHINA, 1995). Essa é a etapa de maior interesse para o processo produtivo de H₂. Os microrganismos responsáveis por esse processo são heterótrofos e anaeróbios com capacidade de suportar faixas de pH entre 4,0 a 6,5 (KRISHNA, 2013; KRAEMER; BAGLEY, 2007). Quando o objetivo é a produção de H₂, podem ser usadas faixas de pH mais restritas; uma vez que arqueias metanogênicas e consumidoras de H₂ necessitam de pH próximo a 7,0 para atuarem. Quando não há controle do pH, a diminuição do pH ocorre naturalmente conforme AGV's são gerados (Figura 4).

Figura 4 - Perfil típico da dinâmica dentro das fermentações com geração de H₂

Fonte: Adaptado de Valdez-Vazquez; Poggi-Varaldo, 2009.

O processo de produção de H₂ por métodos biológicos ainda é pouco eficiente, sendo que apenas 16-24% do rendimento estequiométrico é alcançado (WOODWARD et al., 2000). Para otimização desses processos são aplicados métodos de pré-tratamento nos inóculos para a inibição da metanogênese e são feitos enriquecimentos de consórcios de bactérias produtoras de H₂, como choque térmico, aplicação de ácidos ou bases, arejamento, congelamento e descongelamento, adição de reagentes como clorofórmio, 2-bromoetanesulfonato de sódio ou o seu ácido, iodopropano, acetileno, etileno, etano, cloreto de metilo, fluoreto de metilo e lumazina. (KIM, J. K. et al., 2006; ROSSI et al., 2011; SIVAGURUNATHAN et al., 2015).

O rendimento da produção biológica de H₂ depende das vias fermentativas utilizadas pelas bactérias envolvidas. Os metabólitos podem ser ácido acético (equação 2); ácido butírico (equação 3); butanol (equação 4), etanol (equação 5), dentre outros. A geração de ácido acético e ácido butírico proporciona rendimentos mais elevados, produzindo 3 e 2 mols de H₂ a partir de 1 mol de glicero1, respectivamente (MAINTINGUER et al., 2015).



Utilizando culturas bacterianas mistas, as rotas metabólicas podem ocorrer simultaneamente e outros ácidos também são comumente formados, como os ácidos fórmico, propiônico, valérico, iso-valérico e capróico.

Temperatura e pH são fatores ambientais que afetam diretamente a fermentação. Em relação a temperatura, a fermentação pode ser conduzida em condições mesofílicas (25-40°C), termofílicas (40-65°C) ou hipertermofílicas (> 65°C). Li e Fang (2007) relataram que de 101 estudos de caso realizados 73 trabalharam com temperaturas mesofílicas. Essa condição é mais aplicada devido à menor exigência energética, no entanto são obtidos altos rendimentos de H₂ nas condições termófilas e hipertermófilas, pois grande parte dos microrganismos consumidores de H₂ são inibidos dentro desta faixa de temperatura. As bactérias produtoras de H₂ possuem atividade metabólica rápida a temperaturas mais elevadas, tornando o processo mais termodinamicamente favorável à sua produção. Por outro lado, as taxas de produção volumétrica de H₂ nas condições termófilas e hipertermófilas são relativamente baixas (XIA et al., 2015). Entretanto, quando são empregados resíduos agroindustriais, as temperaturas termófilas geralmente promovem rendimentos mais elevados, pois potencializam a etapa de hidrólise dos compostos lignocelulósicos presentes na biomassa.

O rendimento de H₂ geralmente é mais elevado quando o pH é mantido próximo de 7. Em pH acima de 8,2 o rendimento começa a cair progressivamente (CHENG et al., 2011). O pH ótimo vai depender do substrato utilizado, mas pH de 5,5 é usado na maioria dos trabalhos que visa a geração de H₂. No entanto, rendimentos mais satisfatórios são encontrados entre 5,0-7,0, que podem favorecer a atividade das hidrogenases (LI; FANG, 2007). Temudo e colaboradores (2008a) estudaram o impacto do pH sobre a atividade metabólica em processos de fermentação com glicose, xilose e glicerol a 30 °C e observaram que em pH < 6 o perfil de produtos formados consistia principalmente em butirato e acetato, enquanto em pH > 6 havia a maior formação de etanol.

Sendo assim, o pH não apenas afeta o rendimento de H₂ em culturas mistas, como também modifica o espectro de subprodutos gerados e promove alterações nas comunidades.

2.7.2 Acúmulo de metabólitos intermediários

As vias metabólicas envolvidas no catabolismo do glicerol podem sofrer inibição por diversos fatores (ambientais e operacionais), interferindo no processo de degradação. Um produto pode ser considerado inibidor quando provoca uma alteração desfavorável na

população microbiana ou inibe o crescimento e a atividade metabólica dos microrganismos. A digestão anaeróbia é mais sensível em relação à inibição do que processos aeróbios e por isso esse fenômeno requer maior atenção (CHEN, J. et al., 2014).

Os próprios metabólitos do processo podem ser tóxicos para comunidade microbiana atuante, principalmente os ácidos orgânicos e álcoois, que vão possuir uma concentração crítica variável para cada tipo de processo e microrganismo utilizado (CHENG; LIU; LIU, 2005). As condições adequadas de cultura e as técnicas de cultivo também são importantes para reduzir a inibição dos subprodutos.

Na maioria dos processos fermentativos, ocorre a formação de ácidos orgânicos, causando a acidificação do meio, comprometendo o crescimento de biomassa, inativada por seus produtos (BIEBL et al., 1998). Algumas espécies desenvolvem estratégias para contornar o processo de acidificação, como alterar seu metabolismo para a síntese de compostos como álcoois e glicóis.

Embora o íon acetato tenha pouco efeito no crescimento microbiano, o ácido acético é um inibidor forte, pois compromete o crescimento e a respiração. Outros produtos como o 2,3-butanodiol possuem esse efeito reduzido afetando apenas a atividade de água dentro dos mecanismos celulares. Segundo alguns autores, a concentração crítica de 2,3-butanodiol fica em torno de 105 g L^{-1} , enquanto a do ácido acético fica por volta de $0,45 \text{ g L}^{-1}$ (FOND et al., 1985).

Biebl (1991) estudou os potenciais de inibição para 1,3-PD, ácido acético, ácido butírico e glicerol no crescimento de *Clostridium butyricum* em pH 6,5 e afirmou que todas essas substâncias são tóxicas para este microrganismo. As concentrações críticas (concentrações acima das quais as células deixam de crescer) foram 27 g L^{-1} para ácido acético ($0,49 \text{ g L}^{-1}$ de ácido não dissociado); 19 g L^{-1} para ácido butírico ($0,39 \text{ g L}^{-1}$ de ácido não dissociado); $64,0 \text{ g L}^{-1}$ para 1,3-PD e $97,0 \text{ g L}^{-1}$ para glicerol. Perfil de inibição parecido foi encontrado para *Klebsiella oxytoca* (FOND et al., 1985) e *Enterobacter aerogenes* (ZENG; BIEBL; DECKWER, 1990; ZENG; DECKWER, 1991).

O 3-hidroxipropionaldeído (3-HPA) é um intermediário do 1,3-PD na rota redutora (descrita a seguir) e é altamente tóxico e possui efeito bacteriostático (BARBIRATO et al., 1996; BARBIRATO et al., 1998). Alguns autores reportam que espécies como *Clostridium butyricum* são mais resistentes ao acúmulo de 3-HPA, enquanto algumas enterobactérias são profundamente afetadas (BARBIRATO et al., 1998). O efeito inibitório pode ser diferente em anaerobiose ou aerobiose. *Klebsiella pneumoniae* é mais tolerante ao 3-HPA em sistema de aerobiose, suportando concentração próxima a 133 g L^{-1} , em anaerobiose 110 g L^{-1} . A

tolerância ao 3-HPA ainda é maior do que em relação aos outros metabólitos em anaerobiose, como acetato, que possui efeito inibitório a 15 g L^{-1} , lactato em torno de 19 g L^{-1} , etanol em torno de 26 g L^{-1} e 1,3-PD em torno de 69 g L^{-1} . Nos sistemas aeróbios, a tolerância é menor em relação ao etanol (17 g L^{-1}), ao lactato (26 g L^{-1}), ao acetato (24 g L^{-1}) e ao 1,3-PD (77 g L^{-1}) (CHENG; LIU; LIU, 2005).

2.7.3 Consórcios microbianos

A fermentação pode ser conduzida utilizando culturas puras ou mistas. Trabalhar com culturas mistas é industrialmente mais vantajoso por tornarem os processos mais econômicos e robustos, possibilitando o uso de grande variedade de resíduos orgânicos não esterilizados, como águas residuárias, resíduos agrícolas e industriais sólidos. A aplicação dessas matérias-primas ainda evita que elas sejam dispostas em aterros sanitários ou no meio ambiente.

Apesar do seu potencial, o uso de consórcios microbianos ainda está em processo de investigação e possui muitas limitações a serem superadas, como a seleção de um método de inibição dos microrganismos consumidores de H_2 , o tempo de estabilização do inóculo, a origem e tipos de substratos, dentre outros (VALDEZ-VAZQUEZ; POGGI-VARALDO, 2009). Nesses sistemas, o controle das condições operacionais determina qual o produto catabólico será predominante.

Na produção de H_2 a partir de glicerol podem ser utilizados como inóculo culturas de linhagem pura, lodos ativados, células imobilizadas e culturas mistas. Com as culturas mistas é possível que haja sinergia entre as e bactérias anaeróbias facultativas e estritas já esses grupos possuem diferentes características metabólicas. Segundo Qian e colaboradores (2011) a taxa de produção de H_2 na cultura mista é maior, uma vez que grupos de bactérias anaeróbias facultativas e bactérias anaeróbias estritas atuam de forma complementar, sendo as bactérias anaeróbias facultativas responsáveis por consumir O_2 que por ventura possa estar presente no sistema.

Os consórcios microbianos podem ser obtidos a partir de várias fontes naturais, como lodo, solo, sedimento de lagos, sistemas de tratamento de resíduos, extração vegetal e etc (CHEN, W. et al., 2005). Como os processos produtivos de H_2 pelas vias fermentativas geralmente utilizam matéria-prima não-estéril, a utilização de consórcios microbianos tem se tonado uma abordagem comum e muitas vezes são realizados enriquecimento das espécies destinadas à produção de H_2 . No entanto, nessas condições, é necessário suprimir a atividade

metanogênica (que consome o H_2). Os pré-tratamentos são amplamente utilizados para esse fim e consideram uma característica do grupo de bactérias anaeróbias geradoras de H_2 : a capacidade de formar endósporos. Essa peculiaridade lhes confere maior resistência, como acontece com determinados bacilos Gram positivos semelhantes a *Clostridium*, que podem desenvolver endósporos em resposta a condições ambientais adversas como temperaturas elevadas, ambientes hipertônicos, escassez de nutrientes, acidez elevada ou alcalinidade extrema, dentre outras (KIM; HAN; SHIN, 2006; ROSSI et al., 2011; SIVAGURUNATHAN et al., 2015).

Os endósporos são estruturas celulares desidratadas altamente duráveis, sendo formadas dentro da membrana celular e uma característica exclusiva de bactérias. Possui paredes espessas com camadas adicionais que permitem sua sobrevivência em ambientes estressantes, na presença de substâncias químicas tóxicas e até mesmo radiação (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

O tratamento térmico é um dos mais comuns para a seleção de produtores de H_2 (VALDEZ-VAZQUEZ; POGGI-VARALDO, 2009). Embora pareça mais difícil e caro frente aos tratamentos ácido e alcalino, devido a variação na temperatura e o tempo que é aplicado, Han e colaboradores (2005) avaliaram o tratamento térmico em escala piloto variando o volume de trabalho de 4 a 50 litros em reatores operados em batelada e observaram sua eficiência, não havendo o desenvolvimento de produtores de propionato e não-formadoras de endósporos que consumissem o H_2 .

Sá e colaboradores (2013) avaliaram o uso de pentoses, hexoses e glicerol como substratos para a produção de H_2 e os efeitos de diferentes pré-tratamentos do inóculo (ácido, alcalino e térmico) sobre o desempenho das comunidades bacterianas. O inóculo pré-tratado com calor proporcionou o melhor desempenho para todos os substratos testados. O maior rendimento observado foi para a sacarose, com 4,62 mol H_2 / mol sacarose, representando rendimento 21% mais elevado, com nível de expressão da enzima hidrogenase 64 vezes maior quando comparado com inóculo não tratado. No caso do glicerol, o rendimento alcançado foi de 0,80 mol H_2 /mol de glicerol.

É importante lembrar que quando o tratamento térmico é utilizado, o tempo para a germinação de endósporos pode provocar longos períodos de latência, por isso é indicada a realização de pré-cultivos ou reativação do inóculo (PLOWMAN; PECK, 2002). No entanto, na produção de solventes industriais rotineiramente utiliza-se o tratamento térmico para germinação de endósporos das espécies de *Clostridium* sp. (COHEN et al., 1984; COHEN et al., 1985).

Apesar das vantagens, a atuação de vários grupos de bactérias em consórcio microbiano pode comprometer os rendimentos de H_2 devido a ação de bactérias produtoras propionato, redutoras de sulfato e redutoras de nitrato (Tabela 3).

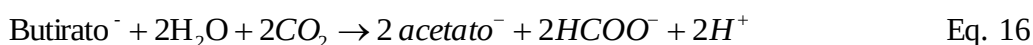
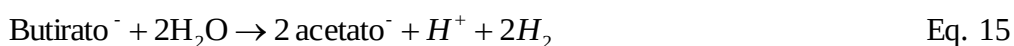
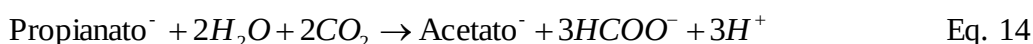
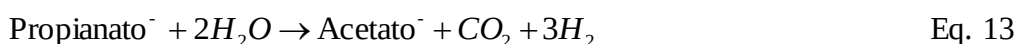
Tabela 3 - Reações de consumo de H_2 e suas respectivas energias livres de Gibb sob condições de 25 °C, 1 M, 1 bar

Reações	ΔG° (kJ mol reação ⁻¹)	Equação (n°)
$4H_2 + 2HCO_3^- + H^+ \rightarrow CH_3COO^- + 4H_2O$	-104,6	7
$4H_2 + HCO_3^- + H^+ \rightarrow CH_4 + 3H_2O$	-135,6	8
$4H_2 + SO_4^{2-} + H^+ \rightarrow 4H_2O + HS^-$	-152,2	9
$4H_2 + S_2O_3^{2-} \rightarrow 2HS^- + 3H_2O$	-174,1	10
$7H_2 + 3CO_2 \rightarrow CH_3CH_2COO^- + H^+ + 4H_2O$	-166,7	11
$4H_2 + NO_3^- + 2H^+ \rightarrow NH_4^+ + 3H_2O$	-599,6	12

Fonte: adaptado de Shanmugam et al., 2014.

Diferente do que ocorre com a metanogênese, os pré-tratamentos térmicos e químicos não inibem o consumo de H_2 na homoacetogênese. Shanmugam e colaboradores (2014) utilizaram um modelo de superfície de resposta quadrática para prever o consumo de H_2 em culturas anaeróbias mistas e otimizar as condições de fermentação como mínimo consumo de H_2 . As variáveis avaliadas foram temperatura, pH e concentração de ácido linoleico (LA). Observou-se que a 38 ° C, pH de 5,5 e 2 g L⁻¹ LA foram as melhores condições para o consumo mínimo de H_2 . O LA estaria correlacionado com a formação de CH_4 e acetato, indicando o forte efeito poder inibitório de LA na metanogênese e possivelmente na homoacetogênese.

O sinergismo entre as espécies não proporciona apenas o consumo do H_2 , mas também pode ocasionar a produção de H_2 a partir de rotas secundárias, como a oxidação de propionato e butirato em H_2 , conforme as equações abaixo. As oxidações sintróficas de propionato e butirato envolvem reações dependentes da energia que não são completamente compreendidas bioquimicamente (MULLER et al., 2010):



2.7.4 Produção biológica de H_2 e processos convencionais

Segundo as investigações de Das e Veziroglu (2008), apesar dos progressos significativos dentro dos processos biológicos de produção de H_2 , ele ainda é pouco atraente frente aos convencionais. Para a maior viabilidade desses processos é necessário que haja a melhoria dos rendimentos na produção de H_2 quando são utilizadas matérias-primas alternativas (resíduos); o desenvolvimento de consórcios microbianos mistos mais eficientes e versáteis, com capacidade de catabolizar diferentes substratos; e emprego dos processos de duas fases, combinando processos de foto-fermentação com a fermentação. Além desses fatores, a utilização de métodos avançados de simulação e de caracterização de resíduos orgânicos pode acelerar o escalonamento dos processos e melhorar significativamente a produção de biogás como fonte renovável e economicamente viável.

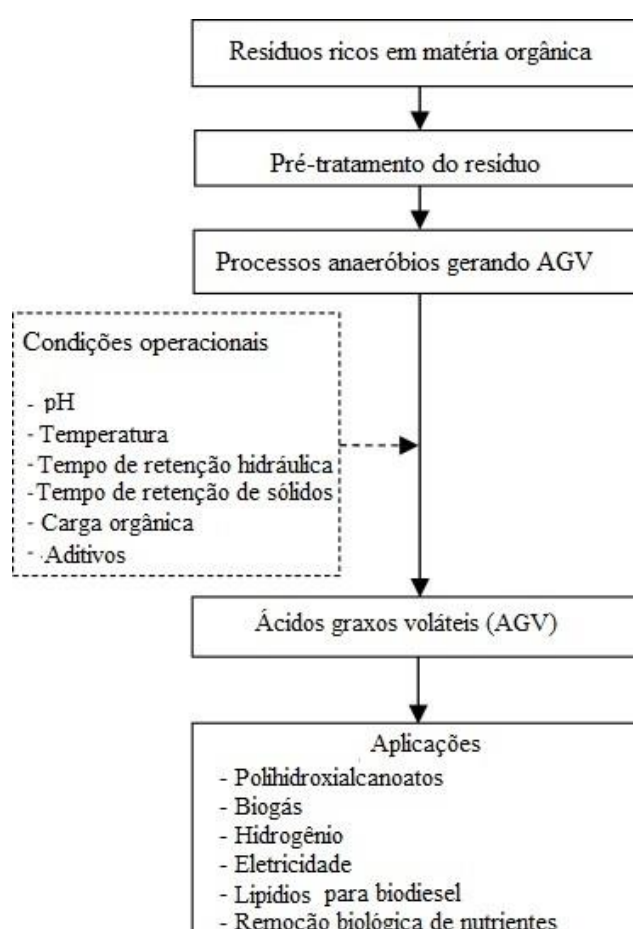
O principal gargalo na produção de H_2 por fermentação são as soluções residuais (AGV e álcoois) e a baixa eficiência teórica energética (33,5%) do processo, já que esses compostos orgânicos na fase líquida ainda possuem energia e devem ser aproveitados em processo de cogeração de outros produtos, como CH_4 , ou com uma segunda etapa de geração de H_2 aplicando processos foto-fermentativos, conforme descrito anteriormente. Essa é uma forma de melhorar a eficiência do processo em até 89% (XIE et al., 2008). O sistema de digestão de duas fases foi proposto pela primeira vez por Pohland e Ghosh (1971).

Xie e colaboradores (2008) reutilizaram as soluções residuais da produção de H_2 realizando fermentação de duas fases e melhorou a eficiência da conversão energética com um novo processo de cogeração de H_2 e CH_4 . O maior rendimento de H_2 observado foi de 2,75 mol H_2 /mol utilizando a concentração de 1% de glicose e pH 6,0. As soluções residuais continham etanol, ácido acético, ácido butírico, ácido propiônico, ácido valérico, ácido capróico e foram reutilizadas numa etapa metanogênica. O rendimento máximo foi de 2,13 mol CH_4 /mol de glicose e taxas de reutilização dos compostos orgânicos acima de 90%.

Os ácidos orgânicos ainda podem ser usados em outras aplicações biotecnológicas (Figura 5), como na produção de biodiesel, onde o ácido acético é utilizado como fonte alternativa de carbono para a levedura *Yarrowia lipolytica* na produção de lipídios (FONTANILLE et al., 2012); como fonte de carbono externa para a desnitrificação biológica das águas residuais ricas em nitrato-nitrogênio (ELEFSINIOTIS; WAREHAM; SMITH, 2004); na otimização da remoção biológica de fósforo de águas residuais (RANDALL et al., 1997); como substrato para a produção de H_2 em foto-fermentação utilizando consórcios microbianos (SRIKANTH et al., 2009); como base um para métodos baseados em

complexação de aminas na produção de álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres e olefinas (EGGEMAN e VERSER, 2005); como substrato para produção de bioplásticos e biopolímeros, como os poli-hidroxicarbonatos (PHILIP; KESHAVARZ; ROY, 2007); na geração de energia a partir de sistemas bioelectroquímicos onde os microrganismos transformam a energia química do substrato orgânico em uma fonte de eletricidade (DU; LI; GU, 2007); dentre outros (LEE et al., 2014).

Figura 5 - Produção de AGV's derivados de resíduos e algumas aplicações



Fonte: Adaptado de Lee et al., 2014.

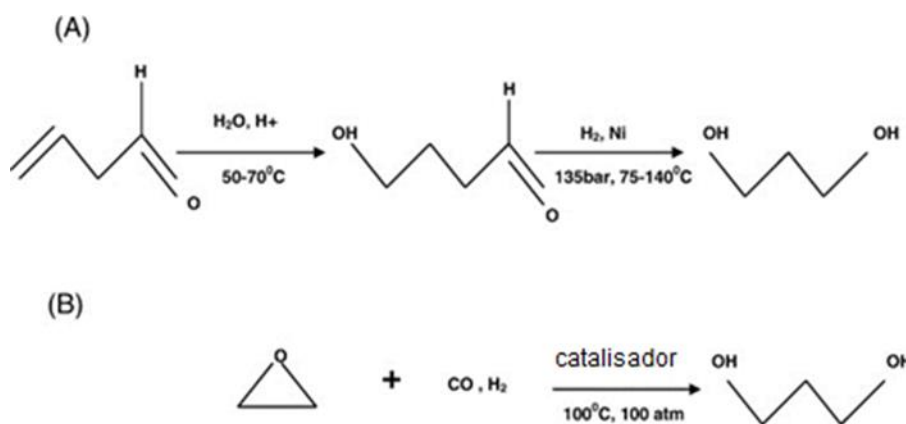
2.8 O 1,3-propanodiol

O 1,3-PD é outro produto formado pelo metabolismo microbiano quando o glicerol é empregado como substrato, e tem recebido crescente atenção graças às suas aplicações

industriais. É um valioso intermediário químico da fabricação de polímeros, como poliésteres, poliéteres e poliuretanos, cosméticos, medicamentos, lubrificantes, fluidos para transferência de calor, base de soluções para refrigeração de motores, fabricação de resinas baseadas em poliésteres e *cross linker* na química do uretano e em áreas da engenharia de fibras e revestimentos. Anteriormente, o 1,3-PD não possuía mercado muito promissor devido à sua pouca disponibilidade; mas com surgimento de novos processos biológicos e o estudo dos microrganismos envolvidos na sua produção, o 1,3-PD pode se tornar mais competitivo e acessível (HOMANN et al., 1990; BIEBL et al., 1999; CHEN, OHASHI, HARADA, 2003; SILVA et al., 2009; POSADA; RINCÓN; CARDONA, 2012).

Quimicamente, ele pode ser produzido por duas rotas principais. Uma delas é pela hidratação e hidrogenação da acroleína, e a outra pela reação do óxido de etileno com monóxido de carbono utilizando catalisador organometálico, sendo posteriormente hidrogenado formando o 1,3-PD (Figura 6). Ambas as rotas são dependentes de combustíveis fósseis requerem condições de elevadas de temperatura, pressão e catalisadores de alto custo, havendo ainda a geração de intermediários tóxicos (KRAUS, 2008).

Figura 6 - Síntese química de 1,3-PD



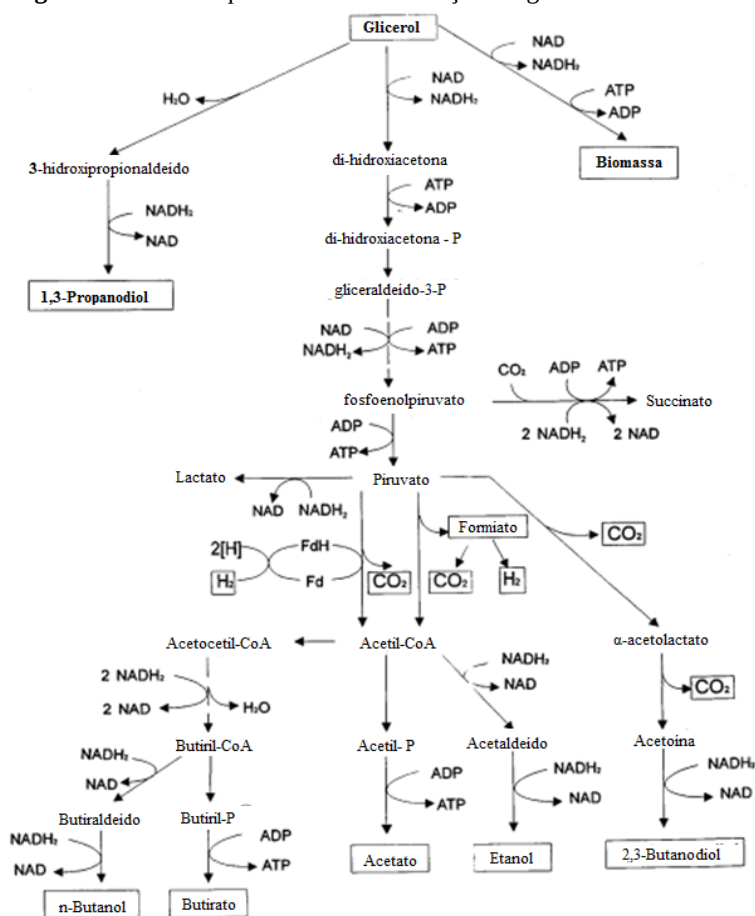
(A) reação de hidratação e hidrogenação da acroleína; (B) reação de oxidação de etileno

Fonte: Adaptado de Saxena et al., 2009.

Dentro das rotas biotecnológicas, o 1,3-PD é um produto específico das vias de dissimilação do glicerol, não sendo produzido em outras conversões metabólicas (LIN, 1976). Comparando o glicerol à glicose, sabe-se que existe uma diferença entre eles relativa ao número de elétrons por carbono. Assim, a conversão de glicerol em piruvato gera para a célula 2 mol de NADH, enquanto apenas 1 mol está envolvido no caso de glicose (Figura 3), e, por isso, o 1,3-PD é formado a partir do glicerol enquanto o mesmo não ocorre com a glicose (TEMUDO et al., 2008b).

A função fisiológica da transformação do glicerol em 1,3-PD é para regenerar os equivalentes redutores que são utilizados nas vias de produção de energia durante a degradação do glicerol. Apenas alguns organismos são capazes de formá-lo, como enterobactérias do gênero *Klebsiella* (*K. pneumoniae*), *Citrobacter* (*C. freundii*), *Enterobacter* (*E. agglomerans*), *Lactobacillus* (*L. brevis* e *L. buchneri*) e *Clostridium* (*C. butyricum* e *C. parteurianum*) (BIEBL et al., 1999; ROSSI, 2012). As reações metabólicas envolvidas na fermentação do glicerol para formação desse produto ocorrem basicamente de duas formas: oxidativa e redutora. Na via oxidativa o glicerol é convertido a di-hidroxiacetona pela enzima glicerol desidrogenase, e, posteriormente, é fosforilado pela enzima adenosina-quinase a di-hidroxiacetona-fosfato. Na glicólise a dihidroxiacetona-fosfato forma piruvato e, a partir dele, são formados ácidos orgânicos como ácido láctico, ácido acético, ácido succínico, além de outros compostos como 2,3-butanodiol, H_2 , CO_2 e etanol. Na rota redutora ocorre a desidratação do glicerol a 3-HPA pela glicerol desidratase e depois é reduzido a 1,3-PD pela 1,3-propanodiol desidrogenase, que é dependente de vitamina B_{12} (GDHt) (BIEBL et al., 1999) (Figura 7).

Figura 7 - Vias bioquímicas de fermentação de glicerol



Fonte: Adaptado de Biebl et al., 1999.

Sabe-se, no entanto, que a geração de 1,3-PD leva a menores rendimentos na produção de H_2 , já que as rotas competem pelo substrato inicial (MARKOV; AVERITT; WALDRON, 2011; VARRONE et al., 2012).

Klebsiella pneumoniae, em particular, tem sido amplamente investigada devido à sua elevada produtividade e tolerância a concentrações elevadas de glicerol. Esse gênero também produz grandes quantidades de 2,3-butanodiol, etanol e ácido lático. A composição dos subprodutos pode variar consideravelmente em culturas de *Klebsiella*, enquanto que as espécies de *Clostridium* formam apenas ácido acético e ácido butírico. O desenvolvimento de processos utilizando *Klebsiella pneumoniae* ainda é limitado devido à sua classificação como agente patogênico e potencial causador de doenças do trato urinário e infecções como pneumonia (DECKWER, 1995).

A faixa de pH entre 6,5-7,5 é favorável para a formação do 1,3-PD e pH inferior a 6,5 estimula a formação de 2,3-butanodiol. A formação dos subprodutos a partir do piruvato resulta na diminuição do rendimento de 1,3-PD, e, por isso, a formação desses subprodutos deve ser mantida o mais baixo possível para que o 1,3-PD seja o produto dominante dentro da fermentação (LEE et al., 2015).

Espécies de *Clostridium* podem ser utilizadas alternativamente, com a vantagem de em alguns gêneros a via de utilização do glicerol não ser dependente da coenzima vitamina B_{12} . Na literatura é possível encontrar trabalhos com o uso de *C. butylicum* (FORSBERG, 1987) e *C. pasteurianum* (DABROCK; BAHL; GOTTSCHALK, 1992; BIEBL, 2001).

As fermentações de glicerol por enterobactérias resultam no acúmulo de dois produtos principais, o 1,3-PD e acetato, enquanto os produtos secundários, lactato, formiato, succinato e etanol, são produzidos de acordo com as condições de cultivo. A fermentação de glicerol com *C. butyricum* leva a produção de 1,3-PD como um componente principal, seguido de butirato e acetato como subprodutos, além dos gases CO_2 e H_2 . O perfil dos compostos orgânicos e suas proporções dentro da fermentação influenciam diretamente outros parâmetros envolvidos nos processos fermentativos e a viabilidade de separação do 1,3-PD do meio líquido. A extração de 1,3-PD é mais fácil quando há menor variedade de compostos orgânicos em solução (LIU et al., 2013).

Tecnologias para produção de 1,3-PD a partir de resíduos industriais são estudadas para o melhoramento da viabilidade dos processos fermentativos, mas sua extração e purificação ainda é um grande desafio, pois suas propriedades físico-químicas (ponto de ebulição elevado, alta solubilidade em água) implicam na necessidade da utilização de processos específicos de extração (destilação, extração com solvente e etc) que ainda

precisam ser otimizados. Abordagens múltiplas e integradas são necessárias para aquisição de dados que sustentem a viabilidade da produção microbiana de 1,3-PD a partir de glicerol (LIU et al., 2013).

Sendo o glicerol bruto uma matéria-prima abundante, barata e com potencial de aplicação dentro de processos biotecnológicos e os produtos gerados a partir de sua digestão de elevado valor agregado e com grande aplicação industrial, sua utilização possibilita uma destinação sustentável, competitiva e econômica. Não há geração de intermediários ambientalmente tóxicos, além de empregar condições amenas de temperaturas, baixa pressão e não necessitar de catalisadores de alto custo. A necessidade do desenvolvimento de tecnologias comerciais para gerenciar o excesso de resíduos faz com que o glicerol se torne uma importante matéria-prima para a produção de novos produtos e um componente essencial da indústria do biodiesel, desempenhando um papel relevante na construção de biorefinarias integrada para a produção de combustíveis e produtos químicos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a geração de H_2 em reatores anaeróbios em batelada utilizando consórcios de bactérias a partir de misturas do glicerol bruto e esgoto sanitário.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Caracterizar o glicerol bruto e identificar os principais contaminantes do resíduo;
- ✓ Obter consórcio de bactérias anaeróbias geradoras de H_2 a partir de lodos granulares de reatores *Upflow anaerobic sludge blanket* (UASB) utilizando pré-tratamento térmico;
- ✓ Avaliar a biodegradabilidade do glicerol bruto a partir do aumento da concentração do resíduo diluído ao esgoto sanitário;
- ✓ Avaliar a produção de ácidos orgânicos, álcoois e 1,3-PD nos reatores anaeróbios.
- ✓ Caracterizar o consórcio bacteriano obtido por técnicas de plaqueamento em meios de cultivo específicos e coloração de Gram.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras de glicerol

O glicerol bruto foi cedido pela Usina Piloto de Produção de Biodiesel, instalada no Instituto de Biotecnologia da UNIARA na cidade de Araraquara – SP e após a coleta foi armazenado em frasco âmbar de 5 litros a temperatura ambiente. O biodiesel produzido na usina tem como matéria-prima o óleo de fritura coletado pela Cooperativa ACACIA (Associação dos Catadores da cidade de Araraquara) em residências, escolas públicas e estabelecimentos comerciais da cidade, atingindo volume mensal de 2 mil litros de óleo coletado. Com 80 litros de óleo de cozinha reciclado a planta piloto gera aproximadamente 15 litros de glicerol bruto (SEQUINEL, 2013).

O biodiesel e o glicerol foram obtidos a partir da reação de transesterificação do óleo com metilato de sódio 25% (v/v) que reagiram a 60° C por 15 min sob agitação hidráulica.

4.2 Amostras de esgoto sanitário

As amostras de esgoto sanitário foram cedidas pelo Departamento Autônomo de Água e Esgotos (DAAE) da cidade de Araraquara - SP. A coleta das amostras foi feita após a passagem do esgoto da estação pelo tratamento preliminar de gradeamento com o objetivo de evitar a presença de sólidos grosseiros. As amostras foram filtradas em papel filtro e mantidas a -20°C (MARONE et al., 2015), até sua utilização. Esse procedimento objetivou a inibição de microrganismos como arqueias metanogênicas (METJE; FRENZEL, 2005), que pudessem estar presentes no esgoto sanitário.

4.3 Caracterização do glicerol bruto e esgoto sanitário

As análises de caracterização foram realizadas antes do início dos ensaios de produção de H₂ para nortear a configuração do reator e a escolha do inóculo. Os parâmetros avaliados na caracterização do glicerol foram: DQO, pH, glicerol livre, umidade e materiais voláteis, teor de água, teor de cinzas, teor de sabões, teor de metanol e matéria orgânica não glicerol (MONG). Para o esgoto sanitário foram realizadas as análises de DQO, pH, temperatura e sólidos totais.

4.3.1 Demanda Química de Oxigênio (DQO)

Esse parâmetro analítico foi utilizado como um indicador da quantidade de matéria orgânica presente no resíduo, uma vez que ele é baseado na estimativa da quantidade de oxigênio consumido durante a oxidação da matéria orgânica presente na amostra, biodegradável ou não, por ação de um agente químico oxidante forte (VALENTE; PADILHA; SILVA, 1997). As amostras foram digeridas em digestor Nanocolor® VARIO C2 a 150° C durante 2 horas e lidas em um espectrofotômetro a 620 nm (APHA, 2005). O preparo da curva de calibração foi descrito no Anexo B.

4.3.2 pH a 10%

Soluções de 50 mL contendo as amostras de glicerol bruto foram preparadas na proporção 1:10 em água destilada, conforme determina a Farmacopéia Brasileira (1988 apud BORGHETTI; KNORST, 2006). Para as medidas foi utilizado um Titulador Potenciométrico Automático Kyoto modelo AT-500N.

4.3.3 Glicerol livre

O glicerol livre presente no glicerol bruto foi quantificado segundo a descrição de Bondioli e Bella (2005), método alternativo à cromatografia líquida. Nele, o glicerol livre ($C_3H_8O_3$) presente na amostra sofreu oxidação na presença de meta periodato de sódio, havendo a formação de formaldeído, que, por sua vez, reagiu com acetilcetona na presença de acetato de amônio, levando à formação de 3,5-diacetil 1,4-dihidrolutidina (Reação de Hantzsch), quantificado por espectrofotometria a 410 nm. Para as análises foram utilizados 0,5 mL da amostra diluída com 1,5 mL de solvente de trabalho (1:1 de água destilada e etanol 95%) e 1,2 mL de solução de periodato de sódio. A mistura foi mantida a 70°C por 1 minuto e resfriada para posterior leitura espectrofotométrica. A descrição detalhada do procedimento está disposta no Anexo C.

4.3.4 Umidade e materiais voláteis

A quantificação da umidade e dos materiais voláteis foi realizada segundo método oficial AOCS Ca 2c-25 (2009a). O teor de umidade determina a massa de água contida na amostra, enquanto os materiais voláteis diz respeito ao que evapora na forma de gás (incluindo umidade) por aquecimento. O cálculo é realizado com a diferença entre a massa da amostra inicial, antes da secagem, e final, após secagem a 130° C em estufa (Eq. 17).

$$\text{Umidade e voláteis [\%]} = \frac{m_i - m_f}{m_{\text{amostra}}} \cdot 100 \quad \text{Eq. 17}$$

Sendo:

m_i = massa inicial da amostra (g);

m_f = massa final da amostra (g);

m_{amostra} = massa da amostra (g).

4.3.5 Água

A quantificação do teor de água nas amostras de glicerol bruto foi realizada pelo procedimento descrito na norma ASTM E203 (2001), utilizando método Karl Fischer Volumétrico Metrohm 870 KF Titrino plus. Tal análise objetivou determinar apenas a presença de água no glicerol, diferente da análise de umidade, que determina a presença de outros componentes que possam estar presentes na amostra.

4.3.6 Sabões

Devido às etapas envolvidas na produção do biodiesel, que inclui uso de bases fortes e matéria-prima com alto teor de ácidos graxos, a determinação de sabões foi realizada para quantificar esse resíduo no glicerol. Foi feita por titulação expressa como oleato de sódio, segundo a descrição da AOCS Cc 17-95 (2009b). 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 titulada com uma solução de ácido clorídrico (0,01M). Essa solução foi misturada a uma amostra de 10 gramas de glicerol bruto mantida a 70°C por 10 minutos. Posteriormente, foi titulada com solução de ácido clorídrico (0,1M). A neutralização completa do sabão leva à mudança de coloração do meio,

que muda do azul (pH indicador) tornando-se amarela esverdeada. Sabendo-se que 1 mL da solução de ácido clorídrico (0,1 M) corresponde a 0,0304 gramas de oleato de sódio ($\text{NaC}_{18}\text{H}_{33}\text{O}_2$), a determinação do teor de sabão foi estipulada a partir da Eq. 18.

$$\text{Teor de sabão como oleato de sódio [\%]} = \frac{V_{\text{ácido}} \cdot 0,0304}{m_{\text{amostra}}} \cdot 100 \quad \text{Eq. 18}$$

Sendo:

$V_{\text{ácido}}$ = volume do ácido utilizado para titular (mL);

M_{amostra} = amostra de glicerol bruto (g).

4.3.7 Cinzas

O procedimento foi realizado conforme a descrição Sequinel (2013) e baseia-se na ABNT NBR 6294. Essa análise fornece informações sobre a presença de resíduos do catalisador utilizado no processo de produção de biodiesel na porção glicerínica. Amostras de 30 gramas de glicerol bruto foram pesadas e aquecidas no bico de Bunsen até que não houvesse mais desprendimento de vapores ou fumaça. Os cadinhos contendo as amostras foram então levados à mufla por 20 minutos a $775^{\circ}\text{C} \pm 25^{\circ}\text{C}$. Após resfriamento à temperatura ambiente, foram pesados para determinação da massa final. O teor de cinzas foi determinado a partir da Eq. 19.

$$\text{Teor de cinzas [\%]} = \frac{M_{cf} - M_{cv}}{M_a} \cdot 100 \quad \text{Eq. 19}$$

Sendo:

M_{cf} = massa do cadinho final (g);

M_{cv} = massa do cadinho vazio (g);

M_a = massa da amostra (g).

4.3.8 Metanol

Foi realizada análise cromatográfica conforme a descrição de Sequinel (2013) utilizando um cromatógrafo gasoso Shimadzu, modelo GC 2010, equipado com injetor *Split/Splitless* e detector de ionização por chama (DIC) de alta frequência, acoplado a um autoamostrador modelo AOC-5000, configurado para amostragem líquida e *headspace*. O injetor PTV e detector DIC foram programados para 300°C . O forno foi programado para 50°C por 3 minutos, com uma rampa de aquecimento de $40^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 250°C , mantida por 2

min. A coluna analítica utilizada foi uma Rtx-1, com Hélio como gás de arraste a um fluxo de 2,5 mL/min (velocidade linear constante de 40 cm/s). Dois gramas da amostra de glicerol foram adicionados a um *vial* de 20 mL com incubação de 60°C por 15 min. Foram injetados 500 µL da amostra do *headspace* usando uma razão de divisão de fluxo de 1:50.

4.3.9 Matéria Orgânica Não Glicerinosa (MONG)

O procedimento encontra-se descrito em Sequinel (2013) e teve como objetivo determinar toda matéria orgânica não glicerinosa, como coprodutos da reação de transesterificação (mono, di, triacilglicerídeos e ácidos graxos livres), por meio da redução do pH até a faixa ácida. Com a adição do ácido ocorreu a separação do glicerol dos outros compostos, havendo a formação de fases. A determinação baseou-se na diferença entre o volume de amostra inicialmente colocada em um tubo Falcon e o volume final após a adição do ácido e de um processo de centrifugação.

Amostra de 5 mL foi diluída em água destilada em um balão volumétrico de 50 mL. Solução de HCl (0,1 M) foi utilizada para a diminuição do pH da solução de glicerol bruto até pH 2. O volume de ácido utilizado foi usado como referência para a análise da amostra sem diluição. Esse valor foi utilizado na Eq. 20 e seu resultado na Eq. 21.

$$V_a = \frac{50}{5 + V_{HCl}} \quad \text{Eq. 20}$$

Sendo:

V_a = volume da amostra (mL);

V_{HCl} = volume de ácido utilizado (mL).

$$V_{HCl_a} = 10 - V_a \quad \text{Eq. 21}$$

Sendo:

V_{HCl_a} = volume de ácido adicionado (mL);

V_a = volume de amostra (mL).

A porcentagem de MONG é finalmente calculada utilizando uma última equação (Eq. 22) depois que a amostra é centrifugada a 500 rpm por 5 minutos. Após esse período, a fase MONG é observada na parte superior do tubo.

$$MONG[\%] = \frac{V_s}{V_a} \cdot 100 \quad \text{Eq. 22}$$

Sendo:

V_s = volume separado de MONG (mL);

V_a = volume de amostra (mL).

4.3.10 Sólidos totais

As análises de sólidos totais foram realizadas com as amostras de esgoto conforme descrito em APHA (2005) antes do processo de filtração. Foram retiradas alíquotas de 50 mL para cada triplicata. Os cadinhos foram calcinados a $550 (\pm 50^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C})$ por 1 hora em forno-mufla e transferidos para o dessecador até atingir a temperatura ambiente (25°C), sendo em seguida pesados (P1). As amostras de esgoto foram homogeneizadas e transferidas para os cadinhos, que por sua vez foram colocados em estufa ($105 \pm 2^\circ\text{C}$), seguindo o mesmo procedimento para pesagem, aguardando o resfriamento da amostra em dessecador seguido da pesagem (P2). a etapa anterior, as amostras foram levadas ao forno-mufla ($550 \pm 50^\circ\text{C}$) por 30 minutos, seguindo o procedimento anterior para pesagem (P3). Para os cálculos foram utilizadas as seguintes equações:

$$\text{Sólidos Totais} = \frac{P_2 - P_1}{V_{\text{amostra}}} \cdot 10^6 \quad \text{Eq. 23}$$

$$\text{Sólidos Fixos} = \frac{P_3 - P_1}{V_{\text{amostra}}} \cdot 10^6 \quad \text{Eq. 24}$$

$$\text{Sólidos Voláteis} = \text{Sólidos Totais} - \text{Sólidos Fixos} \quad \text{Eq. 25}$$

Sendo:

P_1 = Tara da cápsula (g);

P_2 = Cápsula com amostra após secagem (g);

P_3 = Cápsula com amostra após calcinação (g);

V_{amostra} = Volume da amostra (mL).

10^6 = permite a expressão dos resultados em mg L^{-1} .

4.4 Ensaios para produção biológica de H₂ em reatores anaeróbios em batelada

4.4.1 Testes preliminares

Foram realizando testes preliminares com inóculo pré-tratados a quente e testados em produção biológica de H₂ com glicerol bruto (RODRIGUES et al, 2016) provenientes de: (1) lodo granular de reator UASB termofílico da Usina São Martinho tratando vinhaça, localizado em Pradópolis – SP e; (2) lodo granular de reator anaeróbio de fluxo ascendente UASB mesofílico tratando esgoto sanitário, localizado em São José do Rio Preto – SP. O pré-tratamento térmico foi realizando a partir do aquecimento da biomassa a 100°C por 15 minutos (MAINTINGUER et al., 2008a).

Os ensaios utilizando os inóculos (1) e (2) foram conduzidos em pH 5,5 e 7,0 em meio de cultivo PYG modificado (10 g L⁻¹ de glicerina P.A, 5 g L⁻¹ de extrato de levedura, 5 g L⁻¹ de extrato de carne e 5 g L⁻¹ de peptona). A modificação do meio de cultivo PYG referiu-se à alteração na fonte de carbono original, substituindo a glicose por glicerina. Essas reativações (ou pré-cultivos) foram realizadas por sucessivas vezes durante o período de 3 semanas e cada uma delas durou 48 horas a 37°C. O pH inicial dos meios de reativação foi ajustado em 7,0 com adição de solução de NaOH (0,1 M) ou HCl (0,1 M).

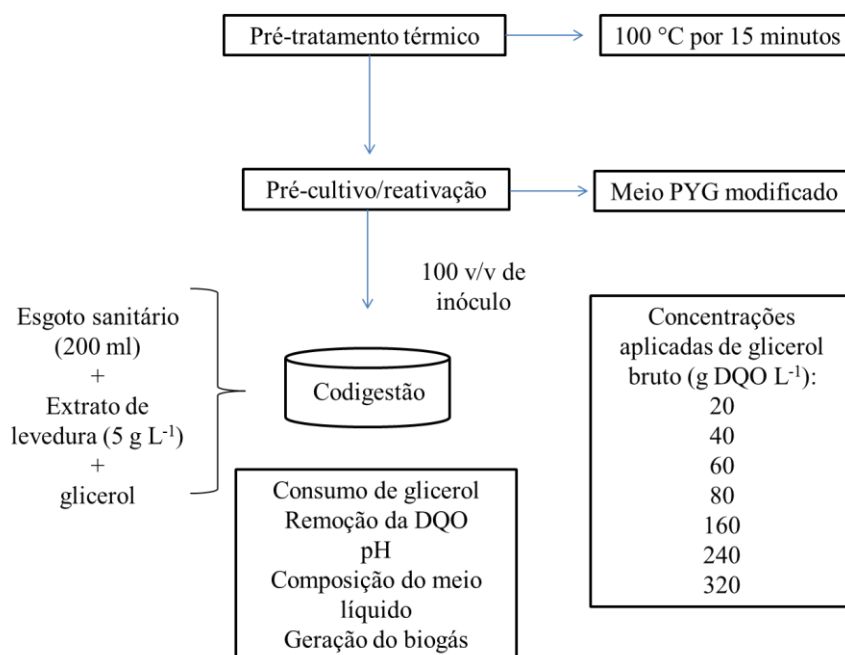
Também foram testadas diferentes proporções do inóculo:20%, 50% e 100% (v/v) nas diferentes concentrações de glicerol (g DQO L⁻¹): 20, 40, 60, 80, 160, 240 e 320. O cálculo da concentração do inóculo foi realizado a partir da biomassa que era reativada em reator com volume equivalente ao volume dos reatores de trabalho (200 mL) e toda biomassa obtida dessa reativação foi aplicada na montagem dos reatores de trabalho.

4.4.2 Montagem dos reatores

Reatores anaeróbios em batelada foram montados em duplicatas e alimentados com 5 g L⁻¹ de extrato de levedura e glicerol bruto diluídos em 200 mL de esgoto sanitário. Diferentes concentrações de glicerol bruto foram usadas (g DQO L⁻¹): 20, 40, 60, 80, 160, 240 e 320 (Figura 8). Os reatores possuíam volume útil de 200 mL e 50 mL de *headspace* preenchido com N₂ (99,99%) por borbulhamento durante 15 minutos. Esse procedimento foi realizado para garantir o ambiente anaeróbio no reator. Todos os reatores foram mantidos a 30°C e pH inicial 7,0, sem agitação. O extrato de levedura foi utilizado para garantir a

atividade metabólica do consórcio bacteriano em utilizar glicerol na produção de H_2 ; uma vez que esse componente possui composição rica em aminoácidos essenciais, fonte de minerais e vitaminas, favorecendo o crescimento de bactérias fermentativas (MAINTINGUER et al., 2008b; ROSSI et al., 2013).

Figura 8 - Esquema de montagem e operação dos reatores



Fonte: Elaborada pela autora.

Na montagem dos reatores anaeróbios em batelada foi utilizado inóculo proveniente de lodo granular de reator UASB da avícola DAKAR, localizada na cidade de Tietê (SP), utilizado no tratamento de resíduos de avicultura. Foi utilizado 100% (v/v) de inóculo com biomassa foi pré-tratada a quente e reativada em meio de cultivo PYG modificado, em pH 7,0 e 37°C por período de 48 horas.

No início e no final de cada ensaio foram retiradas amostras para análises de DQO, glicerol livre, pH e ácidos orgânicos e álcoois.

4.4.3 Sistema de medição volumétrica de H_2

Para a quantificação do biogás foi montado dois sistema de medição volumétrica adaptado do modelo descrito em Aquino e colaboradores (2007). Um dos sistemas foi montado com o auxílio de mangueiras que conectaram o reator a um tubo de PVC preenchido com pastilhas de NaOH. A saída do tubo foi conectada a outro recipiente contendo água, que

era deslocada para o recipiente coletor conforme ocorria a geração do biogás. Pastilhas de NaOH foram usadas para absorção do CO₂ (Eq. 26), garantindo que todo o volume de água que fosse empurrado para fora do recipiente correspondesse apenas a H₂. Todo o sistema era vedado para evitar perdas de gás pelas conexões.



Foi feita uma estimativa da quantidade teórica de pastilhas necessárias para garantir que todo o CO₂ produzido fosse retido na coluna (Tabela 4). A concentração da DQO dos reatores foi estimada a partir de curva de calibração utilizando KHP – hidrogenoftalato de potássio (C₈H₅O₄K) como padrão. Como dito anteriormente, a DQO indica a presença de substratos orgânicos, incluindo o glicerol. Sabe-se que na oxidação de 1 mg L⁻¹ do KHP exerce DQO teórica de 1,176 mg O₂ L⁻¹ (AQUINO et al., 2007). Essa relação é então usada para calcular a quantidade de matéria orgânica (g de glicerol) no reator a partir da sua DQO inicial. Obtendo essa estimativa, calculou-se a quantidade em mols de CO₂ gerado, sendo a geração de CO₂ por mol de glicerol uma reação 1:1 de acordo com as equações envolvendo as rotas metabólicas descritas na literatura, algumas delas descritas nas Eqs. 3, 4, 5 e 6.

A Eq. 26 indica que 2 mols de NaOH são necessários para retenção de 1 mol de CO₂, logo, a quantidade de mols de glicerol é multiplicada por 2, obtendo-se o número de mols de NaOH, que depois transformado em massa (g).

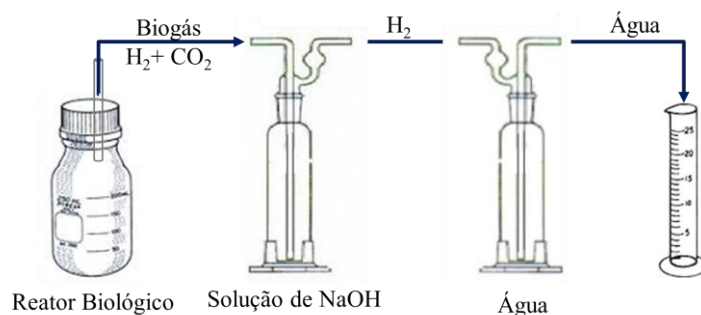
Tabela 4 - Valores teóricos de produção de CO₂, quantidade de NaOH necessária para reter todo o CO₂ potencialmente produzido durante cada ensaio e a quantidade utilizada para montagem dos ensaios

Reator (g DQO L⁻¹)	CO₂ teórico produzido (mols)	NaOH teórico (g)	NaOH utilizado (g)
20	0,184	14,77	200
40	0,369	29,52	200
80	0,738	59,08	200
160	1,477	118,19	200
240	2,216	177,28	200
320	2,954	236,38	200

Fonte: Elaborada pela autora.

A quantidade de 200 g de NaOH foi utilizada porque era a quantidade necessária para preencher o tubo onde as pastilhas foram armazenadas. Elas eram substituídas ao final dos ensaios para evitar a saturação com a passagem do CO₂ pelo tubo.

No segundo sistema montado, as pastilhas de NaOH foram substituídas por um tubo de vidro vertical contendo uma entrada e uma saída de gás, que por sua vez borbulhava numa solução 15% de NaOH (Figura 9).

Figura 9 - Sistema de medição volumétrica para quantificação do H₂ gerado

Fonte: Adaptado de Aquino et al., 2007.

Em nenhum dos sistemas os reatores foram mantidos sob agitação e, por isso, antes das medidas, era realizada agitação manual, forçando a saída do biogás presente no *headspace*. As coletas foram feitas com o auxílio de uma proveta de 10 mL.

O volume de gás foi diretamente relacionado com a produção de H₂. Para a descrição dos resultados, o volume do gás, representado pelo volume de água que saía do sistema foi convertido a n° mmol de H₂ L⁻¹ a partir da equação dos gases ideais (Eq. 27).

$$P = \frac{n(H_2)RT}{V} \quad \text{Eq. 27}$$

Sendo:

P = pressão em Pascal (101325×10^5 Pa);

n = número de mols da amostra gasosa;

V = volume em m³

R = constante universal dos gases perfeitos (8,3144621 J/ mol*K);

T= temperatura em Kelvin.

4.4.4 Equação de Gompertz

Foi realizado o ajuste dos dados da produção acumulada de H₂ a partir da equação de Gompertz modificada (Eq. 28) por Lay, Li e Noike (1998). Este modelo matemático descreve o progresso da produção cumulativa de H₂ em sistemas batelada, levando em consideração a relação entre crescimento e o metabolismo bacteriano. A partir dele é possível estimar parâmetros como o potencial de produção de H₂ (P); a taxa máxima de produção de H₂ (R_m) e tempo de início da produção do biogás (λ).

$$H_{(t)} = P \cdot \exp \left\{ - \exp \left[\frac{R_m \cdot e}{P} \cdot (\lambda - t) \right] \right\}$$

Eq. 28

Sendo:

P = potencial de produção de H₂ (mmol/L cultura);

R_m = taxa máxima de produção de H₂ (mmol/L cultura.h);

λ = Tempo de início de geração de H₂ (h);

e = vale 2,718281828;

t = tempo (h).

4.5 Análises físico-químicas

4.5.1 Análise qualitativa do biogás

A composição do gás gerado foi qualitativamente confirmada por cromatografia gasosa para garantir que não havia presença de metano no biogás. As amostras de gás foram coletadas em intervalos de 8 horas no *headspace* dos reatores anaeróbios, utilizando uma seringa *gastight* com trava e volume de 1 mL. Foi utilizado cromatógrafo a gás com sistema TOGA da Thermo Trace GC Ultra, equipado com injetor *split/splitless*, TCD utilizado para detecção do H₂ e N₂, e FID para detecção do CH₄ e CO₂. Para melhor separação dos analitos, foram utilizadas duas colunas: uma Carboxen 1006 plot 30 m x 0,53 mm i.d., e uma Rt-MSieve 5A 30 m x 0,53 mm i.d. O Injetor e detector TCD ficaram a 150 °C e o detector FID a 250°C. Programação de temperatura do forno foi de 50°C (4,5 min), seguido de aquecimento a 40°C/min até 180 °C (1,5 min) e resfriamento a 50°C/min até 50 °C (3,15 min). Gás de arraste utilizado foi o argônio a 1,5 mL/min e fluxo de split a 60 mL/min (RODRIGUES et al., 2016).

4.5.2 Quantificação do 1,3-PD

As análises de quantificação de 1,3-PD foram realizadas por cromatografia líquida nos laboratórios associados do IPBEN – Laboratório Associado – IB Unesp Rio Claro empregando um cromatógrafo líquido Shimadzu de alto desempenho, serie Prominence, com detector de índice de refração. A coluna utilizada foi a Rezex ROA (300 x 7,8 mm) da

Phenomenex, eluída com H_2SO_4 0,005N como fase móvel, fluxo de 0,6 mL/min, volume de injeção de 5 μL e temperatura de 65°C.

4.5.3 Quantificação dos compostos orgânicos

As gerações de ácidos orgânicos e álcoois foram determinadas por cromatografia gasosa, utilizando um cromatógrafo 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*. Foi utilizado 2,5 mL de amostra e 0,500 mL no *headspace*. A coluna analítica utilizada foi uma RTX-1 (30 m x 0,32 mm x 3,0 μm) e gás hélio como gás de arraste (1 mL min^{-1}) (RODRIGUES et al., 2016). O preparo da curva de calibração foi realizado conforme descrito no Anexo A.

4.6 Microscopia

A análise microbiológica do inóculo foi feita através de exame de microscopia óptica de luz comum em amostras oriundas dos reatores durante reativação celular nos Laboratórios de Processos Biológicos – LPB – EESC – São Carlos – SP. As amostras visualizadas foram preparadas para coloração de Gram conforme o procedimento descrito em Ribeiro e Soares (1993). Esse método permitiu classificar as bactérias em Gram positivas e Gram negativas. As imagens foram capturadas por meio de câmera Optronics e software Image Pro-Plus versão 4.5.

4.7 Quantificação de culturas anaeróbias por plaqueamento

O inóculo do reator UASB da avícola DAKAR foi reativado em meio PYG modificado durante 24 horas, em seguida, foi retirada 1 mL de amostra do inóculo para realização das diluições seriadas em 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} utilizando solução salina de tampão fosfato (PBS). As diluições foram espalhadas sobre placas de ágar contendo meios específicos. O meio Neomicina Nagler (NN) foi usado para a enumeração de *Clostridium* sp., o meio Desoxicolato Sulfeto de Hidrogênio Lactose (DHL) para enumerar *Enterobacter* sp. e o meio Ágar Lactobacilli Selectiva (LBS) para o crescimento de colônias de *Lactobacillus* sp.

(SONG et al., 2012). As placas foram incubadas e mantidas em anaerobiose (Figura 10) a 37°C durante 3 dias ou até o surgimento das colônias. Para assegurar a confiabilidade dos resultados, todas as diluições foram realizadas em triplicata. A descrição detalhada do procedimento está disposta no Anexo D.

Figura 10 - Plaqueamento em meio de cultivo específico em jarra de anaerobiose



(a) indicador de anaerobiose (ausência de O_2 - coloração branca)

Fonte: Própria autora.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do glicerol

Os parâmetros avaliados na caracterização variam de acordo com a origem do resíduo e dependem das condições empregadas durante a transesterificação. As características da matéria-prima, a quantidade e o tipo de catalisador, e a quantidade de metanol são alguns fatores que afetam diretamente a composição do glicerol bruto. Tipicamente ele contém 50-70% de glicerol livre, 10-20% de metanol, 5-10% de sais, <3-10% de água, <1-5% de ácidos graxos livres e <1-5% de MONG (BOHON et al., 2011).

O resíduo utilizado para os ensaios possuía 10% de glicerol livre; o restante eram impurezas advindas da reação de transesterificação, principalmente umidade, materiais voláteis, cinzas, MONG, metanol e sabões (Tabela 5), o que confirma a baixa eficiência de conversão da reação de transesterificação que deu origem ao resíduo. É comum observar porcentagens de glicerol livre bastante superiores na literatura, com valores entre 45% (MANGAYIL et al., 2012), 47,5% (MARU et al., 2016), 65% (GONZÁLEZ-PAJUELO; ANDRADE; VASCONCELOS, 2005), 75,5% (ZENG, 1996) e 85% (MU et al., 2006; SZYMANOWSKA-POWAŁOWSKA, 2014).

Tabela 5 - Caracterização do glicerol bruto utilizado para produção de H₂

Parâmetro	Resultado*
DQO	1.847,43 g L ⁻¹ (± 25,64)
pH	10,0 (± 0,2)
Glicerol livre	183,3 g L ⁻¹ (± 2,0)
Umidade e materiais voláteis	67,11% (± 0,00)
Água	21,0% (± 0,3)
Sabões	22,0% (± 0,2)
Cinzas	3,0% (± 0,1)
Metanol	19,5% (± 0,3)
MONG	36,3% (± 0,1)

* Valores médios e desvio padrão para triplicatas.

Fonte: Elaborada pela autora.

Também foi observada elevada carga orgânica expressa em DQO (1.847,43 g L⁻¹), demonstrando a necessidade da diluição a fim de favorecer a degradação do resíduo e geração de H₂ a partir dele. A DQO apresentada é bastante superior à de outros resíduos apresentados na literatura, como o utilizado por Selembo e colaboradores (2009), que apresentou DQO de 1300 mg L⁻¹, justificado pela utilização de óleo de soja provavelmente refinado, enquanto a matéria-prima do resíduo deste trabalho foi óleo de fritura reciclado.

Grande parte da carga orgânica foi resultante da presença de metanol e sabões. O metanol é o álcool adicionado em excesso para favorecer a formação de ésteres alquílicos durante o processo de transesterificação. Os sabões são formados em pH neutro a básico, na presença dos catalisadores alcalinos e AGL's presentes na matéria-prima (óleo de cozinha residual) e ficam misturados ao glicerol (SEQUINEL, 2013). O pH 10 verificado no resíduo (Tabela 5) é característico dos processos de transesterificação que empregam catalisadores básicos e provavelmente está relacionada com a elevada porcentagem de sabões. Apesar disso, é comum encontrar gliceróis bruto com pH próximo a 7, como no trabalho de Maru e colaboradores (2016), ou com pH extremamente alcalino (pH ~ 12), como encontrado por Mangayil e colaboradores (2012).

O teor de água e cinzas apresentado por Maru e colaboradores (2016) foram superiores aos valores encontrados no presente trabalho, 21% e 3%, respectivamente; enquanto o valor de MONG foi 5 vezes superior, com 36,3%. A presença de água no glicerol é comum por ele ser altamente higroscópico, porém, teores acima de 10% podem ser atribuídos à incorporação de água durante a etapa de purificação úmida (lavagem), bastante comum em algumas usinas de biodiesel (SEQUINEL, 2013). O MONG se refere aos coprodutos da transesterificação e também é um indicativo da eficiência da transesterificação. Comumente o glicerol bruto possui <1-5% de MONG (BOHON et al., 2011), mas não é raro a literatura apresentar valores acima dessa faixa, como observado neste trabalho, em Maru e colaboradores (2016), citado anteriormente, e Hu e colaboradores (2012) que encontraram valores variando entre 26,1% a 55,8% após a caracterização de 5 amostras de glicerol bruto derivadas da produção biodiesel.

O teor de cinzas é referente à composição inorgânica do resíduo e varia principalmente em função da quantidade de catalisador e, de forma menos expressiva, da composição da matéria-prima. Foi observado 3% em composição de cinzas na composição do glicerol, valor abaixo dos encontrados na literatura, 6% (SZYMANOWSKA-POWAŁOWSKA, 2014) e 4,8% (MARU et al., 2016).

Concentrações elevadas de metanol e sabões puderam ser observadas na caracterização do resíduo e são duas variáveis importantes, pois ambos são considerados inibidores crescimento microbiano de maior potencial do que quando comparados às cinzas, por exemplo. O glicerol apresentou porcentagens elevadas desses dois contaminantes, 19,5% e 22,0% respectivamente, o que provavelmente desfavoreceu a produção de H₂, principalmente nos reatores onde foi aplicado maior volume do resíduo.

Kivistö, Santala e Karp (2013) avaliaram a tolerância de *Halanaerobium saccharolyticum* e *Clostridium butyricum* ao glicerol bruto e puro em sistema batelada em

uma faixa de concentração variando entre 0-40 g L⁻¹. O metanol e os sabões foram apontados como os principais inibidores da atividade dos microrganismos, enquanto a presença de sais foi um fator positivo, pois diminuiria o risco de contaminações por espécies consumidoras de H₂. A concentração crítica desses dos inibidores varia de acordo com a espécie e as condições de cultivo. Mangayil e colaboradores (2012) utilizaram o glicerol bruto com 30% de metanol e observaram uma tolerância de até 1 g L⁻¹ do glicerol bruto para culturas mistas em reatores batelada operando com pH 6,5, a uma temperatura de 40 ° C, com produtividade de 1,1 mol H₂/mol de glicerol consumido. A presença dos contaminantes além de inibir a atividade dos microrganismos também prejudica o rendimento dos processos que utilizam culturas mistas, pois diferentes espécies podem utilizar o substrato ou os produtos gerados para a produção metabólitos secundários. Ambos os casos resultam na diminuição dos rendimentos do produto de interesse.

Zeng (1996) caracterizou amostras de glicerol bruto e observou concentrações de 13,3% de sabões e 3,5% metanol, valores referentes à concentração de contaminantes mais satisfatórios que as encontradas no presente trabalho, indicando maior pureza do resíduo, mesmo se tratando de um trabalho menos recente, quando as tecnologias para produção de biodiesel eram menos desenvolvidas.

Alguns tratamentos podem ser empregados para diminuir a interferência dos contaminantes, tais como tratamento ácido, para eliminar os ácidos graxos livres; a filtração, para eliminar os sais; evaporação a vácuo, para separar o metanol; e eventualmente, lavagem com *n*-hexanol para eliminar as impurezas remanescentes (KIVISTÖ; SANTALA; KARP, 2013). Esses procedimentos não foram empregados na metodologia, pois o objetivo era avaliar o glicerol na forma bruta, evitando etapas que causassem o encarecimento do processo. Pelo mesmo motivo não foram empregados meios sintéticos de cultivo, sendo utilizado apenas o extrato de levedura.

Caracterizar a fonte de carbono a ser utilizada é útil para identificar os substratos apropriados para codigestões. Dependendo de sua origem (agropecuária e dejetos, resíduos municipais, alimentos e resíduos industriais), pode ocorrer o predomínio de compostos orgânicos específicos, embora a composição exata dos substratos seja difícil de conhecer. A análise química fornece informações úteis para o desenvolvimento das abordagens tecnológicas no tratamento e utilização dos substratos nos processos (HAGOS et al., 2016).

5.2 Caracterização do esgoto sanitário

A partir dos resultados da caracterização do esgoto foi possível observar carga orgânica reduzida devido ao seu elevado grau de diluição (Tabela 6). Se comparado com o glicerol, sua carga orgânica (potencial poluidor), em termos de DQO, é quase 5.000 vezes menor. Essa é uma característica desejável uma vez que o esgoto foi usado para diluir o glicerol como forma de evitar a inibição do consórcio microbiano (VIANA, 2011). A diluição do glicerol em esgoto sanitário foi realizada para garantir que o acúmulo de metabólitos não diminuísse o potencial de produção de H_2 . Em aumento de escala, o uso do substrato com adição de esgoto sanitário é uma alternativa barata e sustentável ao uso de água potável no processo. O esgoto sanitário ainda contém proteínas, gorduras, hidratos de carbono e nutrientes essenciais como nitrogênio e fósforo (JORDÃO; PESSOA, 1995), que podem favorecer a ação das bactérias anaeróbias na geração de H_2 .

O pH próximo de 7,0 verificado no esgoto também é um fator positivo, já que essa faixa é ótima para o crescimento da maioria dos microrganismos, além de dispensar a necessidade de correção do pH já que apresentou pH próximo ao de trabalho deste estudo.

Tabela 6 - Resultados dos ensaios realizados na caracterização do esgoto sanitário utilizado para produção de H_2

Parâmetro	Resultado*
pH	6,90 ($\pm 0,2$)
DQO	0,372 g L ⁻¹ ($\pm 0,08$)
Temperatura	33° C ($\pm 0,01$)
Sólidos totais	0,55 mg L ⁻¹ ($\pm 0,01$)

* Valores médios e desvio padrão para triplicatas.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.3 Ensaios de produção de H_2

5.3.1 Testes preliminares

Os inóculos utilizados nos testes preliminares com adições de glicerol bruto testadas não apresentaram bons rendimentos de produção de H_2 . Mesmo com alteração do pH de 5,5 para 7,0 não foi observada geração de H_2 . Durante os testes com o inóculo (1) do reator UASB termofílico da Usina São Martinho ainda foi detectada a produção de CH_4 . De acordo com tais observações, ambos os inóculos foram substituídos pelo inóculo advindo do lodo granular de reator UASB da avícola DAKAR.

5.3.2 Consumo do glicerol

O consumo do glicerol ocorreu em todos os reatores (Tabela 7). O pior desempenho foi verificado nos reatores alimentados com 320 g DQO L⁻¹. Contrariamente, consumos mais elevados foram verificados nos reatores alimentados com 20 g DQO L⁻¹. Observou-se uma tendência na diminuição do consumo do glicerol (%) com as adições de glicerol, demonstrando que elevações nas concentrações do resíduo podem elevar, consequentemente, a concentração dos contaminantes, que representam uma fonte de interferentes e inibidores da atividade biológica, diminuindo assim o consumo desse substrato. A inibição ainda pode ocorrer devido ao aumento da carga orgânica no sistema (BIEBL et al., 1999; CHEN, W. et al., 2005).

Apesar da porcentagem de consumo ter sido reduzida em função do aumento da concentração do glicerol bruto, o consumo do glicerol livre expresso em gramas aumentou, mostrando que, apesar da eficiência ter sido afetada, foi observada uma tolerância do consórcio ao glicerol.

Tabela 7 - Quantificação do glicerol livre durante operação dos reatores

Reator (g DQO L⁻¹)	Concentração inicial (g glicerol livre L⁻¹)	Concentração final (g glicerol livre L⁻¹)	Consumo (%)	Consumo (g)
20	0,62 (± 0,08)	0,01 (± 0,00)	98,19	0,61
40	1,20 (± 0,00)	0,28 (± 0,00)	76,92	0,92
60	1,81 (0,12)	0,39 (± 0,10)	78,52	1,42
80	1,97 (± 0,03)	0,54 (± 0,11)	72,31	1,43
160	3,76 (0,14)	1,16 (0,12)	69,30	2,60
240	7,00 (± 1,48)	2,53 (± 0,08)	63,90	4,47
320	13,55 (± 0,27)	5,19 (± 0,33)	61,67	8,36

Fonte: Elaborada pela autora.

O conteúdo de glicerol livre no glicerol é um parâmetro importante e deve ser considerado no planejamento de sua aplicação em processos biológicos, pois sua variação é ampla e depende da eficiência do processo de produção do biodiesel (SEQUINEL, 2013; MAINTINGUER et al., 2015; SARMA et al., 2012). Considerando que o glicerol utilizado no presente estudo adveio de processo que utilizou óleos vegetais domésticos com grau de oxidação elevado, seu consumo pelas bactérias poderia ser comprometido, uma vez que a aplicação de óleos mais oxidados pode comprometer a eficiência da transesterificação e, consequentemente, ocorrer maior formação de matéria não glicerínica.

5.3.3 Remoção da DQO

A eficiência de remoção de DQO é uma medida de estabilização de resíduos orgânicos. Em todos os reatores houve a redução da carga orgânica inicial, que foi crescente e proporcional às adições de glicerol (Tabela 8).

Tabela 8 - Quantificação da DQO durante a operação dos reatores anaeróbios

Reator (g DQO L⁻¹)	Início da operação (g L⁻¹)	Final da operação (g L⁻¹)	Remoção (%)	Remoção (g)
20	22,66 (± 0,27)	16,90 (± 0,27)	24,52	5,76
40	42,00 (± 0,13)	31,80 (± 0,68)	23,62	10,2
60	62,41 (± 0,98)	41,99 (± 0,87)	32,71	20,42
80	80,35 (± 2,18)	45,95 (± 1,91)	42,81	34,40
160	163,45 (± 1,62)	64,42 (± 0,12)	60,58	99,01
240	245,37 (± 1,64)	81,60 (± 1,56)	66,74	163,01
320	332,86 (± 5,40)	66,99 (± 5,55)	79,81	265,87

Fonte: Elaborada pela autora.

A diminuição da DQO se deveu provavelmente à produção de CO₂, que é gerado dentro das principais rotas de catabolismo do glicerol (Eqs. 2, 3, 4 e 5). O CO₂ foi o único metabólito na forma gasosa contendo carbono (forma inorgânica), já que não foi detectada a presença de CH₄ no biogás, conforme descrito a seguir. Todos os outros metabólitos permaneceram na fase líquida, principalmente sob a forma de ácidos orgânicos e álcoois. Tal evidência foi confirmada a partir das análises desses metabólitos, descrito a seguir.

Estes resultados indicaram que o aumento da carga orgânica não afetou de forma adversa a qualidade da digestão do glicerol em termos de DQO, uma vez que, apesar da diminuição dos rendimentos da geração de H₂, houve o aumento da remoção da DQO.

5.3.4 Geração de H₂

Os resultados obtidos a partir do sistema de deslocamento volumétrico utilizando solução 15% de NaOH foram mais satisfatórios em relação ao sistema com pastilhas de NaOH; sendo assim, todos os resultados apresentados são referentes ao sistema de deslocamento volumétrico com NaOH na fase líquida.

Observou-se relação inversa entre a concentração de glicerol e a eficiência na produção de H₂. Ou seja, o rendimento de H₂ foi mais elevado nos reatores alimentados com concentrações mais reduzidas de glicerol (20 g DQO L⁻¹) e os rendimentos mais reduzidos de

H₂ foram verificados nos reatores alimentados com quantidades mais elevadas de glicerol (320 g DQO L⁻¹) (Tabela 9).

O rendimento da geração de H₂ (mol H₂/ mol de glicerol consumido) foi afetado diretamente pelo aumento da concentração do substrato, havendo redução contínua e numericamente observável, enquanto o mesmo não ocorreu em relação à produção acumulada (mmol L⁻¹ de H₂). Com o aumento da disponibilidade da fonte de carbono esperava-se que ocorresse também a elevação no rendimento de H₂, o que não foi verificado, assim como a porcentagem do consumo de glicerol livre que também foi afetada. No reator alimentado com 240 g DQO L⁻¹, por exemplo, foi verificada a geração volumétrica de H₂ mais elevada que nos demais reatores de carga orgânica reduzida (Tabela 9). A diminuição da eficiência na geração de H₂ pode ser atribuída a inibição da atividade microbiana ou às mudanças de rota metabólica, provocadas pelo aumento da concentração do resíduo, ou ainda pelo aumento da concentração dos contaminantes presentes no glicerol bruto.

Tabela 9 - Valores acumulados da produção de H₂

Reator (g DQO L⁻¹)	Produção (mmol L⁻¹ de H₂)	Rendimento (mol H₂/mol de glicerol)
20	19,3	2,92
40	23,9	2,45
60	25,6	1,66
80	22,9	1,48
160	23,2	0,56
240	33,4	0,69
320	29,3	0,21

Fonte: Elaborada pela autora.

Vale ressaltar que, mesmo com a diminuição do rendimento da geração de H₂, em todas as concentrações testadas ocorreu a produção do H₂, assim como a remoção da carga orgânica (%), demonstrando que o consórcio microbiano mostrou-se tolerante às adições do glicerol bruto, já que ambos os parâmetros estavam diretamente relacionados com a transformação da matéria orgânica em CO₂ e em compostos orgânicos.

Não foi detectada a presença de CH₄ no biogás, demonstrando que o substrato foi convertido principalmente à CO₂, ácidos orgânicos e 1,3-PD. A remoção da DQO (%) foi devido à formação de CO₂, carbono inorgânico removido do sistema, conforme descrito anteriormente.

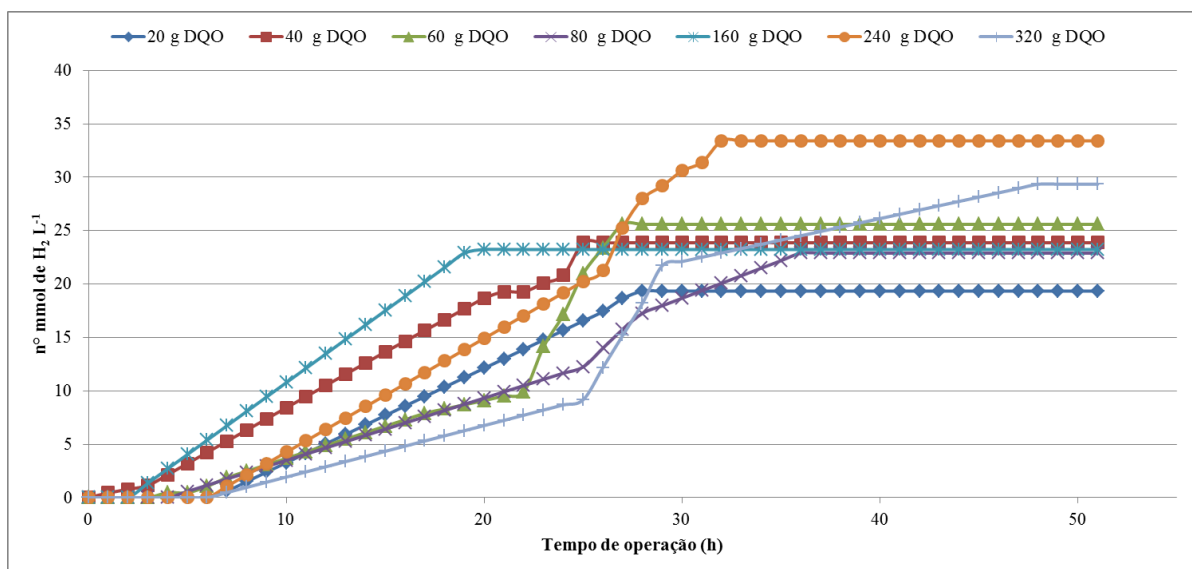
Ito e colaboradores (2005) também observaram a tendência de diminuição do rendimento de H₂ em função do aumento da concentração do glicerol bruto como substrato,

conforme observado no presente estudo. Os autores utilizaram um reator batelada de coluna de vidro cilíndrico (altura de $2,7 \times 17$ cm) com leito empacotado, células autoimobilizadas de *Enterobacter aerogenes* com volume de trabalho de 60 mL contendo meio de cultivo complexo em pH 6,8 e tampão fosfato. Foram testadas as seguintes concentrações de glicerol bruto: 1,7; 3,3; 10,0 e 25,0 g L⁻¹. A partir dos resultados, os autores identificaram uma relação direta entre o aumento da concentração do glicerol bruto e a redução dos rendimentos de H₂, sendo que para concentrações mais reduzidas de glicerol aplicadas (1,7 g L⁻¹) ocorreu o maior produção de H₂ (63 mmol/L/h), enquanto que em concentrações mais elevadas do resíduo foram verificados os menores rendimentos de H₂, etanol e acetato e produções mais elevadas de lactato. Apesar da produção acumulada do trabalho citado ter sido maior que a dos resultados reportados neste trabalho, deve-se considerar que os autores utilizaram cultura de pura de *Enterobacter aerogenes* e um glicerol bruto estéril aplicado em menor concentração e diluído em um meio de cultivo sintético.

Comparando a produção de H₂ com o consumo do glicerol, Chen e colaboradores (2005) afirmaram que o consumo do substrato e a produção de H₂ podem não ocorrer concomitantemente, pois parte da assimilação do substrato acontece para o ganho de biomassa, onde a disposição de elétrons no meio favorece a biossíntese, indisponibilizando elétrons para ação da enzima hidrogenase na produção de H₂. No estudo foi utilizada cultura pura de *Clostridium butyricum* em meio de cultivo complexo enriquecido com ferro e sacarose como fonte de carbono, uma concentração inicial de sacarose de 20 g DQO L⁻¹ (17,8 g L⁻¹) e pH de 5,5. A evolução da produção do H₂ começou quando o crescimento celular entrou na fase exponencial média e atingiu a taxa de produção máxima (2,78 mol H₂/ mol de sacarose) na fase estacionária. No ensaio 20 g DQO L⁻¹ do presente trabalho, foram obtidos rendimentos superiores (2,92 mol H₂/ mol DQO consumida) utilizando consórcio bacteriano e empregando glicerol bruto - um resíduo contendo impurezas - , mesmo sem adição meio de cultivo.

Não foi observada uma relação direta entre o aumento da concentração de glicerol bruto e o tempo de início de geração de H₂. Para as concentrações de 20, 40, 60, 80, 160, 240 e 320 g DQO L⁻¹ foram observados os respectivos tempos de início de geração (h): 7,0; 1,0; 4,0; 6,0; 3,0; 7,0; e 7,0 (Figura 11).

Figura 11 - Produção acumulada temporal de H₂ (nº mmol H₂ L⁻¹)



Fonte: Elaborada pela autora.

Outros autores que utilizaram reatores anaeróbios alimentados com sacarose sob agitação não verificaram geração de H₂ enquanto que os reatores mantidos em repouso a geração de H₂ foi confirmada; provavelmente a agitação não seja um parâmetro crucial para a geração do H₂ (MAINTINGUER et al., 2008a).

A utilização do sistema de deslocamento volumétrico foi uma alternativa simples e barata às análises cromatográficas, utilizadas rotineiramente no acompanhamento da composição do biogás. Com tal substituição, neste trabalho as análises de cromatografia gasosa foram utilizadas apenas para monitorar a presença de CH₄.

O sistema de deslocamento volumétrico é mais popular nos trabalhos de geração de CH₄ (ROCHA et al., 2001; ALVES et al., 2005), no entanto outros autores já utilizaram o método no monitoramento da geração de H₂ e obtiveram resultados satisfatórios (KALIA et al., 1994; MARONE et al., 2015; SIQUEIRA; REGINATTO, 2015).

5.3.5 Cinética da produção de H₂

Os resultados obtidos a partir do modelo de Gompertz serviram para reafirmar os resultados já discutidos anteriormente quanto às produções máximas para cada reator (Tabela 10) e forneceu a taxa máxima de produção de H₂, maior nos reatores alimentados com 160 e 240 g DQO L⁻¹, respectivamente.

Tabela 10 - Dados da cinética da geração de H₂ a partir do modelo de Gompertz

Reator (g DQO L ⁻¹)	Parâmetros			R ²
	P (mmol)	R _m (mmol L h ⁻¹)	λ (h)	
20	19,91	1,14	8,17	0,994
40	24,51	1,28	3,54	0,993
60	27,00	1,50	11,41	0,960
80	25,52	0,88	8,36	0,986
160	23,56	1,78	3,57	0,993
240	35,82	1,54	9,37	0,985
320	31,60	1,23	14,10	0,982

P - Potencial de Produção de H₂, R_m - Taxa Máxima de Produção de H₂, λ – início da produção de biogás e R² obtido pela equação de Gompertz modificada.

Fonte: Elaborada pela autora.

O intervalo entre o início de operação dos reatores e a produção de biogás variou de 3,54 a 14,10 horas. Nos reatores alimentados com 320 g DQO L⁻¹, observou-se 14,10 h, seguido pelos reatores alimentados com 60 g e 240 g DQO L⁻¹, com 11,4 h e 9,37 h, respectivamente. Intervalos elevados de produção eram esperadas nesse tipo de operação quando comparado aos sistemas pressurizados, uma vez que ocorre a abertura do reator após o fluxo de N₂ para o acoplamento no sistema de monitoramento de biogás, possibilitando a entrada de ar, e, conseqüentemente, de oxigênio, podendo retardar a condição anaeróbia.

Antes de cada coleta era realizada agitação manual, forçando a saída do gás presente no *headspace*, já que o sistema não foi mantido sob agitação. O intervalo de produção do biogás também pode ter sido consequência da necessidade do acúmulo de gás no *headspace* para criar pressão suficientemente capaz de deslocar um volume de água para o recipiente coletor (Figura 9).

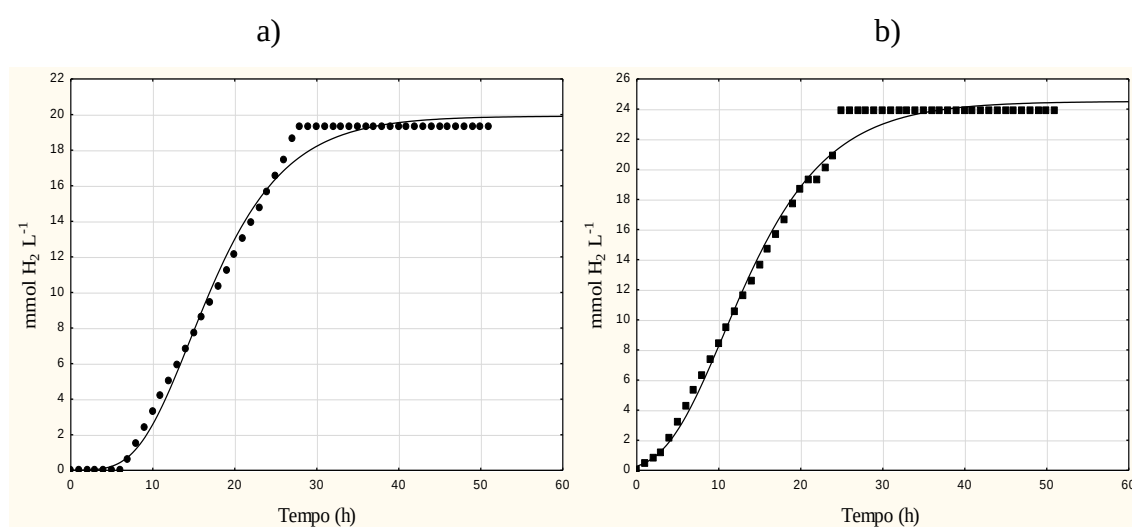
Sharma, Parnas e Li (2011) testaram 3 g L⁻¹ de glicerol purificado e glicerol puro em sistema batelada e inóculo proveniente da exploração de mirtilo. O glicerol purificado possuía duas classificações de purificação; B1 com adição de ácido fosfórico ao glicerol bruto e; B2 por remoção do metanol contido no glicerol bruto em processo de evaporação. Após os estágios de purificação foram verificados em B1 37% de glicerol, 56% de metanol, e 7% de componentes desconhecidos e em B2 80% de glicerol, 8% de metanol e 12% de componentes desconhecidos. Os autores observaram o início da geração de H₂ em 21 horas utilizando glicerol puro; tempo mais elevado que os observados neste trabalho com glicerol bruto. Nas mesmas condições anteriores, foi observado um aumento de 12 horas utilizando o glicerol obtido nos 2 estágios de purificação (B1 e B2), com 33 horas para o início da produção; tempo também superior ao de todos os ensaios deste trabalho. Segundo os autores, a produção biológica de H₂ pode ser mais lenta com o uso do glicerol bruto devido às impurezas desse

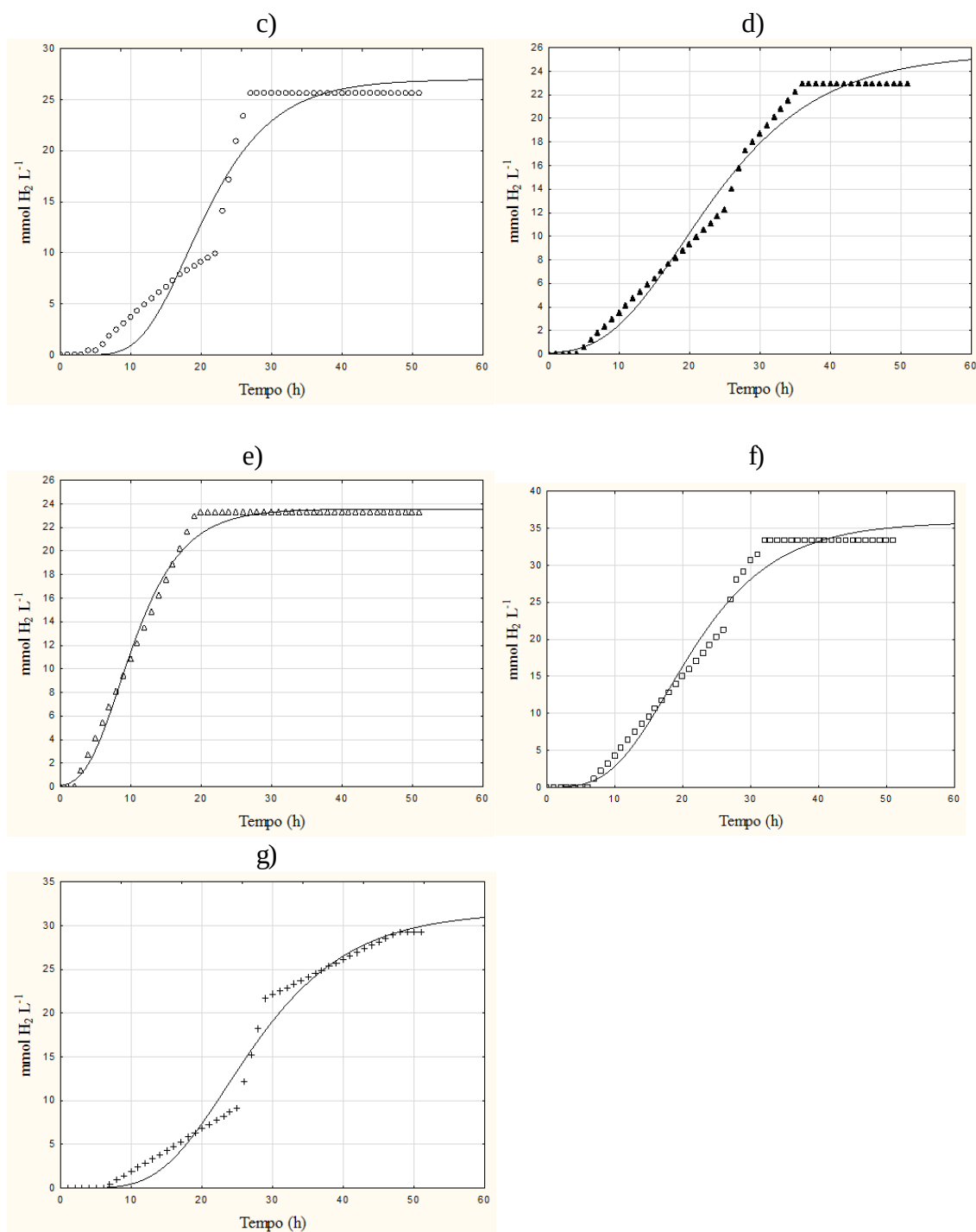
resíduo, conforme mencionado anteriormente. Os rendimentos de H_2 para o glicerol B1 e B2 foram semelhantes, com 0,17-0,18 mol H_2 /mol de glicerol e comparável ao glicerol puro (0,20 mol H_2 /mol de glicerol). No presente trabalho, o menor tempo de início da produção pode ser justificado pela realização de um pré-cultivo, ou reativação da biomassa antes da operação dos reatores.

O efeito negativo do aumento da concentração de substrato não é observado apenas no caso do glicerol e ocorre independentemente da presença de contaminantes. Chen e colaboradores (2005), citados anteriormente, também descreveram que o aumento da concentração de sacarose de 20 g DQO L^{-1} para 30 g DQO L^{-1} causou a diminuição da taxa de crescimento celular e da taxa de produção de H_2 , diminuindo de 2,92 para 1,73 mol de H_2 /mol sacarose, sugerindo inibição pelo aumento da concentração do açúcar. Provavelmente, no presente estudo as concentrações mais elevadas de glicerol bruto causaram inibição do crescimento dos consórcios de bactérias anaeróbias, conforme descrito anteriormente.

Os gráficos obtidos a partir da curva de produção cumulativa de H_2 na função Gompertz modificada estão demonstrados na Figura 12 e ilustram os dados dispostos na Tabela 10.

Figura 12 - Comportamento da geração de H_2 através da função Gompertz modificada nos ensaios: a) 20 g DQO L^{-1} , b) 40 g DQO L^{-1} , c) 60 g DQO L^{-1} , d) 80 g DQO L^{-1} , e) 160 g DQO L^{-1} , f) 240 g DQO L^{-1} , g) 320 g DQO L^{-1}





Como não foi detectada a presença de CH_4 nos reatores, possivelmente o substrato foi convertido principalmente à CO_2 , ácidos orgânicos, H_2 e 1,3-PD; fato comprovado pela remoção de DQO (%) e pelo perfil dos metabólitos, discutidos a seguir.

Na Tabela 11 estão dispostos alguns resultados de produção de biológica de H₂ a partir de glicerol retirados da literatura. É possível observar que o melhor resultado obtido neste trabalho foi comparável aos de trabalhos utilizando culturas puras e gliceróis purificados, comprovando os bons rendimentos da codigestão.

Tabela 11 - Análise comparativa da geração de H₂ a partir de glicerol em relação à literatura

Inóculo	Fonte de carbono	Concentração	Rendimento de H₂	Referência
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Glicerol bruto	1,7 g L ⁻¹	1,12 mol H ₂ /mol glicerol**	Ito et al. (2005)
Consórcio microbiano	Glicerol puro	4 g L ⁻¹	0,05 mol H ₂ /mol glicerol	Temudo et al., 2008b
Consórcio microbiano	Glicerol bruto	3 g L ⁻¹	0,31 mol H ₂ /mol glicerol	Selembo et al. (2009)
<i>Thermotoga neapolitana</i>	Glicerol pré-tratado	5 g L ⁻¹	2,73 mol de H ₂ /mol glicerol	Ngo, Kim e Sim (2011)
Consórcio microbiano	Glicerol puro e glicerol pré-tratado	3 g L ⁻¹	0,20 mol H ₂ /mol de glicerol puro 0,18 mol H ₂ /mol de glicerol pré-tratado	Sharma, Parnas e Li (2011)
Consórcio microbiano	Glicerina	20,33 g L ⁻¹	0,3 mol de H ₂ /mol glicerol	Sittijunda e Reungsang (2012)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Glicerol bruto	10 g L ⁻¹	116,41 mmol de H ₂ L ⁻¹	Sarma et al. (2013b)
Consórcio microbiano	Glicerol pré-tratado	7 g L ⁻¹	0,75 mol de H ₂ /mol glicerol	Liu et al. (2013)
<i>Escherichia coli</i> e <i>Enterobacter</i> sp.	Glicerol bruto e glicerol puro	20,2 g L ⁻¹	1,53 mol de H ₂ /mol glicerol bruto 1,26 mol H ₂ /mol de glicerol puro	Maru et al. (2016)
Consórcio microbiano	Glicerol bruto	20 g DQO L ⁻¹	2,92 mol de H ₂ /mol de glicerol**	Este trabalho

** Maior rendimento para testes com diferentes concentrações.

Fonte: Elaborada pela autora.

Mesmo utilizando um glicerol puro, os rendimentos de H₂ obtidos por Temudo e colaboradores (2008b) foram inferiores aos relatados no presente trabalho. Os autores utilizaram um quimiostato alimentado com glicerol (4 a 25 g L⁻¹), pH 8,0 e cultura mista como inóculo. O glicerol foi convertido principalmente em H₂ (0,05 mol H₂/mol glicerol), etanol e formiato. Com o aumento nas concentrações do glicerol os autores também observaram a diminuição da produção do H₂, além do etanol e do formiato. Em contrapartida, houve o aumento da formação de 1,3-PD e acetato.

Selembo e colaboradores (2009) obtiveram produção máxima de 0,31 mol H₂/mol glicerol (7,02 mmol de H₂ L⁻¹), utilizando consórcio microbiano e operando reatores batelada alimentados com 6,0 g L⁻¹ de glicerol bruto dissolvido em tampão de monohidrato de ácido 2-(N-morfolino) etanossulfônico (MES) (70 mM) e solução nutriente (0,31 g L⁻¹ de NH₄Cl, 0,13 g L⁻¹ KCl, vitaminas e minerais), em pH 6,2. Observou-se que o volume de gás produzido por g de DQO diminuiu com o aumento das concentrações de substrato de 3,0 para 6,0 g L⁻¹. Além dos autores obterem produções de H₂ inferiores, foi utilizado glicerol com elevado grau de pureza, contendo 70% de glicerol livre e meio de cultivo sintético. Os resultados deste trabalho demonstraram que o processo foi mais vantajoso, econômico e robusto.

Ngo, Kim e Sim (2011) investigaram a produção de H₂ utilizando 5,0 g L⁻¹ glicerol pré-tratado e glicerol bruto por *Thermotoga neapolitana* DSM 4359, em reatores operados em batelada, em pH 7,5. Um rendimento máximo de 1,97 mol de H₂/mol glicerol foi obtido após 56 h de cultivo com glicerol pré-tratado. Tais resultados foram cerca de 1,55 vezes maiores aos com glicerol bruto (1,27 mol de H₂/mol glicerol). Otimizando o sistema de ciclos de borbulhamento de N₂ e controle de correção do pH, os pesquisadores conseguiram elevar os rendimentos utilizando glicerol bruto de 1,23 mol de H₂/mol glicerol para 2,73 mol de H₂/mol glicerol. Mesmo assim, tais valores foram inferiores aos obtidos no presente trabalho, com produções superiores aos valores obtidos pelos autores com glicerol purificado.

Várias investigações apontaram que a produção de H₂ a partir de glicerol pode alcançar rendimentos próximos ao valor máximo teórico de 3,0 mols de H₂/mol de glicerol utilizando culturas termofílicas. No entanto, o balanço energético desse processo é negativo, pois exige aquecimento dos reatores (~75° C). Considerando que cada mol de H₂ pode gerar 68 kcal e que Ngo, Kim e Sim (2011) alcançaram uma produção de 148 mols de H₂/m³, o sistema pode gerar 8,486 kcal de H₂/m³. Entretanto para aquecer 1 m³ de reator são necessários 50.000 kcal (VIANA et al., 2014).

Sittijunda e Reungsang (2012) investigaram a produção de H₂ a partir de 20,33 g L⁻¹ glicerol bruto, 16 g L⁻¹ de uréia, 3,97 g L⁻¹ de Na₂HPO₄ e 0,20 mL L⁻¹ de solução contendo micronutrientes em reator batelada operado a 55°C e pH 5,5, condições ótimas selecionadas após realização de otimização do processo por metodologia de superfície de resposta (RSM) com *design* de compósito central (CCD). Nessas condições foram obtidos rendimentos de 0,30 mols de H₂/mol glicerol. Esses resultados foram comparáveis aos piores resultados do presente trabalho (0,21 mol de H₂/mol glicerol no ensaio com 320 g DQO L⁻¹). Acredita-se que, mesmo sem a adição de suplementação ao meio, o esgoto sanitário e o extrato de levedura foram responsáveis pela suplementação de Nitrogênio e Fósforo do meio. Segundo

os autores, os rendimentos de H_2 poderiam ser melhorados com a maximização da produção de ácido fórmico e minimização da produção de 1,3-PD e ácido láctico.

Sarma e colaboradores (2013b) obtiveram produção de 116,41 mmol de H_2 L^{-1} utilizando *Enterobacter aerogenes* NRRL B 407 em reatores do tipo batelada alimentados com 10,0 g L^{-1} de glicerol bruto e pH 6,0. Apesar da produção mais elevada que as observadas no presente trabalho, foram utilizadas concentrações mais reduzidas de glicerol bruto, que por sua vez possuía uma maior porcentagem de glicerol livre (23,63%) e menor porcentagem de sabões (0,36%); enquanto o glicerol bruto utilizado neste trabalho continha 10% (v/v) de glicerol livre e 22% de sabões. Maiores teores de glicerol livre e menores de sabões indicam que o glicerol utilizado pelos autores possuía um grau de pureza elevado, potencializando a produção de H_2 . A cultura pura também foi capaz de tolerar a elevada acidificação do meio, apresentando atividade em pH 3.3.

Liu e colaboradores (2013) estudaram a conversão de glicerol em H_2 e 1,3-PD através da fermentação utilizando reatores batelada e solo orgânico como fonte de inóculo. Foram testados 2 estágios de purificação de glicerol (P2 e P3) em três concentrações (3,0; 5,0; e 7,0 g L^{-1}) e diferentes tempos de retenção de H_2 no *headspace*. O tempo de retenção mais longo ocasionou os menores rendimentos de H_2 , mas aumentou a produtividade de 1,3-PD. O glicerol mais purificado (P3) na concentração de 7,0 g L^{-1} teve o melhor rendimento de 1,3-PD (0,65 mol/mol de glicerol consumido) nos tempos de 20 h e 65 h, e o rendimento mais elevado de H_2 (0,75 mol de H_2 /mol glicerol) nos tempos 2,5 h e 20 h. Os autores destacaram que os gliceróis purificados apresentaram desempenhos semelhantes em relação aos rendimentos de H_2 e 1,3-PD, sendo que baixas concentrações (<7 g L^{-1}) não demonstraram efeito inibitório. Em contrapartida, concentrações elevadas de metanol nos gliceróis com menor purificação inibiram o crescimento de bactérias anaeróbias e acarretavam em baixos rendimentos de 1,3-PD. A idade do inóculo também demonstrou ter influência sobre a produção de H_2 , sendo que o solo orgânico mais antigo (armazenado por 6 meses) resultou em produções menores do que em solo fresco (armazenado por 1 mês), o que não ocorreu para os rendimentos de 1,3-PD, que tiveram produção semelhante nos dois casos. Esses rendimentos foram próximos ao ensaio de 240 g DQO L^{-1} (0,69 mol de H_2 /mol glicerol) e inferior ao melhor resultado encontrado do presente trabalho.

Maru e colaboradores (2016) compararam a produção de H_2 na fermentação de 20,2 g L^{-1} de glicerol puro e glicerol bruto utilizando cocultura (1:1) de *Enterobacter cloacae* MCM2 e *Escherichia coli* CECT432 em reator batelada operando em pH 6,7 a 37 °C e agitação contínua de 200 rpm, obtendo rendimento de 1,26 mol H_2 /mol de glicerol puro e 1,53 mol

H₂/mol de glicerol bruto. Os principais produtos gerados foram H₂, etanol, lactato, acetato, succinato, 2,3-butanodiol e CO₂. A cocultura não apenas teve capacidade de coexistir, mas também melhorou a fermentação global conduzindo a maiores rendimentos. Da mesma forma, os resultados obtidos no presente trabalho mostraram-se mais promissores utilizando culturas mistas e concentrações mais elevadas de glicerol bruto.

Os rendimentos de H₂ neste trabalho foram bastante satisfatórios e isto pode ser atribuído a uma combinação de fatores, entre eles o efeito da diluição do glicerol no esgoto sanitário e a realização dos pré-cultivos antes do início da operação dos reatores. A diluição do glicerol residual é uma alternativa para a inibição microbiana provocada pelos contaminantes. A utilização de água potável encareceria o processo em escala industrial, mas como o uso de efluentes alia-se a destinação do efluente com o aumento da eficiência do tratamento do resíduo, que, no caso esgoto sanitário, representa uma fonte de macro e micronutrientes (SUEHARA et al., 2005).

5.3.6 pH

Em todas as concentrações testadas de glicerol houve diminuição do pH, que variou entre 5,5 e 4,6 (Tabela 12). A solubilização do CO₂ produzido dentro dos processos biológicos e sua subsequente conversão a bicarbonatos é o mecanismo responsável pela manutenção do tamponamento natural dos sistemas de fermentação anaeróbios (KRISHNA, 2013). Essa dinâmica pode ter sido comprometida, provocando a diminuição significativa do pH nos reatores, uma vez que o sistema avaliado não permitia o acúmulo do CO₂ no meio reacional.

Tabela 12 - Valores de pH ao final da operação dos respectivos reatores

Reator (g DQO L⁻¹)	pH inicial	pH final
20	7,0 (± 0,03)	5,5
40		5,4
60		4,9
80		5,2
160		4,6
240		5,1
320		5,3

Fonte: Elaborada pela autora.

A redução do pH ao final da operação pode desfavorecer a produção de H_2 por um deslocamento de equilíbrio, diminuindo o potencial dos microrganismos produtores de H_2 . Segundo Schön (2009), na etapa acidogênica o pH mais elevado (>5) propicia a produção de AGV, enquanto que em pH reduzido (<5) mais álcoois são produzidos. Em pH próximo a 4,0 todos os processos podem cessar.

A faixa de pH entre 5,5-6,5 é relatada como ótima para a fermentação. Faixas mais reduzidas de pH são desfavoráveis porque provocam a variação de carga da membrana celular, diminuição da atividade da enzima hidrogenase e alteração das via metabólica, como por exemplo a rota etanólica, que consome NADH. *Clostridium* por exemplo produz H_2 a partir da ação das enzimas piruvato-ferredoxina-oxidoreductase e hidrogenase, que são inibidas em faixas mais ácidas de pH (HOLT et al., 1988; DABROCK; BAHL; GOTTSCHALK, 1992). Chen e colaboradores (2005) isolaram *Clostridium butyricum* de lodo anaeróbio e relataram que em cultivos com sacarose em pH 6,5; 6,0; 5,5 e 5,0 o crescimento celular e a produção de H_2 foram inibidos em pH 5,0, enquanto o crescimento celular foi mais eficiente na faixa de pH 6,0-6,5, com rendimento total de H_2 foi mais elevado em cultivos de pH 5,5. Essa diferença entre o pH de melhor crescimento celular e de melhor produção de H_2 seria devido à rápida conversão da fonte de carbono em biomassa, reduzindo a formação de H_2 .

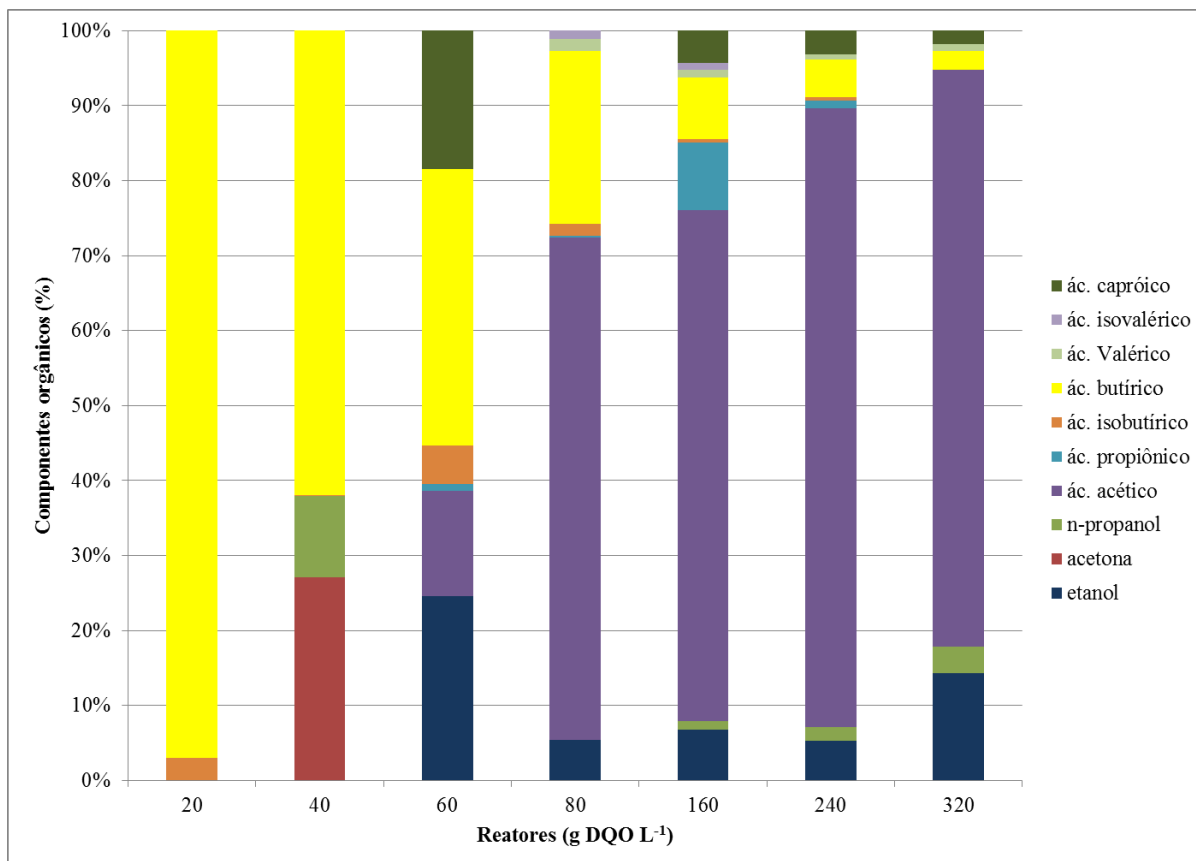
Desta forma, o pH final dos reatores pode ter prejudicado a evolução da produção de H_2 pelas bactérias anaeróbias mais resistentes, como as do gênero *Clostridium* sp. O controle da acidez dentro do processo tende a restaurar a produção de H_2 e melhorar a eficiência do processo (DABROCK; BAHL; GOTTSCHALK, 1992; CHEN, W. et al., 2005).

5.3.7 Perfil dos compostos orgânicos formados

No reator 20,0 g DQO L^{-1} houve o predomínio do ácido butírico (24,0 mg L^{-1}), seguida de ácido iso-butírico (0,74 mg L^{-1}). No reator 40,0 g DQO L^{-1} foi observada a mesma tendência, mas com elevada formação de acetona e, em menor quantidade, n-propanol. No reator 60,0 g DQO L^{-1} observou-se maior variedade de compostos orgânicos, com formação de ácido butírico, etanol, ácido capríco, ácido acético, ácido isobutírico e ácido propiônico. No reator 80,0 g DQO L^{-1} , ácido acético passou a ser predominante, seguido de ácido butírico, etanol, ácido isobutírico, ácido valérico e ácido isovalérico. No reator 160,0 g DQO L^{-1} houve a maior formação de ácido acético, ácido butírico, ácido propiônico, etanol, ácido capríco e n-propanol. No reator 240,0 g DQO L^{-1} e 320,0 g DQO L^{-1} foi observado o mesmo perfil de

produtos que o reator 160,0 g DQO L⁻¹, variando apenas as concentrações dos compostos (Figura 13).

Figura 13 - Metabólitos gerados ao final da operação dos reatores



Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 13 - Produção acumulada de compostos orgânicos no meio líquido

Reatores (g DQO L ⁻¹)	Componentes orgânicos (mg L ⁻¹)									
	Etanol	Acetona	n-propanol	Ác. acético	Ác. propiônico	Ác. isobutírico	Ác. butírico	Ác. valérico	Ác. isovalérico	Ác. capróico
20	-	--	-	-	-	0,74	24,05	-	-	-
40	-	15,69	6,28	-	-	0,08	35,90	-	-	-
60	28,35	-	-	16,21	1,06	5,96	42,41	-	-	21,35
80	20,47	-	-	252,56	0,93	5,96	86,92	5,96	4,41	-
160	80,80	-	12,61	807,79	106,41	5,45	98,42	11,17	11,17	51,05
240	87,64	-	31,79	1377,62	16,12	7,44	84,15	12,01	-	52,79
320	187,38	-	45,57	1004,26	-	-	32,44	12,75	-	23,18

(-) valores abaixo do limite de detecção

De forma geral, com a elevação das concentrações de glicerol houve a mudança de perfil dos componentes orgânicos, diminuindo a concentração de ácido butírico e aumentando a concentração de ácido acético, havendo alteração das rotas metabólicas, de uma de menor rendimento, a do ácido butírico, onde 2 mols de H_2 são para cada mol de glicerol consumido (Eq. 4), para uma rota de maior rendimento, a do ácido acético, onde são formados 3 mols de H_2 para cada mol de glicerol consumido (Eq. 3). Apesar dessa mudança, não houve aumento do rendimento de H_2 , pois também ocorreu a maior diversificação dos compostos orgânicos com mais rotas metabólicas acontecendo concomitantemente. O aumento da concentração de glicerol promoveu a redução do consumo de glicerol livre, que também comprometeu o rendimento da produção de H_2 (Tabela 7).

A partir da aplicação de concentrações superiores a 60 g DQO L^{-1} ocorreu também a maior formação de etanol. Dabrock e colaboradores (1992) afirmaram que em cultivos de *Clostridium* sp. concentrações elevadas do substrato provocaram maior formação de acetona, butanol e etanol. *Clostridium pasteurianum* tem a capacidade de alterar a formação de ácidos para formação de solventes sob determinadas condições de crescimento, ocorrendo fato semelhante com *Clostridium acetobutylicum*. Apesar disso, os autores apontam que pode haver mudança drástica no padrão de formação dos produtos orgânicos dependendo do substrato, sendo que o uso do glicerol favoreceria a produção de 1,3-PD e etanol. Além da fonte de carbono, parâmetros como limitação de fosfato e ferro podem mudar o padrão de formação dos produtos, sendo que a limitação de ferro, por exemplo, pode favorecer a formação de 1,3-PD em relação aos ácidos e solventes.

A produção de H_2 associada à formação de ácidos acético e butírico é tipicamente descrita como característica das espécies de *Clostridium* dentro de processos fermentativos. Devido a predominância desses ácidos nos reatores era esperado que *Clostridium* estivesse presente no consórcio, fato constatado a partir dos plaqueamentos (a seguir). Chen e colaboradores (2005) utilizaram cepas de *Clostridium butyricum* sob diferentes condições de composição do meio, pH e concentração de substrato, verificando a maior formação de ácido butírico, ácido acético e ácido propiônico em todas as condições. Kim e colaboradores (2008) também observaram a predominância na formação de ácido butírico e ácido acético utilizando cultura pura de *Clostridium beijerinckii*, mesmo com a variação dos valores de pH e temperatura de incubação utilizando resíduos de alimentos.

As vias de produção do ácido acético e do ácido butírico são verificadas em cerca de 50% de todas as espécies de clostrídios conhecidas. Outras espécies ainda podem realizar a

produção ácido propiônico (*Clostridium arcticum*), ácido succínico (*Clostridium coccoides*) e lactato (*Clostridium barkeri*).

A produção elevada de ácido acético ainda pode ter sido ocasionada pela presença das bactérias homoacetogênicas, que produzem acetato a partir de H_2 , CO_2 ou de outros compostos multicarbonados (SHANMUGAM et al., 2014). Apesar da predominância do ácido acético nos reatores 80, 160, 240 e 320 g DQO L^{-1} , estes não apresentaram os maiores rendimentos, o que pode ser um indicativo da ocorrência desses fenômenos.

Chen e colaboradores (2003) utilizaram H_2 e CO_2 como substrato de aterro municipal de resíduos sólidos, e observaram que houve um acúmulo significativo de ácido acético e produção relativamente baixa de gases, um indício da ocorrência da homoacetogênese. Fenômeno parecido foi observado neste trabalho, já que observou-se quantidades crescentes de ácido acético com o aumento da concentração de glicerol bruto com diminuição dos rendimentos de H_2 . Por se tratar de um consórcio bacteriano e um processo com mistura de substrato não-estéreis, o consumo do H_2 pode ser potencializado já que as homoacetogênicas seriam metabolicamente mais versáteis e podem uma maior variedade de substratos simultaneamente. A associação entre vários grupos tróficos de microrganismos ligados a produção e ao consumo de H_2 tornam a gestão das comunidades anaeróbias um processo complexo e de difícil monitoramento.

Considerando que foi utilizado um consórcio de bactérias anaeróbias, a variação do perfil dos produtos gerados também pode sugerir a mudança de atuação dos grupos bacterianos e na predominância dos gêneros presentes no consórcio em diferentes concentrações de glicerol. A associação entre vários grupos tróficos de microrganismos ligados a produção e ao consumo de H_2 . A ocorrência desse fenômeno é confirmada por Ferraz Júnior, Etchebehere e Zaiat (2015), que trabalharam com um reator anaeróbio contínuo de fluxo ascendente tratando vinhaça ($36,2 \text{ kg-CQO m}^{-3}$) com consórcio obtido a partir do próprio resíduo e fixado em diferentes meios de suporte. A partir da análise de Biologia Molecular do inóculo, os autores constataram que havia clara variação da comunidade, sendo o Filo Firmicutes dominante nas amostras do período com produção de H_2 (77,1%) e o Filo Proteobacteria (70,4%) no período sem produção de H_2 ; enquanto bactérias do gênero *Clostridium* sofreram redução entre o início e o final da operação do reator, com valores de 12,8% e 5,3%, respectivamente. Como neste trabalho também foi utilizado consórcio bacteriano que gerou diferentes perfis de metabólitos, acredita-se que essa mudança de grupos tróficos também possa ter ocorrido.

Sittijunda e Reungsang (2012) comprovaram que apenas a variação da concentração do substrato é capaz de promover a mudança na atuação dos gêneros envolvidos no processo de fermentação. Eles empregaram reatores anaeróbios alimentados com glicerol bruto e constataram que em concentrações de até $15,0 \text{ g L}^{-1}$ bactérias dos gêneros *Thermoanaerobacterium* e *Alicyclobacillus* foram dominantes, enquanto nos reatores com maiores concentrações ($19\text{-}28 \text{ g L}^{-1}$) houve predominância dos gêneros *Bacillus*, *Geobacillus*, *Eubacteriaceae* e *Alicyclobacillus*.

Não apenas o perfil dos compostos orgânicos sofre variação em função da dinâmica da comunidade microbiana, a produção de H_2 e o consumo do substrato também são afetados. A partir da utilização de culturas mistas é possível obter diferentes proporções na diversidade microbiana, acarretando alteração desses parâmetros (SIVAGURUNATHAN et al, 2015). Temudo e colaboradores (2008a) investigaram a produção de H_2 utilizando glicose, glicerol e xilose como substrato numa concentração de $4,0 \text{ g L}^{-1}$, temperatura de 30°C , pH 8,0 e taxa de diluição de $0,12 \text{ h}^{-1}$. O uso do glicerol bruto resultou em um aumento da diversidade microbiana, com predomínio de bactérias dos gêneros *Clostridium* e *Klebsiella*. Tanto em condições baixas e altas de pH, o padrão fermentativo foi associado à predominância de espécies de *Clostridium*, com maior formação de butirato e acetato, enquanto em pH intermediário houve mudanças metabólicas relacionadas com uma maior envolvimento, sugerindo que os efeitos do pH não apenas muda as vias metabólicas, mas também acarreta em mudanças nas comunidades microbianas.

Além da dinâmica das comunidades microbianas, as mudanças do perfil de produtos também podem estar ligadas a presença de espécies de *Clostridium* no inóculo. O H_2 é produzido durante a fase exponencial e quando a população atinge a fase estacionária as reações são deslocadas da produção de H_2 e ácidos para produção de solventes. Esta mudança ocorre quando o pH cai para faixas ácidas abaixo de pH 4,5 (KHANAL et al., 2004). Esses fatos reforçam a possível ocorrência desse fenômeno neste trabalho, pois não foi feito o controle do pH dentro dos reatores, que sofreu variação não apenas temporal, mas também função do aumento das concentrações do glicerol, sendo observado diferentes pH finais em relação à concentração do resíduo (Tabela 12).

Com o uso de culturas mistas espera-se que haja maior dinâmica das rotas metabólicas, já que as bactérias fermentativas interagem entre si (MARONE et al., 2015). As alterações na distribuição dos produtos podem ter sido causadas pelas alterações no metabolismo da população, por alterações da população em si, ou mesmo ambos. Apesar dessa desvantagem, as culturas mistas são vantajosas frente às culturas puras, uma vez que o

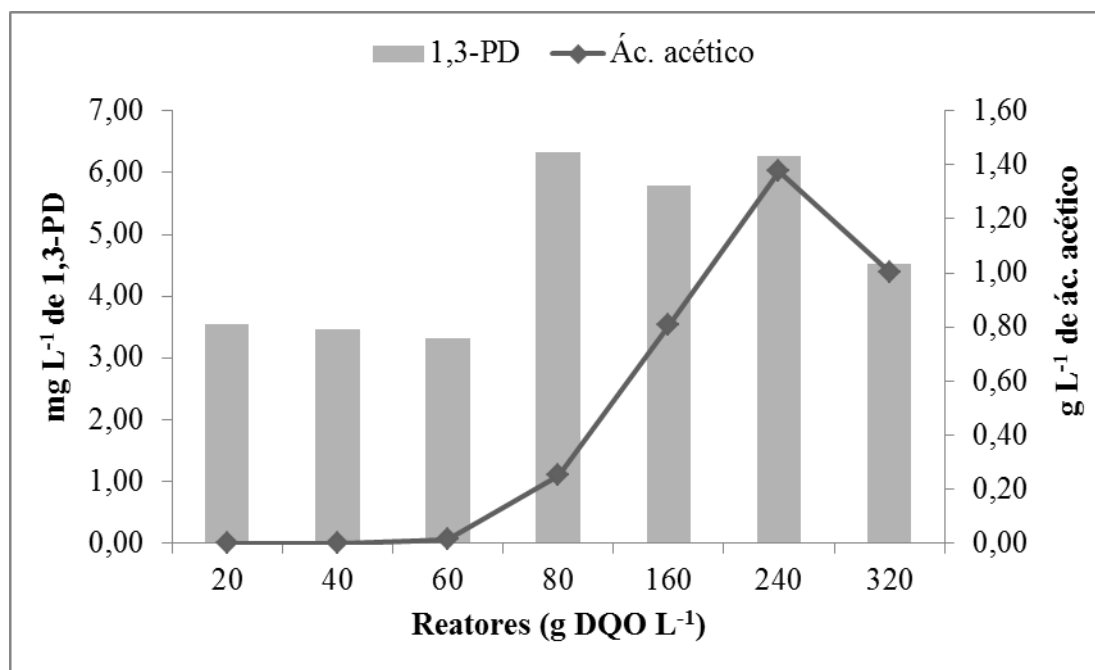
uso de culturas puras não representa situações reais, incluindo processos onde são usados resíduos industriais. Além disso, culturas mistas são de manuseio e controle mais simples e possuem uma capacidade de metabolizar uma variedade maior de substratos (SHARMA; PARNAS; LI, 2011).

A pressão ocasionada pelo acúmulo de H_2 em reatores pressurizados também acarreta a variação desse perfil. Quando há o acúmulo de H_2 dentro do sistema, ácidos de maior peso molecular como os ácidos butírico e propiônico são produzidos. Com diminuição da pressão parcial, a produção de acetato e butirato são retomadas (VAN ANDEL et al., 1985; GRADY; DAIGGER; LIM, 1999). Acredita-se que neste trabalho esse fator não tenha influenciado na formação dos componentes orgânicos, pois o sistema utilizado não permitia o acúmulo de biogás.

5.3.8 Geração do 1,3-PD

As produções mais elevadas de 1,3-PD foram observadas nos reatores de maior carga orgânica, no entanto foram pouco expressivas frente aos outros compostos orgânicos (Figura 14). A maior produção ocorreu no reator 80 g DQO L^{-1} , com 6,34 mg L^{-1} , seguido do reator 240 g DQO L^{-1} , com 6,27 mg L^{-1} . A geração de 1,3-PD não foi diretamente proporcional ao aumento da concentração do glicerol nos reatores, havendo redução da produção no reator 320 g DQO L^{-1} , possivelmente causada por inibição provocada pelo acúmulo de contaminantes (DABROCK; BAHL; GOTTSCHALK, 1992), conforme descrito anteriormente.

Com a maior produção de ácido acético nos reatores de maior carga orgânica houve também tendência no aumento da produção de 1,3-PD (Figura 14). Isso ocorre porque o rendimento de 1,3-PD depende da disponibilidade de NADH, que é maximizado com a formação de ácido acético na via oxidativa (Figura 7). Quando etanol é formado, 2 moléculas de NADH são consumidas, sendo ele o principal concorrente do 1,3-PD. Para potencializar a produção do diol alguns autores fizeram a inativação do gene responsável pela produção do etanol em *Klebsiella pneumoniae* e alcançaram rendimentos de até 0,7 mol/mol (ZHANG et al., 2006), muito próximo ao máximo teórico de 0,875 mol/mol (MAERVOET et al., 2011). A redução da produção de H_2 também pode aumentar a produção do diol (BIEBL et al., 1999).

Figura 14 - Produção da 1,3-PD e ácido acético em função do aumento da carga orgânica

Fonte: Elaborada pela autora.

Algumas espécies de *Clostridium* e bactérias lácticas formam 1,3-PD, ácido butírico e ácido acético (HOMANN et al., 1990). Szymanowska-Powalowska (2014) alcançou concentrações máximas de 43,2 g L⁻¹ e 54,2 g L⁻¹ utilizando 80,0 g L⁻¹ e 100,0 g L⁻¹ de glicerol bruto, respectivamente. Além de utilizar um resíduo com menor quantidade de interferentes, foi empregada uma estirpe pura de *C. butyricum*, o que justifica os maiores rendimentos de 1,3-PD em relação aos relatados neste trabalho.

Vale ressaltar que o objetivo deste trabalho foi a geração de H₂ a partir do glicerol bruto, de forma que todas as variáveis foram direcionadas para a potencialização de sua produção, incluindo o pré-tratamento térmico realizado na biomassa utilizada como inóculo posteriormente. Assim, era esperado que houvesse uma produção reduzida de 1,3-PD, já que a rota redutiva onde ele é produzido concorre com a rota oxidativa onde o H₂ é gerado, ambas dependendo do mesmo substrato.

Segundo Biebl e colaboradores (1999), apesar da formação de ácido acético promover maiores rendimentos de 1,3-PD, em determinadas concentrações, o ácido acético pode ser tóxico para as culturas. O mesmo ocorre para os outros produtos como ácido butírico e etanol, mas em menor proporção. Logo, apesar da geração de etanol desfavorecer a produção de 1,3-PD, a rota etanólica favorece a produção de biomassa, pois a célula obtém maior rendimento energético por estas vias. Se o substrato é escasso, o microrganismo tende a utilizar a via de maior rendimento energético. Isso justificaria as maiores produção de etanol e 1,3-PD nas

maiores concentrações de glicerol, que também apresentaram uma maior concentração de glicerol livre residual não consumido pelas bactérias produtoras H_2 .

Zeng e colaboradores (1994) avaliaram os potenciais de inibição dos produtos e substrato sobre o crescimento de *Clostridium butyricum* e *Klebsiella pneumoniae* na fermentação de glicerol utilizando modelo matemático. A inibição ocorreu independente do gênero e as concentrações máximas de produtos toleradas foram $0,35 \text{ g L}^{-1}$ para ácido acético não dissociado; $10,1 \text{ g L}^{-1}$ para ácido butírico; $16,6 \text{ g L}^{-1}$ para etanol; $71,4 \text{ g L}^{-1}$ para 1,3-PD e $187,6 \text{ g L}^{-1}$ para glicerol. Nos reatores com carga maior a $160,0 \text{ g DQO L}^{-1}$ esse fenômeno pode ter ocorrido, já que foram encontradas concentrações de ácido acético acima da concentração crítica, variando de $0,807 \text{ g L}^{-1}$ a $1,004 \text{ g L}^{-1}$ (Tabela 13).

A produção de 1,3-PD também está relacionada ao aumento da concentração do glicerol, pois diminuição do fluxo específico de biomassa através do acetil-CoA favorece a rota de produção do 1,3-PD, que não deriva de acetil-CoA como ocorre com o acetato, butirato, etanol e o hidrogênio molecular (TEMUDO et al., 2008b).

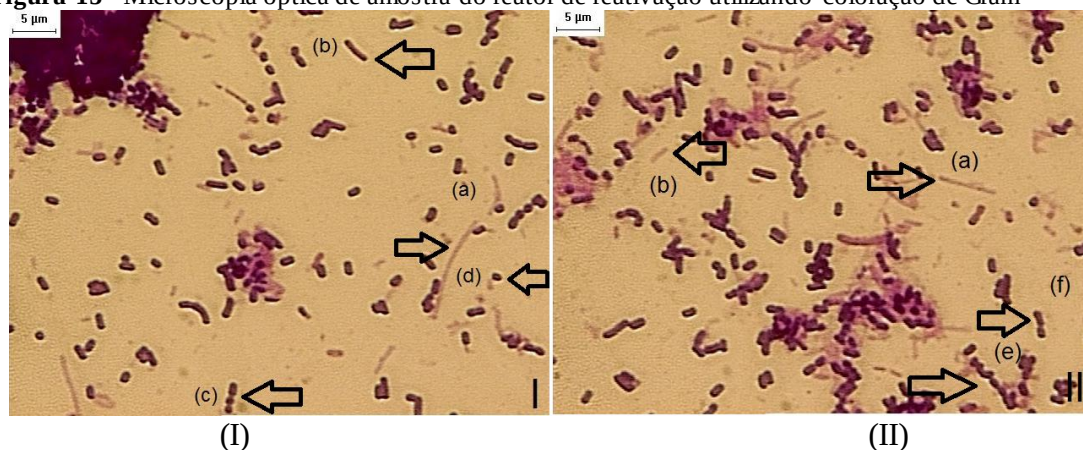
5.4 Caracterização do consórcio

5.4.1 Microscopia

As imagens da microscopia demonstraram que o consórcio bacteriano possuía diversidade morfológica elevada, com predomínio de bacilos Gram positivos. As bactérias Gram positivas apresentaram morfologias de bacilos, diplobacilos, estreptobacilos, cocos, diplacocos e estreptococos. Em menor quantidade, foram observados alguns filamentos, bacilos e cocos Gram negativos (Figura 15).

Algumas bactérias produtoras de H_2 estão incluídas no grupo de bactérias Gram positivas, como *Clostridium* e *Bacillus* (MAINTINGUER et al., 2008a). *Clostridium* são bactérias produtoras de endósporos, logo, essa espécie provavelmente deva representar uma parcela considerável do consórcio microbiano, considerando a predominância de ácido acético e ácido butírico no perfil dos compostos orgânicos e o tratamento térmico que foi realizado no inóculo, que visava principalmente a manutenção das produtoras de endósporos (MAINTINGUER et al., 2011; UENO et al., 1995).

Figura 15 - Microscopia óptica de amostra do reator de reativação utilizando coloração de Gram



(I): (a) filamento, (b) bacilo, (c) estreptococos, (d) cocos; II: (a) filamento, (b) bacilo Gram positivo, (e) estreptobacilos, (f) diplobacilos

Fonte: Elaborada pelo autora.

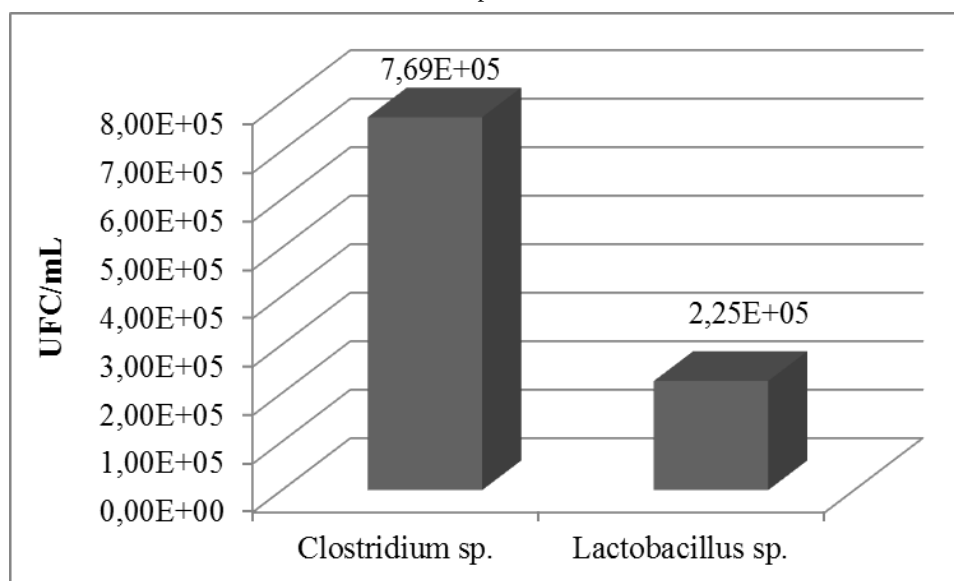
Outros autores como Fang e Liu (2002) também observaram a predominância de *Clostridium* sp. em inóculo obtido a partir de lodos metanogênicos e concluíram que essas espécies representavam 64,6% do total das populações estudadas, sendo 43,8% relacionado com *Clostridium cellulosi*, 12,5% com *Clostridium acetobutylicum* e 8,3% com *Clostridium tyrobutyricum*. Essas espécies são facilmente obtidas utilizando pré-tratamento térmico de lodos biológicos, uma vez que endósporos podem ser formados em condições adversas como em elevadas temperaturas e ativados quando são fornecidas condições ambientais ideais para o seu desenvolvimento. Essas espécies são versáteis e podem utilizar uma variedade de substratos, incluindo amido, celulose e hemicelulose. Na produção de H_2 podem ser empregados substratos complexos sem pré-tratamento, com a formação de uma grande variedade de produtos. Apesar das vantagens da flexibilidade metabólica dessas espécies, a formação de outros produtos, como por exemplo, ácido butírico, pode diminuir o rendimento da produção de H_2 , que seria o máximo teórico alcançado de 4 mol de H_2 /mol de hexose quando o ácido acético é o único produto final da fermentação (HAWKES et al., 2007).

5.4.2 Plaqueamento

Foram verificadas contagens de *Lactobacillus* sp. e *Clostridium* sp. (Figura 16). Para *Clostridium* sp. foi observado $7,69 \times 10^5$ UFC/mL (Figura 17), enquanto nenhuma colônia de *Enterobacter* sp. foi observada nas diluições testadas (Figura 18). *Clostridium* assim como *Enterobacter* são relatados como produtores eficientes de H_2 (SHIN et al., 2007; CHANG et al., 2008).

O predomínio do gênero *Clostridium* foi um indicativo da eficiência no pré-tratamento térmico aplicado na seleção de bacilos Gram positivos envolvidos nas gerações de H_2 durante a operação dos reatores anaeróbios. As condições operacionais impostas, como o pH inicial 7,0, estava dentro da faixa ótima de germinação de endósporos dessa espécie (5,5-8,0). A temperatura de operação (37°C) também deve ter favorecido a manutenção de endósporos, que sobrevivem na faixa ótima entre $20\text{-}25^\circ\text{C}$ e podem germinar até 40°C (PLOWMAN; PECK, 2002).

Figura 16 - Concentração celular de *Lactobacillus* sp. e *Clostridium* sp. após crescimento de colônias em meio específico



Fonte: Elaborada pela autora

A ausência de *Enterobacter* sp. mostrou que não houve número suficiente de células para reprodução em placa. Este fato também pode estar relacionado à aplicação do pré-tratamento térmico no inóculo, uma vez que esse gênero de bactéria não forma endósporos (FORSYTHE, 2013). *Enterobacter* sp. são anaeróbias facultativas e a completa ausência de oxigênio pode ter comprometido sua atividade (KRAEMER; BAGLEY, 2007; ZHANG et al., 2011), pois se desenvolvem melhor em ambientes com presença de oxigênio, que favorece seu crescimento celular (KUMAR; DAS, 2000; DAS; VEZIROGLU, 2008).

Os ensaios de coloração de Gram confirmaram essa tendência da composição, uma vez que o gênero *Clostridium* é composto por bacilos Gram positivos, morfologia predominantemente observada a partir dos exames de microscopia, enquanto que *Enterobacter* são bacilos Gram negativos, observados em menor quantidade. As espécies *Clostridium* produzem H_2 durante a fase exponencial de seu crescimento, enquanto na fase estacionária o metabolismo celular se altera, produzindo outros compostos, como acetona.

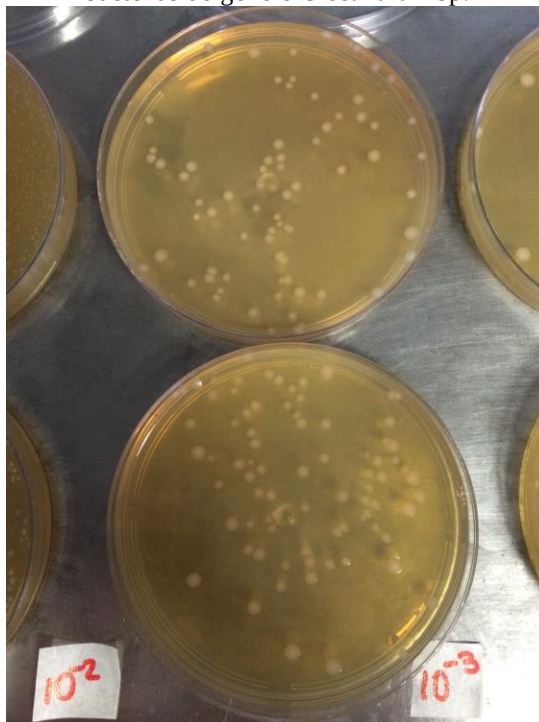
Outro indicativo da predominância de *Clostridium* sp. foi o perfil dos produtos finais nos reatores, pois um aspecto específico da fermentação desses gêneros é a sua capacidade de variar a proporção de butirato e acetato de acordo com as condições ambientais (LEJA; MYSZKA; CZACZYK, 2013). Segundo Chen e colaboradores (2005) é comum observar espécies de *Clostridium* sp. em consórcios bacterianos produtores de H₂. Além disso, são muito eficazes na produção de H₂ a partir de substratos orgânicos, e por isso é de grande importância que o perfil de produção dessas espécies seja estudado e descrito para melhorar seu desempenho em sistemas de cultura mista.

Foram contadas $2,25 \times 10^5$ UFC/mL de bactérias do gênero *Lactobacillus* sp. (Figura 19). Esse gênero é apontado como produtor de bacteriocinas capazes de inibir a ação de *Clostridium* sp., pela interação entre grupos sulfidrilas, podendo retardar a germinação dos endósporos de *Clostridium* sp. e prejudicar o rendimento final de conversão metabólica (MEGHROUS; LACROIX; SIMARD, 1999; WIJNKER et al., 2011).

Alguns autores relatam a possível relação entre a proliferação de bactérias não formadoras de endósporos, bactérias propiônicas e bactérias lácticas com *Lactobacillus* com a aplicação de elevada carga orgânica, causando a redução na produção de H₂ devido ao cometabolismo da comunidade microbiana, que, além de competir por substrato, ainda pode levar à inibição das bactérias produtoras de H₂ pela ação dos peptídeos antimicrobianos produzidos pelas bactérias lácticas (GOMES et al., 2015; ROSA et al., 2016).

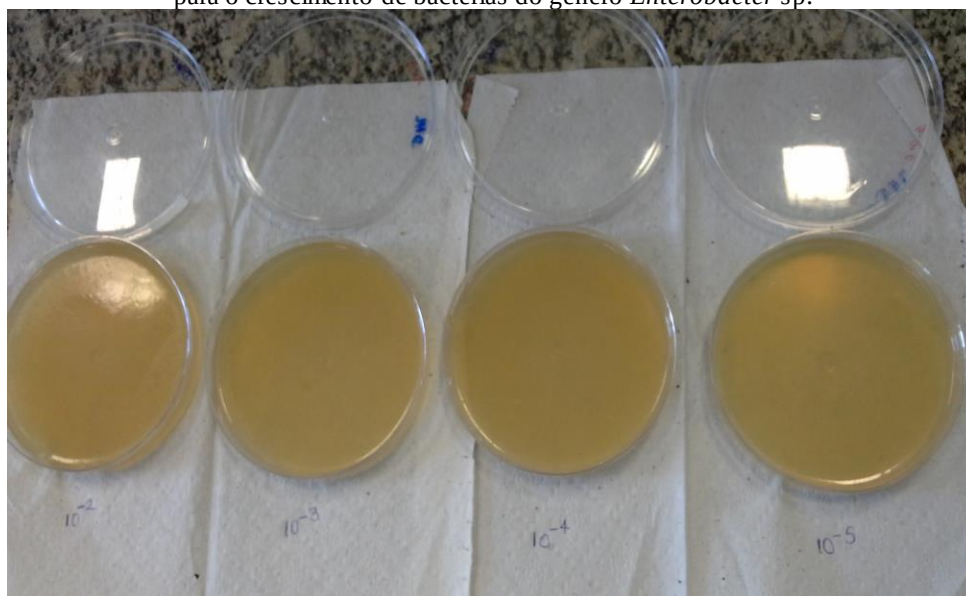
Por outro lado, bactérias do gênero *Lactobacillus* são relatadas na literatura como produtoras de 1,3-PD. Estudos apontaram que *Lactobacillus reuteri* utiliza glicerol em vias fermentativas e sua adição a outros substratos foi capaz de aumentar as taxas de crescimento e os rendimentos celulares (TALARICO et al., 1990). Outras espécies como *Lactobacillus brevis* (VIVEK; PANDEY; BINOD, 2016), *Lactobacillus diolivorans* (PFLÜGL et al., 2014), *Lactobacillus panis* (GRAHAME et al., 2013) também são relatadas como excelente produtoras de 1,3-PD.

Figura 17 - Imagem das placas contendo meio Neomicina Nagler (NN), específico para o crescimento de bactérias do gênero *Clostridium* sp.



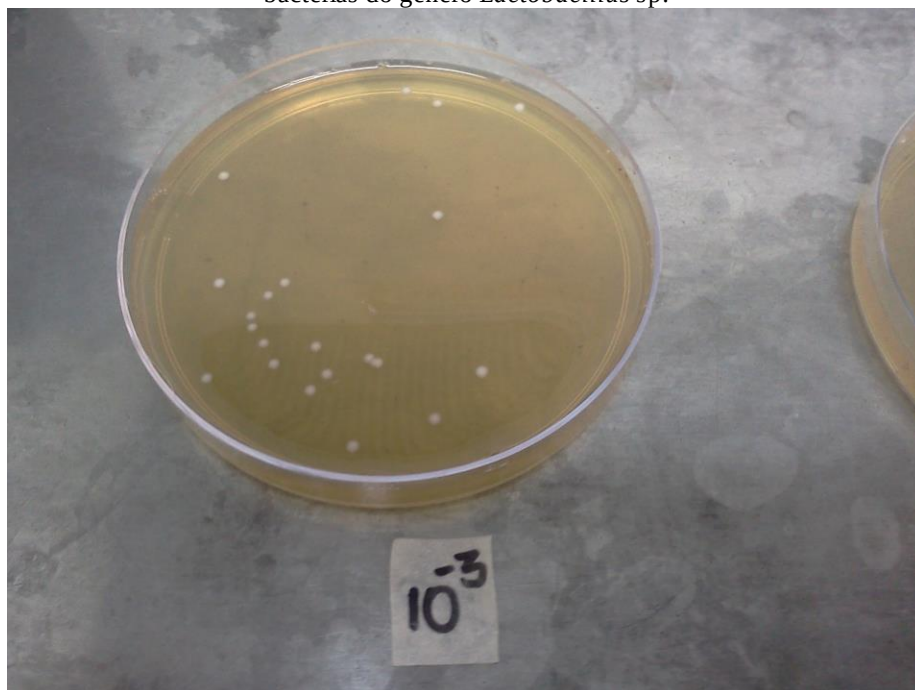
Fonte: Próprio autor.

Figura 18 - Imagem das placas contendo meio Desoxicolato Sulfeto de Hidrogênio Lactose (DHL) específico para o crescimento de bactérias do gênero *Enterobacter* sp.



Fonte: Próprio autor.

Figura 19 - Imagem das placas contendo meio Lactobacilli Selectivo (LBS) específico para o crescimento de bactérias do gênero *Lactobacillus* sp.



Fonte: Próprio autor.

6 CONCLUSÕES

O glicerol bruto possuía carga orgânica elevada e baixa concentração de glicerol livre (10%) e continha contaminantes como sabões, água, metanol, dentre outros.

O pré-tratamento térmico foi capaz de selecionar bactérias produtoras de H_2 , não sendo detectada a presença de CH_4 em nenhum dos reatores. Apesar da ocorrência de um tempo de latência na geração de biogás, acredita-se que a realização de reativações (pré-cultivos) foi importante para garantir rendimentos satisfatórios de H_2 graças à manutenção da viabilidade celular. O melhor rendimento na produção de H_2 ocorreu nos reatores com 20,0 g DQO L^{-1} , onde foi observada a geração de 2,92 mols de H_2 por mol de glicerol.

Concentrações mais elevadas de glicerol provocaram a diminuição dos rendimentos de H_2 , assim como o consumo do glicerol livre (%). Apesar disso, a remoção da DQO aumentou com as adições do resíduo.

O perfil dos metabólitos formados variou com o aumento da concentração do glicerol bruto. Nos reatores 20,0; 40,0; e 60,0 g DQO L^{-1} foi observada a predominância de geração de ácido butírico e uma menor variedade de compostos orgânicos. Nos reatores 80,0; 160,0; 240 e 320,0 g DQO L^{-1} foi observada gerações de ácido acético, além de outros compostos orgânicos, como ácido capróico, valérico e n-propanol. A produção de 1,3-PD não foi significativa. No entanto observou-se uma tendência do aumento da sua produção com o aumento da concentração do glicerol.

A partir dos plaqueamentos observou-se a predominância de *Clostridium* sp. ($7,69 \times 10^5$ UFC/mL), seguido de *Lactobacillus* ($2,25 \times 10^5$ UFC/mL), não sendo observada a formação de colônias de *Enterobacter*.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

A aplicabilidade e viabilidade dos processos utilizando codigestão aumentaram especialmente nos últimos cinco anos, indicando seu potencial para aumentar ainda mais a produção energia. No entanto, existem diferentes desafios para o desenvolvimento do processo em escala piloto e escala industrial. O controle da tecnologia requer a manutenção de ecossistemas microbianos, a estabilidade microbiológica e o equilíbrio nutricional.

A pesquisa futura deverá continuar investigando processo de codigestão considerando diferentes substratos e inóculo, monitorando a geração de metabólitos de valor comercial como o 1,3-PD e o H_2 . A partir dos resultados obtidos é possível propor trabalhos com maiores concentração do resíduo e com reatores de maior escala.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. Resolução ANP nº 45, de 25 de agosto 2014. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 26 ago. 2014. Disponível em: <<http://unicontrolbrasil.com/modules/default/files/legislation/d2ca2d07e6c3a6dfe8e7437cbf93ee6f.pdf>>. Acesso em: 8 jun. 2017.
- AKUTSU, Y. et al. Hydrogen production potentials and fermentative characteristics of various substrates with different heat-pretreated natural microflora. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 13, p. 5365-5372, 2009.
- ALEMAHDI, N. et al. Enhanced mesophilic bio-hydrogen production of raw rice straw and activated sewage sludge by co-digestion. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, n. 46, p. 16033-16044, 2015.
- ALVES, R. G. C. M. et al. Digestores anaeróbios para tratamento de dejetos suínos: avaliação de partida para diferentes configurações de reatores. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 23., 2005, Campo Grande. **Anais...** Rio de Janeiro: ABES, 2005.
- AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. Official method Ca 2c-25. section C: moisture and volatile matter, air oven method. In: _____. (Ed.). **Official methods and recommended practices of AOCS**. 6th ed. Urbana, 2009a.
- AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. Official method Cc 17-95 section C: soap in oil, titrimetric method. In: _____. (Ed.). **Official methods and recommended practices of AOCS**. 6th ed. Urbana, 2009b.
- 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.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **E203**: standard test method for water using volumetric karl fischer titration. West Conshohocken, 2007. 6 p.
- AMON, T. et al. Optimising methane yield from anaerobic digestion of manure: effects of dairy systems and of glycerine supplementation. **International Congress Series**, v. 1293, p. 217-220, 2006.
- ANDRIAMANOHIARISOAMANANA, F. J. et al. Farm-scale thermophilic co-digestion of dairy manure with a biodiesel byproduct in cold regions. **Energy Conversion and Management**, v. 128, p. 273-280, 2016.
- ANGENENT, L. T. et al. Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. **Trends in Biotechnology**, v. 22, n. 9, p. 477-485, 2004.

ANTUNES, J. M. Mercado de biocombustíveis é oportunidade para crescimento da canola no Brasil. **Embrapa Notícias**, mar. 2016. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/web/mobile/noticias/-/noticia/11206935/mercado-de-biocombustiveis-e-oportunidade-para-crescimento-da-canola-no-brasil>>. Acesso em: 23 jan. 2017.

APPLEBY, D. B. Glicerol. In: KNOTHE, G. et al. (Ed.). **Manual do biodiesel**. São Paulo: Edgard Blücher, 2006. Cap. 11, p. 295-309.

AQUINO, S. F. et al. Metodologias para determinação da atividade metanogênica específica (AME) em lodos anaeróbios. **Engenharia Sanitária Ambiental**, v. 12, n. 2, p. 192-201, abr./jun. 2007.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6294**: óleos lubrificantes aditivos: determinação de cinza sulfatada. Rio de Janeiro, 2008. 8 p.

ASTALS, S. et al. Co-digestion of pig manure and glycerine: experimental and modelling study. **Journal of Environmental Management**, v. 92, n. 4, p. 1091-1096, 2011.

ASTALS, S. et al. Identification of synergistic impacts during anaerobic co-digestion of organic wastes. **Bioresource Technology**, v. 169, p. 421-427, 2014.

BARBIRATO, F. et al. 3-Hydroxypropionaldehyde, an inhibitory metabolite of glycerol fermentation to 1,3-propanediol by enterobacterial species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 4, p. 1448-1451, 1996.

BARBIRATO, F. et al. 1,3-propanediol production by fermentation: an interesting way to valorize glycerin from the ester and ethanol industries. **Industrial Crops and Products**, v. 7, n. 2/3, p. 281-289, 1998.

BEATRIZ, A. A.; YARA, J. K.; LIMA, D. P. de. Glycerol: um breve histórico e aplicação em sínteses estereosseletivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 2, p. 306-319, 2011.

BIEBL, H. Fermentation of glycerol by *Clostridium pasteurianum*-batch and continuous culture studies. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 18-26, 2001.

BIEBL, H. Glycerol fermentation of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*: measurement of product inhibition by use of a pH-auxostat. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 6, p. 701-705, 1991.

BIEBL, H. et al. Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol and 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, n. 1, p. 24-29, July 1998.

BIEBL, H. et al. Microbial production of 1,3-propanediol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, n. 3, p. 289-297, 1999.

- BIOCOMBUSTÍVEIS. **Cadernos NAE**, n. 2, jul. 2005. Disponível em: <<http://www.biblioteca.presidencia.gov.br/presidencia/dilma-van-rousseff/publicacoes/orgao-essenciais/secretaria-de-assuntos-estrategicos/biocombustiveis/@@download/file/02biocombustiveis.pdf>>. Acesso em: 25 jan. 2017.
- BOHON, M. D. et al. Glycerol combustion and emissions. **Proceedings of the Combustion Institute**, v. 33, n. 2, p. 2717-2724, 2011.
- 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, 2005.
- BORGHETTI, G. S.; KNORST, M. T. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de loções O/A contendo filtros solares. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 531-537, 2006.
- 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: 08 de jun. 2016.
- CAVINATO, C. et al. Thermophilic anaerobic co-digestion of cattle manure with agro-wastes and energy crops: comparison of pilot and full scale experiences. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 2, p. 545-550, 2010.
- CENTRO DE REFERÊNCIA DA CADEIA DE BIOCMBUSTÍVEIS PARA AGRICULTURA FAMILIAR. **Indicadores de preços médios**. Viçosa, nov. 2016. Disponível em: <<http://biomercado.com.br/indicadoresPorProduto.php?produto=44>>. Acesso em: 25 jan. 2017.
- CHANG, J.-J. et al. Syntrophic co-culture of aerobic *Bacillus* and anaerobic *Clostridium* for bio-fuels and bio-hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 19, p. 5137-5146, 2008.
- CHATZIFRAGKOU, A.; PAPANIKOLAOU, S. Effect of impurities in biodiesel-derived waste glycerol on the performance and feasibility of biotechnological processes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 95, n. 1, p. 13-27, 2012.
- CHEN, A. C.; OHASHI, A.; HARADA, H. Acetate synthesis from H₂/CO₂ in simulated and actual landfill samples. **Environmental Technology**, v. 24, n. 4, p. 435-443, 2003.
- CHEN, J. L. et al. Toxicants inhibiting anaerobic digestion: a review. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 8, p. 1523-1534, 2014.
- CHEN, W. et al. Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* cgs5 isolated from anaerobic sewage sludge. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 30, p. 1063-1070, 2005.

CHENG, J. et al. Hydrogen production by mixed bacteria through dark and photo fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 1, p. 450-457, 2011.

CHENG, K.-K.; LIU, H.-J.; LIU, D.-H. Multiple growth inhibition of *Klebsiella pneumoniae* in 1,3-propanediol fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 27, n. 1, p. 19-22, 2005.

CHI, Z. et al. A laboratory study of producing docosahexaenoic acid from biodiesel-waste glycerol by microalgal fermentation. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 11, p. 1537-1545, 2007.

CLARET, C. et al. Physiology of *Gluconobacter oxydans* during dihydroxyacetone production from glycerol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 3, p. 359-365, 1994.

COHEN, A. et al. Main characteristics and stoichiometric aspects of acidogenesis of soluble carbohydrate containing wastewaters. **Process Biochemistry**, v. 19, n. 6, p. 228-232, 1984

COHEN, A. et al. Role of anaerobic spore-forming bacteria in the acidogenesis of glucose: changes induced by discontinuous or low-rate feed supply. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 51, n. 2, p. 179-192, 1985.

COMPANHIA DE SANEAMENTO BÁSICO DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Programa de reciclagem de óleo de fritura da Sabesp**. Disponível em: <http://site.sabesp.com.br/uploads/file/asabesp_doctos/programa_reciclagem_oleo_completo.pdf>. Acesso em: 23 jan. 2017.

DABROCK, B.; BAHL, H.; GOTTSCHALK, G. Parameters affecting solvent production by *Clostridium pasteurianum*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 58, n. 4, p. 1233-1239, 1992.

DAS, D.; VEZIROGLU, T. N. Advances in biological hydrogen production processes. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 21, p. 6046-6057, 2008.

DASARI, M. A. et al. Low-pressure hydrogenolysis of glycerol to propylene glycol. **Applied Catalysis A: General**, v. 281, n. 1/2, p. 225-231, 2005.

DECKWER, W.-D. Papers presented at the international congress beyond 2000: chemicals from biotechnology ecological challenge and economic restraints microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 16, n. 2, p. 143-149, 1995.

DHARMADI, Y.; MURARKA, A.; GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: a new platform for metabolic engineering. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 94, n. 5, p. 821-829, 2006.

DISHISHA, T.; ALVAREZ, M. T.; HATTI-KAUL, R. Batch- and continuous propionic acid production from glycerol using free and immobilized cells of *Propionibacterium acidipropionici*. **Bioresource Technology**, v. 118, p. 553-562, 2012.

DU, Z.; LI, H.; GU, T. A state of the art review on microbial fuel cells: a promising technology for wastewater treatment and bioenergy. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 5, p. 464-482, 2007.

EGGEMAN, T.; VERSER, D. Recovery of organic acids from fermentation broths. In: DAVISON, B. H. et al. (Ed.). **Twenty-sixth symposium on biotechnology for fuels and chemicals**. Totowa: Humana Press, 2005. p. 605-618.

ELEFSINIOTIS, P.; WAREHAM, D. G.; SMITH, M. O. Use of volatile fatty acids from an acid-phase digester for denitrification. **Journal of Biotechnology**, v. 114, n. 3, p. 289-297, 2004.

FANG, H. H. P.; LIU, H. Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. **Bioresource Technology**, v. 82, n. 1, p. 87-93, 2002.

FERRAZ JÚNIOR, A. D. N.; ETCHEBEHERE, C.; ZAIAT, M. Mesophilic hydrogen production in acidogenic packed-bed reactors (APBR) using raw sugarcane vinasse as substrate: influence of support materials. **Anaerobe**, v. 34, p. 94-105, 2015.

FOND, O.; JANSEN, N. B.; TSAO, T. G. A model of acetic acid and 2,3-butanediol inhibition of the growth and metabolism of *Klebsiella oxytoca*. **Biotechnology Letters**, v. 7, n. 10, p. 727-732, 1985.

FONTANILLE, P. et al. Bioconversion of volatile fatty acids into lipids by the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. **Bioresource Technology**, v. 114, p. 443-449, 2012.

FORSBERG, C. W. Production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium acetobutylicum* and other *Clostridium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 639-643, 1987.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 607 p.

FOUNTOULAKIS, M. S.; PETOUSHI, I.; MANIOS, T. Co-digestion of sewage sludge with glycerol to boost biogas production. **Waste Management**, v. 30, n. 10, p. 1849-1853, 2010.

FREITAS, R. C. de. Da cozinha para a usina. **BiodieselBR**, v. 1, p. 16-21, abr./maio 2008.

GOMES, B. C. et al. Role of homo- and heterofermentative lactic acid bacteria on hydrogen-producing reactors operated with cheese whey wastewater. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, n. 28, p. 8650-8660, 2015.

GONZÁLEZ-PAJUELO, M.; ANDRADE, J. C.; VASCONCELOS, I. Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 in continuous cultures with high yield and productivity. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 9, p. 391-396, 2005.

GRADY, C. P. L. J. R.; DAIGGER, G. T.; LIM, H. C. **Biological wastewater treatment**. 2nd ed. New York, Marcel Dekker, 1999. 1022 p.

GRAHAME, D. A. S. et al. Alkaline conditions stimulate the production of 1,3-propanediol in *Lactobacillus panis* PM1 through shifting metabolic pathways. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 7, p. 1207-1215, 2013.

HAGOS, K. et al. Anaerobic co-digestion process for biogas production: progress, challenges and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 2016. In press.
doi:10.1016/j.rser.2016.11.184.

HALLENBECK, P. C. Fermentative hydrogen production: principles, progress, and prognosis. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 17, p. 7379-7389, 2009.

HAN, S. K. et al. Pilot-scale two-stage process: a combination of acidogenic hydrogenesis and methanogenesis. **Water Science and Technology**, v. 52, p. 131-138, 2005.

HARTMANN, H.; AHRING, B. K. Anaerobic digestion of the organic fraction of municipal solid waste: influence of co-digestion with manure. **Water Research**, v. 39, n. 8, p. 1543-1552, 2005.

HAWKES, F. R. et al. Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimisation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 27, n. 11/12, p. 1339-1347, 2002.

HAWKES, F. R. et al. Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: principles and progress. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 32, n. 2, p. 172-184, 2007.

HOLM-NIELSEN, J. B. et al. On-line near infrared monitoring of glycerol-boosted anaerobic digestion processes: evaluation of process analytical technologies. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 99, n. 2, p. 302-313, 2008.

HOLT, R. A.; CAIRNS, A. J.; MORRIS, J. G. Production of butanol by *Clostridium puniceum* in batch and continuous culture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 4, p. 319-324, 1988.

HOMANN, T. et al. Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol by *Klebsiella* and *Citrobacter* strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 2, p. 121-126, 1990.

HU, S. et al. Characterization of crude glycerol from biodiesel plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 23, p. 5915-5921, 2012.

ITO, T. et al. 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, 2005.

JARVIS, G. N.; MOORE, E. R.; THIELE, J. H. Formate and ethanol are the major products of glycerol fermentation produced by a *Klebsiella planticola* strain isolated from red deer. **Journal of Applied Microbiology**, v. 83, n. 2, p. 166-174, 1997.

- Ji, X.-J. et al. Efficient 1,3-propanediol production by fed-batch culture of *Klebsiella pneumoniae*: the role of pH fluctuation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 159, n. 3, p. 159-605, 2009.
- JIN, P. et al. Improved 1,3-propanediol production with hemicellulosic hydrolysates (corn straw) as cosubstrate: impact of degradation products on *Klebsiella pneumoniae* growth and 1,3-propanediol fermentation. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, p. 1815-1821, 2011.
- JORDÃO, E. P.; PESSÔA, C. A. **Tratamento de esgoto doméstico**. 3. ed. Rio de Janeiro: ABES, 1995. 932 p.
- KALIA, V. C. et al. Fermentation of biowaste to H₂ by *Bacillus licheniformis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 10, n. 2, p. 224-227, 1994.
- KARINEN, R. S.; KRAUSE, A. O. I. New biocomponents from glycerol. **Applied Catalysis A: General**, v. 306, p. 128-133, 2006.
- KHANAL, S. K. et al. Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 29, n. 11, p. 1123-1131, 2004.
- KIM, J. K. et al. Hydrogen production conditions from food waste by dark fermentation with *Clostridium beijerinckii* KCTC 1785. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 13, n. 4, p. 499-504, 2008.
- KIM, J. O. et al. Enhancing continuous hydrogen gas production by the addition of nitrate into an anaerobic reactor. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 5, p. 1208-1212, 2006.
- KIM, S.-H.; HAN, S.-K.; SHIN, H.-S. Effect of substrate concentration on hydrogen production and 16S rDNA-based analysis of the microbial community in a continuous fermenter. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 1, p. 199-207, 2006.
- KIVISTÖ, A.; SANTALA, V.; KARP, M. Non-sterile process for biohydrogen and 1,3-propanediol production from raw glycerol. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 27, p. 11749-11755, 2013.
- KOCSISOVA, T.; CVENGOS, J. G-phase from methyl ester production e splitting and refining. **Petroleum & Coal**, v. 48, n. 2, p. 1-5, 2006.
- KOLLER, M. et al. Production of polyhydroxyalkanoates from agricultural waste and surplus materials. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 2, p. 561-565, 2005.
- KRAEMER, J.; BAGLEY, D. Improving the yield from fermentative hydrogen production. **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 5, p. 685-695, 2007.
- KRAUS, G. A. Synthetic methods for the preparation of 1,3-propanediol. **Clean: Soil, Air, Water**, v. 36, n. 8, p. 648-651, 2008.
- KRISHNA, R. H. Review of research on production methods of hydrogen: future fuel. **European Journal of Biotechnology and Bioscience**. v. 1, n. 2, p. 84-93, 2013.

KUMAR, N.; DAS, D. Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 6, p. 589-593, 2000.

KUMAR, P. et al. Dark fermentative bioconversion of glycerol to hydrogen by *Bacillus thuringiensis*. **Bioresource Technology**, v. 182, p. 383-388, 2015.

KWIETNIEWSKA, E.; TYS, J. Process characteristics, inhibition factors and methane yields of anaerobic digestion process, with particular focus on microalgal biomass fermentation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 34, p. 491-500, 2014.

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

LEE, C. S. et al. A review: conversion of bioglycerol into 1,3-propanediol via biological and chemical method. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 42, p. 963-972, 2015.

LEE, P. C. et al. Succinic acid production with reduced by-product formation in the fermentation of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* using glycerol as a carbon source. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 72, n. 1, p. 41-48, 2001.

LEE, W. S. et al. A review of the production and applications of waste-derived volatile fatty acids. **Chemical Engineering Journal**, v. 235, p. 83-99, 2014.

LEJA, K.; MYSZKA, K.; CZACZYK, K. The ability of *Clostridium bifermentans* strains to lactic acid biosynthesis in various environmental conditions. **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, 2013. doi:10.1186/2193-1801-2-44.

LETTINGA, G. et al. Use of the upflow sludge blanket (USB) reactor concept for biological wastewater treatment, especially for anaerobic treatment. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 22, n. 4, p. 699-734, 1980.

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

LIN, E. C. Glycerol dissimilation and its regulation in bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 30, p. 535-578, 1976.

LIU, B. et al. 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, 2013.

MAERVOET, V. E. T. et al. Enhancing the microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol using metabolic engineering. **Organic Process Research & Development**, v. 15, n. 1, p. 189-202, 2011.

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, p. 477-497.

MAINTINGUER, S. I. et al. Fermentative hydrogen production by microbial consortium. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 16, p. 4309-4317, 2008a.

MAINTINGUER, S. I. et al. Degradação anaeróbia de fenol em reatores em batelada sob condições fermentativas. **Tecno-lógica**, v. 12 n. 2, p. 47-55, 2008b.

MAINTINGUER, S. I. et al. Fermentative hydrogen production with xylose by *Clostridium* and *Klebsiella* species in anaerobic batch reactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, p. 13508-13517, 2011.

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, 2012.

MARKOV, S. A.; AVERITT, J.; WALDRON, B. Bioreactor for glycerol conversion into H₂ by bacterium *Enterobacter aerogenes*. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 1, p. 262-266, 2011.

MARONE, A. et al. Optimization of substrate composition for biohydrogen production from buffalo slurry co-fermented with cheese whey and crude glycerol, using microbial mixed culture. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, n. 1, p. 209-218, 2015.

MARU, B. T. et al. Dark fermentative hydrogen and ethanol production from biodiesel waste glycerol using a co-culture of *Escherichia coli* and *Enterobacter* sp. **Fuel**, v. 186, p. 375-384, 2016.

MEGHROUS, J.; LACROIX, C.; SIMARD, R. E. The effects on vegetative cells and spores of three bacteriocins from lactic acid bacteria. **Food Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 105-114, 1999.

METJE, M. E.; FRENZEL, P. Effect of temperature on anaerobic ethanol oxidation and methanogenesis in acidic peat from a northern wetland. **Applied Environmental Microbiology**, v. 71, p. 8191-8200, 2005.

MORGAN, J. W.; EVISON, L. M.; FORSTER, C. F. Changes to the microbial ecology in anaerobic digesters treating ice cream wastewater during start-up. **Water Research**, v. 25, n. 6, p. 639-653, 1991.

MOSEY, F. E. Mathematical modelling of the anaerobic digestion process: regulatory mechanisms for the formation of short-chain volatile acids from glucose. **Water Science and Technology**, v. 15, n. 8/9, p. 209-232, 1983.

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

MOTTE, J. C. et al. Combination of dry dark fermentation and mechanical pretreatment for lignocellulosic deconstruction: an innovative strategy for biofuels and volatile fatty acids recovery. **Applied Energy**, v. 147, p. 67-73, 2015.

- MU, Y. et al. Microbial production of 1, 3-propanediol by *Klebsiella pneumonia* using crude glycerol from biodiesel preparations. **Biotechnology Letters**, v. 28, n. 21, p. 1755-1759, 2006.
- MULLER, N. et al. Syntrophic butyrate and propionate oxidation processes: from genomes to reaction mechanisms. **Environmental Microbiology Reports**, v. 2, n. 4, p. 489-499, 2010.
- 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, 2011.
- NOVAES, R. F. V. Microbiology of anaerobic digestion. **Water Science and Technology**, v. 18, n. 12, p. 1-14, 1986.
- PACHAPUR, V. L. et al. 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, 2015.
- PARENTE JUNIOR, E. S. A. Evolução da indústria do biodiesel no Brasil. In: MENEZES, R. S. (Ed.). **Biodiesel no Brasil: impulso tecnológico**. Lavras: UFLA, 2016. v. 1, cap. 1, p. 20-36.
- PARK, S.; LI, Y. Evaluation of methane production and macronutrient degradation in the anaerobic co-digestion of algae biomass residue and lipid waste. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 42-48, 2012.
- PFLÜGL, S. et al. 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, 2014.
- PHILIP, S.; KESHAVARZ, T.; ROY, I. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 82, n. 3, p. 233-247, 2007.
- PLOWMAN, J.; PECK, M. W. Use of a novel method to characterize the response of spores of non-proteolytic *Clostridium botulinum* types B, E and F to a wide range of germinants and conditions. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, n. 4, p. 681-694, 2002.
- POHLAND, F. G.; GHOSH, S. Developments in anaerobic stabilization of organic wastes - the two-phase concept. **Environmental Letters**, v. 1, n. 4, p. 255-266, 1971.
- POSADA, J. A.; RINCÓN, L. E.; CARDONA, C. A. Design and analysis of biorefineries based on raw glycerol: addressing the glycerol problem. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 282-293, 2012.
- QIAN, C.-X. et al. Hydrogen production by mixed culture of several facultative bacteria and anaerobic bacteria. **Progress in Natural Science: Materials International**, v. 21, n. 6, p. 506-511, 2011.
- QUANTO custa produzir biodiesel? **BiodieselBr**, maio 2006.

RAMOS, L. P.; CÉSAR-OLIVEIRA, M. A. F.; MOTA, L. P. Uso de coprodutos: desenvolvimento de aplicações tecnológicas para a glicerina. In: MENEZES, R. S. (Ed.). **Biodiesel no Brasil: impulso tecnológico**. Lavras: UFLA, 2016. v. 1, cap. 9, p. 191-217.

RANDALL, A. A. et al. The effect of volatile fatty acids on enhanced biological phosphorus removal and population structure in anaerobic/aerobic sequencing batch reactors. **Water Science and Technology**, v. 35, n. 1, p. 153-160, 1997.

RAZAVIARANI, V.; BUCHANAN, I. D. Anaerobic co-digestion of biodiesel waste glycerin with municipal wastewater sludge: microbial community structure dynamics and reactor performance. **Bioresource Technology**, v. 182, p. 8-17, 2015.

RAZAVIARANI, V. et al. Pilot scale anaerobic co-digestion of municipal wastewater sludge with biodiesel waste glycerin. **Bioresource Technology**, v. 133, p. 206-212, 2013.

RIBEIRO, M. C.; SOARES, M. M. S. R. **Microbiologia prática: roteiro e manual: bactérias e fungos**. Rio de Janeiro: Atheneu, 1993. 112 p.

ROCHA, M. A. G. da et al. Avaliação e comparação entre a atividade metanogênica específica de lodos de esgotos doméstico e industriais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 21., 2001, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: ABES, 2001.

RODRIGUES, C. V. et al. 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, 2016.

ROSA, P. R. F. et al. Characterization and antimicrobial activity of lactic acid bacteria from fermentative bioreactors during hydrogen production using cassava processing wastewater. **Chemical Engineering Journal**, v. 284, p. 1-9, 2016.

ROSSI, D. M. et al. 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, 2011.

ROSSI D. M. et al. Bioconversion of residual glycerol from biodiesel synthesis into 1,3-propanediol and ethanol by isolated bacteria from environmental consortia. **Renewable Energy**, v. 39, n. 1, p. 223-227, 2012.

ROSSI, D. M. et al. Conversion of residual glycerol from biodiesel synthesis into 1,3-propanediol by a new strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Renewable Energy**, v. 55, p. 404-409, 2013.

SÁ, L. R. V. de. et al. Pentoses, hexoses and glycerin as substrates for biohydrogen production: an approach for Brazilian biofuel integration. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 7, p. 2986-2997, 2013.

- SÁ, L. R. V. de. et al. Produção de hidrogênio via fermentação anaeróbia - aspectos gerais e possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais brasileiros. **Química Nova**, São Paulo, v. 37, n. 5, p. 857-867, 2014.
- SAMUL, D.; LEJA, K.; GRAJEK, W. Impurities of crude glycerol and their effect on metabolite production. **Annals of Microbiology**, v. 64, n. 3, p. 891-898, 2014.
- SANIBAL, E. A. A.; MANCINI-FILHO, J. Physical, chemical and nutritional changes oils submitted to the frying process. **Food Ingredients South America**, v. 18, p. 64-71, 2002.
- SANTOS, K. G. et al. Glicerina: utilidades e destinações. **Acta Iguazu**, v. 2, n. 4, p. 109-119, 2013.
- SARMA, S. J. et al. Microbial hydrogen production by bioconversion of crude glycerol: a review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 8, p. 6473-6490, 2012.
- SARMA, S. J. et al. Bio-hydrogen production by biodiesel-derived crude glycerol bioconversion: a techno-economic evaluation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 36, n. 1, p. 1-10, 2013a.
- SARMA, S. J. et al. 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, 2013b.
- SAXENA, R. K. et al. Microbial production of 1,3-propanediol: recent developments and emerging opportunities. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 6, p. 895-913, 2009.
- SCHÖN, M. **Numerical modelling of anaerobic digestion processes in agricultural biogas plants**. 2009. 139 f. Dissertation (Doktor der Technischen Wissenschaften) - Fakultät für Bauingenieurwissenschaften, Universität Innsbruck, Austria, 2009.
- SCHWENGBER, C. A. et al. Overview of glycerol reforming for hydrogen production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 58, p. 259-266, 2016.
- SELEMBO, P. A. et al. Enhanced hydrogen and 1,3-propanediol production from glycerol by fermentation using mixed cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 104, n. 6, p. 1098-1106, 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. 102 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.
- SHAH, F. A. et al. Co-digestion, pretreatment and digester design for enhanced methanogenesis. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 42, p. 627-642, 2015.
- SHANMUGAM, S. R. et al. Statistical optimization of conditions for minimum H₂ consumption in mixed anaerobic cultures: effect on homoacetogenesis and methanogenesis. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 28, p. 15433-15445, 2014.

SHARMA, Y.; PARNAS, R.; LI, B. Bioenergy production from glycerol in hydrogen producing bioreactors (HPBs) and microbial fuel cells (MFCs). **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 6, p. 3853-3861, 2011.

SHIN, J.-H. et al. Fermentative hydrogen production by the newly isolated *Enterobacter asburiae* SNU-1. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 32, n. 2, p. 192-199, 2007.

SILES LÓPEZ, J. Á. et al. Anaerobic digestion of glycerol derived from biodiesel manufacturing. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 23, p. 5609-5615, 2009.

SILVA, G. P. da.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 1, p. 30-39, 2009.

SILVESTRE, G.; FERNÁNDEZ, B.; BONMATÍ, A. Addition of crude glycerine as strategy to balance the C/N ratio on sewage sludge thermophilic and mesophilic anaerobic co-digestion. **Bioresource Technology**, v. 193, p. 377-385, 2015.

SINHA, P.; PANDEY, A. An evaluative report and challenges for fermentative biohydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 13, p. 7460-7478, 2011.

SIQUEIRA, M. R.; REGINATTO, V. Inhibition of fermentative H₂ production by hydrolysis byproducts of lignocellulosic substrates. **Renewable Energy**, v. 80, p. 109-116, 2015.

SITTIJUNDA, S.; REUNGSANG, A. Media optimization for biohydrogen production from waste glycerol by anaerobic thermophilic mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 20, p. 15473-15482, 2012.

SIVAGURUNATHAN, P. et al. 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, 2016.

SONG, Z.-X. et al. Effects of pretreatment method of natural bacteria source on microbial community and bio-hydrogen production by dark fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 7, p. 5631-5636, 2012.

SRIKANTH, S. et al. Acetate and butyrate as substrates for hydrogen production through photo-fermentation: process optimization and combined performance evaluation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 17, p. 7513-7522, 2009.

SUAREZ, P. A. Z. et al. Transformação de triacilglicerídeos em combustíveis, materiais poliméricos e insumos químicos: algumas aplicações da catálise na oleoquímica. **Química Nova**, v. 30, p. 667-676, 2007.

SUEHARA, K.-I. et al. Biological treatment of wastewater discharged from biodiesel fuel production plant with alkali-catalyzed transesterification. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, n. 4, p. 437- 442, 2005.

SZYMANOWSKA-POWAŁOWSKA, D. 1,3-propanediol production from crude glycerol by *Clostridium butyricum* DSP1 in repeated batch. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 6, p. 322-328, 2014.

- TALARICO, T. L. et al. Utilization of glycerol as a hydrogen acceptor by *Lactobacillus reuteri*: purification of 1,3-propanediol: NAD⁺ oxidoreductase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 943-948, 1990.
- TEMUDO, M. F. et al. Diversity of microbial communities in open mixed culture fermentations: impact of the pH and carbon source. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, n. 6, p. 1121-1130, 2008a.
- TEMUDO, M. F. et al. Glycerol fermentation by (open) mixed cultures: a chemostat study. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 100, n. 6, p. 1088-1098, 2008b.
- TOERIEN, D. F.; HATTINGH, W. H. J. Anaerobic digestion I. The microbiology of anaerobic digestion. **Water Research**, v. 3, n. 6, p. 385-416, 1969.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Anatomia funcional de células procarióticas e eucarióticas. In: _____. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. Cap. 4, p. 76-112.
- TRCHOUNIAN, K.; TRCHOUNIAN, A. Hydrogen production from glycerol by *Escherichia coli* and other bacteria: an overview and perspectives. **Applied Energy**, v. 156, p. 174-184, 2015.
- UENO, Y. et al. Biological production of hydrogen from cellulose by natural anaerobic microflora. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 79, n. 4, p. 395-397, 1995.
- UPRETY, B. K.; DALLI, S. S.; RAKSHIT, S. K. Bioconversion of crude glycerol to microbial lipid using a robust oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* ATCC 10788 capable of growing in the presence of impurities. **Energy Conversion and Management**, v. 135, p. 117-128, 2017.
- VALDEZ-VAZQUEZ, I.; POGGI-VARALDO, H. M. Hydrogen production by fermentative consortia. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, n. 5, p. 1000-1013, 2009.
- VALENTE, J. P. S.; PADILHA, P. M.; SILVA, A. M. M. Oxigênio dissolvido (OD), demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (DQO) como parâmetros de poluição no ribeirão Lavapés/Botucatu - SP. **Eclética Química**, v. 22, p. 49-66, 1997.
- VAN ANDEL, J. G. et al. Glucose fermentation by *Clostridium butyricum* grown under a self generated gas atmosphere in chemostat culture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 21-26, 1985.
- VARRONE, C. et al. Statistical optimization of biohydrogen and ethanol production from crude glycerol by microbial mixed culture. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 21, p. 16479-16488, 2012.
- VASUDEVAN, P. T.; BRIGGS, M. Biodiesel production - current state of the art and challenges. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 35, n. 5, p. 421-430, 2008.

VAVILIN, V. A.; RYTOW, S. V.; LOKSHINA, L. Y. Modelling hydrogen partial pressure change as a result of competition between the butyric and propionic groups of acidogenic bacteria. **Bioresource Technology**, v. 54, n. 2, p. 171-177, 1995.

VIANA, M. B. **Produção de biogás a partir de glicerol oriundo de biodiesel**. 2011. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

VIANA, Q. M. et al. Fermentative H₂ production from residual glycerol: a review. **Biotechnology Letters**, v. 36, n. 7, p. 1381-1390, 2014.

VIVEK, N.; PANDEY, A.; BINOD, P. Biological valorization of pure and crude glycerol into 1,3-propanediol using a novel isolate *Lactobacillus brevis* N1E9.3.3. **Bioresource Technology**, v. 213, p. 222-230, 2016.

VON SPERLING, M. Legislação ambiental e impacto do lançamento de efluentes nos corpos receptores. In: _____. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. 3. ed. Minas Gerais: UFMG/DESA, 2005. Cap. 3, p. 135-234. Princípios do tratamento biológico de águas residuárias, v. 1.

WANG, J. et al. Trophic link between syntrophic acetogens and homoacetogens during the anaerobic acidogenic fermentation of sewage sludge. **Biochemical Engineering Journal**, v. 70, p. 1-8, 2013.

WIJNKER, J. J. et al. Reduction of *Clostridium sporogenes* spore outgrowth in natural sausage casings using nisin. **Food Microbiology**, v. 28, n. 5, p. 974-979, 2011.

WILKENS, E. et al. High-level production of 1,3-propanediol from crude glycerol by *Clostridium butyricum* AKR102a. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 3, p. 1057-1063, 2012.

WILLIAM, F. O.; GENE, F. P. Fundamentals of anaerobic digestion of wastewater sludges. **Journal of Environmental Engineering**, v. 112, n. 5, p. 867-920, 1986.

WOJTUSIK, M. et al. 1,3-propanediol production by *Klebsiella oxytoca* NRRL-B199 from glycerol. Medium composition and operational conditions. **Biotechnology Reports**, v. 6, p. 100-107, 2015.

WOODWARD, J. et al. Enzymatic production of biohydrogen. **Nature**, v. 405, p. 1014-1015, 2000.

XIA, A. et al. Fermentative hydrogen production using algal biomass as feedstock. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 51, p. 209-230, 2015.

XIE, B. et al. Cogeneration of hydrogen and methane from glucose to improve energy conversion efficiency. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 19, p. 5006-5011, 2008.

YANG, F.; HANNA, M. A.; SUN, R. Value-added uses for crude glycerol-a byproduct of biodiesel production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 1, p. 1-10, 2012.

ZENG, A.-P. Pathway and kinetic analysis of 1,3-propanediol production from glycerol fermentation by *Clostridium butyricum*. **Bioprocess Engineering**, v. 14, n. 4, p. 169-175, 1996.

ZENG, A.-P.; DECKWER, W.-D. A model for multiproduct-inhibited growth of *Enterobacter aerogenes* in 2,3-butanediol fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 1, p. 1-3, 1991.

ZENG, A.-P.; BIEBL, H.; DECKWER, W.-D. Effect of pH and acetic acid on growth and 2,3-butanediol production of *Enterobacter aerogenes* in continuous culture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 5, p. 485-489, 1990.

ZENG, A.-P. et al. Multiple product inhibition and growth modeling of *Clostridium butyricum* and *Klebsiella pneumoniae* in glycerol fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 44, n. 8, p. 902-911, 1994.

ZHANG, C.; LV, F.-X.; XING, X.-H. Bioengineering of the *Enterobacter aerogenes* strain for biohydrogen production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 18, p. 8344-8349, 2011.

ZHANG, Y. P. et al. Inactivation of aldehyde dehydrogenase: a key factor for engineering 1,3-propanediol production by *Klebsiella pneumoniae*. **Metabolic Engineering**, v. 8, n. 6, p. 578-586, 2006.

ZWIETERING, M. H. et al. Modeling of the bacterial growth curve. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1875-1881, 1990.

ANEXO A - Determinação de Ácidos e Alcoóis por GC/FID

Objetivos:

- ✓ Curvas analíticas entre 10 mg/L e 1000 mg/L;

Metodologia:

- ✓ Desenvolvimento das curvas analíticas com os parâmetros de amostragem e cromatográficos estabelecidos.

Preparar uma solução de NaOH 230 g L⁻¹ adicionando-se 2,3 g em um balão volumétrico de 10 mL.

Preparar soluções stock de cada analito (Tabela 1) na concentração de 20 g L⁻¹ adicionando-se 0,5 g em balões volumétricos de 25 mL. Antes de completar o volume do balão com água destilada, adicionar 1 mL da solução de NaOH 230 g L⁻¹ nas soluções stock dos ácidos isobutírico, butírico, isovalérico, valérico e crotônico.

Tabela A1. Analitos

Classe	Analitos							
Cetona	acetona							
Álcool	metanol	etanol	n-propanol	isobutanol	n-butanol			
Ácido	acético	propiónico	isobutírico	butírico	isovalérico	valérico	capróico	

Preparar a Solução Mãe de 1 g L⁻¹ adicionando-se 5 mL de cada solução stock em um balão de 100 mL;

Preparar as soluções para as curvas analíticas através da Tabela 2:

Tabela A2. Pontos das curvas analíticas.

Ponto	Balão	Vol S.M. (mL)	Conc. (mg L⁻¹)
1	25	0,25	10
2		0,5	20
3		1,25	50
4		2,0	80
5		2,5	100
6		6,25	250
7		10,0	400
8		15	600
9		20	800
10		Transf. direto ao vial	1000

Adicionar 1 g de NaCl em cada vial de *headspace* de 22 mL, transferir 2 mL de da solução e clímpar o vial.

Análise de amostras reais

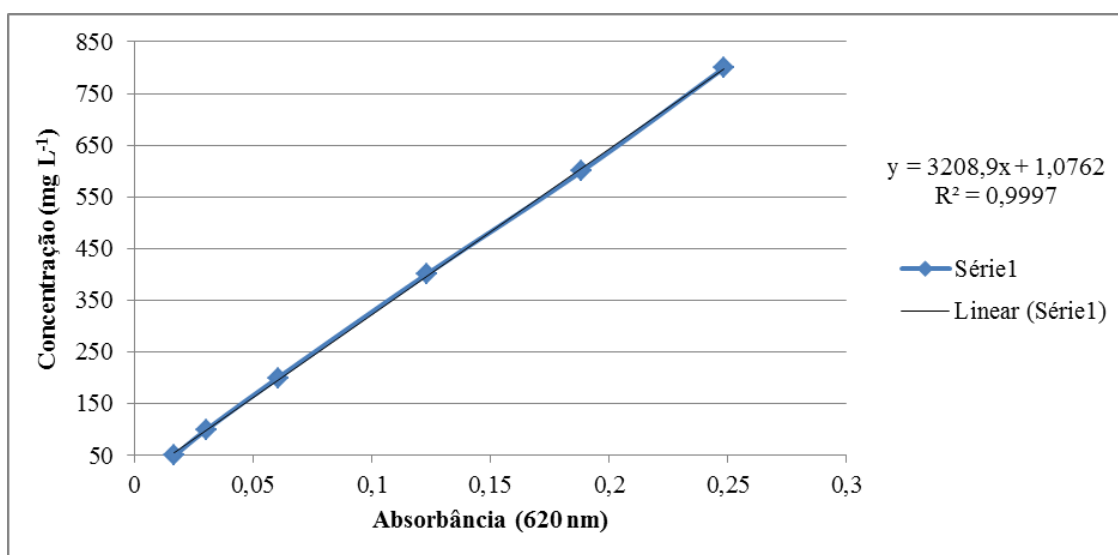
1. Diluir amostra quando necessário. Adicionar 2 g de NaCl no vial de HS, transferir 2 mL da solução e clímpar o vial.

ANEXO B- Curva de calibração para análise da DQO

Tabela B1 – Leituras de absorvância em relação a concentração (mg L^{-1}) para construção da curva de calibração, realizados em triplicata.

Concentração (mg L^{-1})	Absorvância (620 nm)		Média
50	0,018	0,016	0,017
100	0,031	0,030	0,031
200	0,061	0,060	0,061
400	0,123	0,123	0,123
600	0,188	0,189	0,189
800	0,248	0,249	0,249

Figura B1 – Obtenção da curva de calibração de DQO.



ANEXO C- Procedimento para realização da análise de glicerol livre

Reagentes de trabalho

- Solução estoque de ácido acético 1,6M
Foi preparada com 9,6 g de ácido acético/100mL
- Solução estoque de acetato de amônio 4,0M
Foi preparada com 30,8 g de acetato de amônio/100mL

} Estável ao longo
do tempo

} Estável ao longo
do tempo

Misturadas em volumes iguais, estas soluções resultam em uma solução tampão de pH 5,5

- Solução de acetilacetona 0,2M
 - 200 µL (195mg) de acetilacetona
 - +
 - 5 mL da solução estoque de ácido acético
 - +
 - 5 mL da solução estoque de acetato de amônio
- Solução de periodato de sódio 10mM
 - 21 mg meta periodato de sódio
 - +
 - 5 mL da solução estoque de ácido acético
 - Depois do periodato completamente dissolvido
 - +
 - 5 mL da solução estoque de acetato de amônio
- Solvente de trabalho
 - Água destilada
 - +
 - Etanol 95%

} Devem
ser
preparados
diariamente

} Devem
ser
preparados
diariamente

} Misturados em
volumes iguais

Usado para extração de amostras, reação e solução mãe do glicerol de referência.

- Solução estoque do glicerol de referência (~ 3 mg de glicerol/mL)

- 150 mg de glicerol
 - +
 - Solvente de trabalho até completar a marca do frasco de 50 mL
- } Estável
por
algumas
semanas

- Solução de trabalho do glicerol de referência (~ 0,03 mg de glicerol/mL)

- 1 mL da solução estoque do glicerol de referência
 - +
 - Solvente de trabalho até completar a marca do frasco de 100 mL
- } Estável
por
algumas
semanas

Preparação da curva de calibração

- Em tubos de 10 mL cada, fazer:

Número do tubo	Volume (mL) de Solução de trabalho do glicerol de referência (~0,036 mg/mL) glicerol	Valor correspondente à (mg de glicerol/mL)
1	0,00	0,000
2	0,25	0,009
3	0,50	0,018
4	0,75	0,027
5	1,00	0,036
6	1,25	0,045
7	1,50	0,054
8	1,75	0,063
9	2,00	0,072

- Adicionar a esses tubos:

- Solvente de trabalho até atingir a marca de 2mL

+

- 1,2 mL de solução de periodato de sódio

Agitar por 30 segundos

+

- 1,2 mL de solução de acetilacetona



Colocar em um banho termostato a 70°C por 1 minuto agitando manualmente



A amostra deve ser imediatamente resfriada pela imersão do tubo em um béquer contendo água de torneira, onde a água deve ser periodicamente trocada para manter uma temperatura constante próxima de 20-25°C



Amostras lidas no espectrofotômetro a 410 nm

- Em um tubo de 10 mL:

- 0,5 mL da amostra

+

- 1,5 mL de solvente de trabalho

+

- 1,2 mL de solução de periodato de sódio

Agitar por 30 segundos

+

- 1,2 mL de solução de acetilacetona



Colocar em um banho termostato a 70°C por 1 minuto agitando manualmente



A amostra deve ser imediatamente resfriada pela imersão do tubo em um béquer contendo água de torneira, onde a água deve ser periodicamente trocada para manter uma temperatura constante próxima de 20-25°C

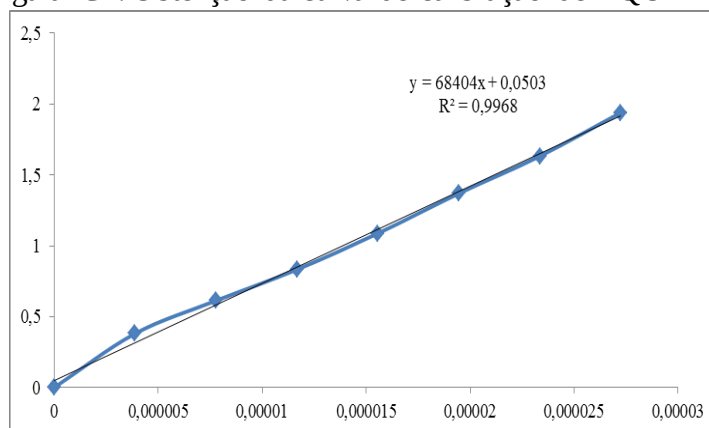


Amostras lidas no espectrofotômetro a 410 nm

Branco: Preparado da mesma maneira conforme descrito acima, contendo 2 mL de solvente de trabalho.

Determinação do Glicerol livre (Curva de calibração)	
mg glicerol/ mL	Absorbância (nm)
0	0
3,8925E-06	0,381
0,000007785	0,613
1,16775E-05	0,833
0,00001557	1,088
1,94625E-05	1,37
0,000023355	1,633
2,72475E-05	1,94

Figura C1. Obtenção da curva de calibração de DQO



ANEXO D - Protocolo para contagem em placas

O protocolo baseou-se no método de Song et al. (2012) “Effects of pretreatment method of natural bacteria source on microbial community and bio-hydrogen production by dark fermentation”.

Clostridium sp. (meio NN - Neomicina Nagler);
Enterobacter sp. (meio DHL - Dexoxocholato de Sulfito De Hidrogênio Lactose);
Lactobacillus sp. (meio LBS - Lactobacilli Selectiva);
Bacteroidetes sp. (meio NBGT - Neomicina verde brilhante taurocholato);
Veillonella sp. (meio VC - Veillonella seletiva);
Spreptococcus sp. (meio TATAC - Cloreto de Trifenil Tetrazólio Acridina Sulfato de Thallous Laranja Esculin Cristal Violeta).

Lista de reagentes:

NN(g/L) : Peptona 40.0, Fosfato dissódico (Na_2HPO_4) 5.0, Fosfato de Potássio Dibásico (K_2HPO_4) 1.0, Cloreto de sódio (NaCl) 2.0, Sulfato de magnésio (MgSO_4) 0.1, Glicose 2.0, Ágar 25.0, pH 7.6.	DHL(g/L) : Extrato de carne 3.0, Peptona 20.0, Sacarose 10.0, Desoxicolato de sódio 1.0, Tiosulfato de sódio 2.3, Citrato de amônio férrico 1.0, Citrato de sódio 1.0, Ágar 25.0, pH 7.4	NBGT(g/L) : Peptona 10.0, Extrato de carne 5.0, Fosfato dissódico (Na_2HPO_4) 4.0, Glicose 1.5, Amido 0.5, L-cisteína 0.5, Taurocolato de sódio 1.0 Ágar 25.0, pH 7.6
LBS(g/L) : Peptona 15.0, Extrato de carne 2.0, Glicose 20.0, Amido 0.5, Cloreto de sódio (NaCl) 5.0, 5% L-cisteína 10.0mL (0,5g), Acetato de sódio 15.0, Ácido acético 3.7mL, Ágar 25.0, pH7.5	TATAC(g/L) : Peptona 15.0, Triptona10.0, Extrato de carne 10.0, Sacarose1.0, Esculin hidratado 1.0, Azida de sódio 0.45, Ágar 25.0, pH 7.6	VS(g/L) : Triptona 5.0 , Extrato de carne 3.0, Ácido tioglicólico ($\text{CH}_2(\text{SH})\text{COONa}$) 0.75, Tween-80 1.0, Lactato de sódio ($\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3\text{Na}$) 50% 25.00mL, Ágar 25.0, pH 7.5

Preparo das placas

Pesar todos os reagentes e diluí-los água destilada. Corrigir o pH e avolumar em balão com volume de trabalho.

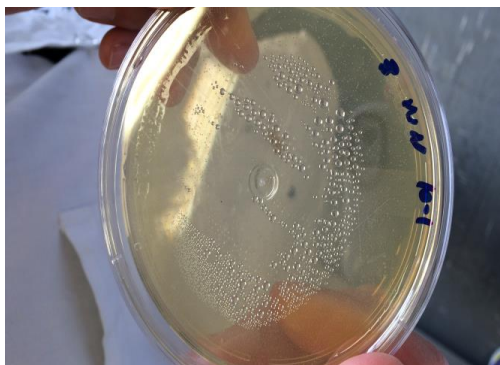
OBS: Nos meios onde ocorrer a adição da L-cisteína, ela deverá ser adicionada APÓS o processo de autoclavagem. Preparar o volume indicado e guardar para adição posterior.

Transferir a solução do balão para um Erlenmeyer com 50% da sua capacidade (exemplo: volume de trabalho 1 L => utilizar Erlenmeyer de 2 L). Proceder ao aquecimento

até que a solução se torne translúcida. Esse procedimento é realizado para a diluição completa do ágar.

Obs 1: fazer a agitação do Erlenmeyer em períodos de 2 minutos durante o aquecimento – usar luvas de proteção.

1. Interrompido aquecimento, fechar o Erlenmeyer utilizando, respectivamente, espuma e papel, presos como elástico. Todo o material que será usado para o plaqueamento deverá ser empacotado com papel alumínio e fechado com fita crepe (não utilizar fita adesiva do tipo durex). Materiais que serão autoclavados: alças de drigalski, filtro para seringa - utilizado para filtragem da solução de L-cisteína -, caixa com ponteiros (a caixa pode ser fechadas com fita, não sendo necessário embrulhá-las em papel alumínio), Becker contendo eppendorfs, etc.
2. Levar o material para autoclave e esterilizar por 20 minutos a temperatura de 121° C.
3. Retirar o material da autoclave e mantê-lo na estufa até seu uso. Esperar os Erlenmeyers esfriarem até que seja possível manuseá-los.
4. Fazer a limpeza do fluxo laminar com pano úmido –usar sabão ou álcool e depois água sanitária. Após a limpeza, ligar a lâmpada UV por aproximadamente 15 minutos - isto irá ajudar na descontaminação da área de trabalho. Atentar-se às instruções de segurança do aparelho – Fechar o vidro de proteção de radiação UV sempre que a lâmpada UV estiver acesa.
5. Antes de iniciar o processo de adição dos meios nas placas, realizar a higienização das mãos até a altura dos cotovelos utilizando água, sabão e álcool 70%.
6. Com o meio ainda quente, adicionar um volume de aproximadamente 25 mL na placa – cerca de metade da capacidade da placa de tamanho padrão. Caso deseje meio mais espesso, aumentar o volume. Deve-se evitar a presença de bolhas na placa. Caso haja a formação, fazer movimentos circulares para dissipá-las, ou, permanecendo a bolha, fazer esse procedimento até que haja o deslocamento da bolha para a lateral da placa. Ao manusear o Erlenmeyer, fazer movimentos lentos para evitar a agitação e consequente formação de bolhas.
7. As placas deverão ser mantidas semiabertas para saída do vapor, evitando o acúmulo de água na tampa.



8. Com o meio já sólido, fechar e identificar as placas – utilizar as laterais, de forma que, posteriormente, não prejudique a visualização das colônias. Armazená-las fechadas na geladeira com a tampa virada para baixo, evitando o acúmulo de água na superfície do meio de cultivo. Mantê-las juntas e fechadas para evitar a contaminação.



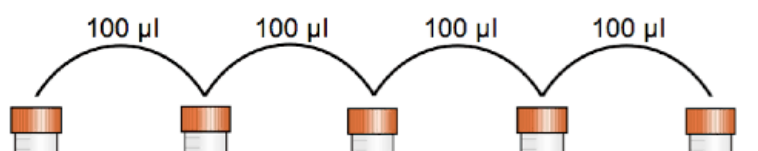
Incubação das placas

Todo o processo deverá ser realizado dentro do fluxo laminar. Realizar a higienização das mãos conforme o procedimento descrito anteriormente. Fazer a disposição dos materiais (inclusive os que estavam guardados dentro da estufa). Manter a lâmpada UV ligada por 15 minutos antes de iniciar o procedimento. Fazer prévia limpeza dos materiais que não podem ser autoclavados e serão usados dentro do fluxo laminar, como, por exemplo, canetas – usar álcool 70%.

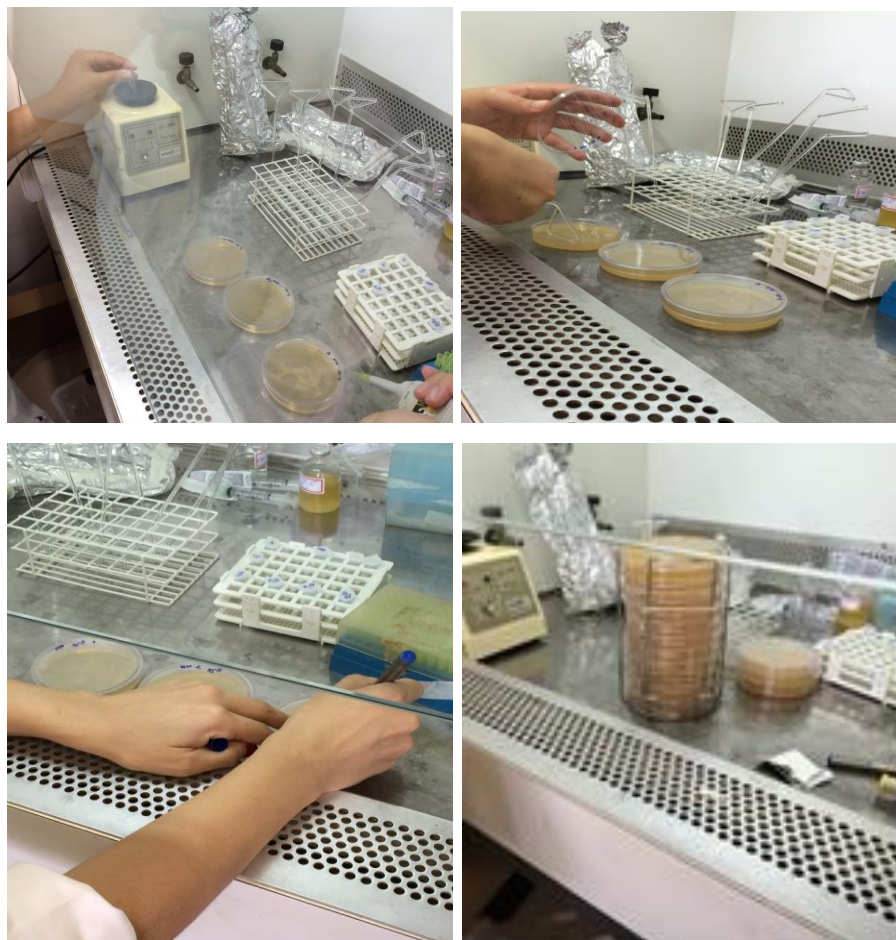
1. Para a incubação das placas é necessário escolher as diluições que serão utilizadas. Ao fazer a abertura e o fechamento do eppendorf evite o contato com a parte interna. Adicionar 900 μ L de PBS em todos os eppendorf e identifica-los. Pipetar 100 μ L da

amostra do inóculo para a primeira diluição (1° diluição - 10^{-1}). Transferir 100 μL do tubo da diluição 1 para um segundo tubo com 900 μL de PBS (2° diluição - 10^{-2}).

2. Repetir o procedimento de diluições seriadas (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} ...). Fazer isto sucessivamente até obter a diluição desejada e que permita contar as Unidades Formadoras de Colônia.



3. Antes de adicionar as amostras nas placas, realizar a secagem externa das tampas caso haja acúmulo de água.
4. Inicie o procedimento, preferencialmente, a partir da amostra mais diluída. Homogeneizar a amostra no agitador/vórtex e pipetar vagarosamente 100 μL no centro da placa. Imediatamente, promover o espalhamento da amostra na superfície da placa com o auxílio de uma Alça de Drigalski. Este procedimento é importante para que as células fiquem afastadas umas das outras e formem colônias individualizadas. Evitar que ponteiros e alças entrem em contato com outros materiais disposto no fluxo.
5. Identificar cada uma das placas com a diluição respectiva, data e nome do operador.



6. Após o inóculo das placas, empilha-las com as tampas para baixo dentro da jarra de anaerobiose. Colocar o indicador e o sachê de anaerobiose nos compartimentos indicados e realizar o fechamento da jarra. Mantê-la a 36° C. Ficar atento ao fechamento da válvula localizada na tampa da jarra (indicado na figura).



Obs: O indicador ficará rosa na presença de oxigênio e branco a ausência.

Contagem das colônias

1. Proceder a abertura da jarra e verificar se o indicador está branco – garantia de que dentro da jarra não havia oxigênio.



2. A contagem das colônias correu após 6 dias de incubação. A contagem pode ser feita em um período inferior, desde que haja colônias suficientemente desenvolvidas.
3. Escolher as placas que contenham de 30 a 300 colônias e efetuar a contagem. Determinar o valor médio de colônias por placa e multiplicar pelo factor de diluição. O resultado será expresso em UFC/mL.

Ex: 84 colônias => diluição (10^{-3}) + volume da amostra adicionado à placa (10^{-1}) => 84×10^{-4} ou $8,4 \times 10^{-5}$. O resultado será expresso com a notação positiva ($8,4 \times 10^5$ UFC).