

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA  
QUÍMICA

**TALITA CORRÊA NAZARETH**

**Produção microbiológica de ácido propiônico, 1,3-propanodiol e hidrogênio a partir de glicerol bruto em reator anaeróbico de leito fluidizado**

**São Carlos  
2015**

**TALITA CORRÊA NAZARETH**

**Produção microbiológica de ácido propiônico, 1,3-propanodiol e hidrogênio a partir de glicerol bruto em reator anaeróbio de leito fluidizado**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Silva

**São Carlos  
2015**

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar  
Processamento Técnico  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

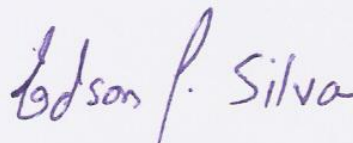
N335p Nazareth, Talita Corrêa  
Produção microbiológica de ácido propiônico, 1,3-  
propanodiol e hidrogênio a partir de glicerol bruto  
em reator anaeróbico de leito fluidizado / Talita  
Corrêa Nazareth. -- São Carlos : UFSCar, 2015.  
111 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de  
São Carlos, 2015.

1. Ácido propiônico. 2. 1,3-propanodiol. 3.  
Hidrogênio. 4. Reator anaeróbico de leito fluidizado.  
5. Glicerol bruto. I. Título.

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE TALITA CORRÊA NAZARETH APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 24 DE ABRIL DE 2015.

BANCA EXAMINADORA:



Edson Luiz Silva  
**Orientador, UFSCar**



Regiane Priscila Ratti Sartori  
**USP**



José Alberto Domingues Rodrigues  
**IMT**

Este trabalho foi desenvolvido no Departamento de Engenharia Química – DEQ pelo programa de Pós-Graduação em Engenharia Química – PPGEQ da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar.

Contou com o apoio financeiro do programa de bolsas de Mestrado da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas - FAPEAM (Programa RH – Mestrado).



SECRETARIA DE ESTADO DE  
**PLANEJAMENTO,  
DESENVOLVIMENTO, CIÊNCIA,  
TECNOLOGIA E INOVAÇÃO**



Aos meus pais José e Fátima.

Aos meus irmãos Marco, Tatiana, Tayana e Davi.

Ao meu noivo Conrado.

“Porque Deus amou o mundo de tal maneira que deu o seu Filho unigênito, para que todo aquele que nele crê não pereça, mas tenha a vida eterna.”

I João 3:16

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por tudo o que Ele tem feito na minha vida.  
Aos meus pais José e Fátima, ao meu noivo Conrado, aos meus irmãos e irmãs Tatiana,  
Tayana, Marco, Davi e minhas sobrinhas Sarah e Isabelle, obrigada pelo amor  
compartilhado!

Agradeço também a minha prima Anne, Pamela e Kássia pela querida amizade.

Ao professor Edson Luiz Silva pela oportunidade e orientação neste trabalho.

Aos colegas de laboratório pelo apoio na parte experimental e pelo conhecimento  
compartilhado.

Aos técnicos Amadeus e Oscar por todo apoio no decorrer da etapa experimental deste  
trabalho.

Ao PPG EQ-UFSCar pela oportunidade de realizar o mestrado nesta conceituada  
instituição.

A FAPEAM pela bolsa de mestrado concedida.

Aos professores Marcelo Zaiat, Regiane Ratti e José Alberto Domingues pelas  
sugestões no exame de qualificação e defesa da dissertação.

A todos que colaboraram de alguma forma.

Muito obrigada!



## RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo produzir ácido propiônico, 1,3-propanodiol e hidrogênio em reator anaeróbico de leito fluidizado com pneu triturado como material suporte para adesão da biomassa. O experimento ocorreu durante 278 dias, em seis fases distintas distribuídas em função do tempo de detenção hidráulica (TDH), que variou entre 8 e 0,5 h. O reator foi mantido em condições mesofílicas (30 °C), com pH controlado entre 4,5 e 5,5 e possuía glicerol bruto como fonte de carbono na concentração de 5 g L<sup>-1</sup>. O inóculo utilizado no experimento foi proveniente de estação de tratamento de efluente de abatedouro de aves. Os resultados obtidos mostram que o consumo de substrato atingiu o maior valor de conversão (89,8 %) no TDH de 6 h. O biogás produzido foi composto de H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>, tendo o maior conteúdo de H<sub>2</sub> registrado (81,2 %) no TDH de 4 h. Os principais metabólitos solúveis obtidos foram ácido propiônico e 1,3-propanodiol com rendimentos máximos de 1,77 e 0,82 mol.mol<sub>glicerol</sub><sup>-1</sup>, respectivamente. Ambos os rendimentos máximos foram atingidos no TDH de 8 h. Em todas as fases apresentadas, ocorreu a predominância de ácido propiônico, sendo a maior porcentagem molar (96,9 %) atingida no TDH de 0,5 h. O segundo metabólito mais produzido foi o 1,3-propanodiol, alcançando maior porcentagem molar (29,4 %) no TDH de 6 h.

Palavras-Chave: Ácido propiônico, 1,3-propanodiol, H<sub>2</sub>, reator anaeróbico de leito fluidizado, glicerol bruto, pneu, TDH.

## ABSTRACT

This study aimed to produce propionic acid, 1,3-propanediol and hydrogen in anaerobic fluidized bed reactor with grounded tire as support material for immobilization of biomass. The experiment took place during 278 days in six distinct phases distributed according to the hydraulic retention time (HRT), which ranged between 8 and 0.5 h. The reactor was maintained at mesophilic conditions (30 ° C) with controlled pH between 4.5 and 5.5 and crude glycerol as carbon source at a concentration of 5 g L<sup>-1</sup>. The inoculum used in the experiment was derived from the processing of poultry slaughterhouse wastewater station. The results show that the consumption of substrate conversion reached the highest value (89.8 %) in HRT of 6 hours. The biogas produced was composed of H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> and the greatest recorded content of H<sub>2</sub> has been reached (81.2%) in HRT of 4 hours. The principal soluble metabolite produced were propionic acid and 1,3-propanediol, with maximum yields of 1,77 and 0,82 mol.mol<sub>glycerol</sub><sup>-1</sup>, respectively. Both maximum yields were achieved in HRT of 8 h. At all stages of this work occurred predominantly propionic acid, with maximum molar percentage (96,9 %) achieved in HRT of 0,5 h. The second predominant metabolite obtained was 1,3-propanediol, achieving greater molar percentage (29.4%) in HRT of 6 hours.

Keywords: Propionic acid, 1,3-propanediol, H<sub>2</sub>, anaerobic fluidized bed reactor, crude glycerol, tires, TDH.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 3-1: Reação de transesterificação de triglicerídeos com álcool .....	17
Figura 3-2: Esquematização do processo básico de produção de biodiesel .....	18
Figura 3-3: Potencialidade brasileira para produção e consumo de combustíveis vegetais .....	20
Figura 3-4: Estimativa da produção de biodiesel para consumo interno.....	21
Figura 3-5: Estimativa de produção total de biodiesel .....	22
Figura 3-6: Estrutura molecular do glicerol .....	23
Figura 3-7: Principais setores industriais de aplicação da glicerina.....	25
Figura 3-8: Produtos finais a partir da fermentação do glicerol por diferentes microrganismos .....	29
Figura 3-9: Aplicações do 1,3-propanodiol.....	41
Figura 4-1: Fluxograma do procedimento experimental .....	59
Figura 4-2: Esquema da instalação experimental do reator anaeróbio de leito fluidizado .....	60
Figura 4-3: Reator anaeróbio de leito fluidizado mesofílico.....	61
Figura 4-4: Material suporte (pneu triturado inservível).....	62
Figura 5-1: Concentrações e conversões médias de glicerol em função do TDH.....	68
Figura 5-2: Redução de DQO em função do TDH.....	73
Figura 5-3: Valores médios de pH afluente e efluente em função do TDH .....	75
Figura 5-4: Concentração de ácido propiônico e 1,3-propanodiol em função do TDH .	79
Figura 5-5: Porcentagem molar de metabólitos produzidos em função do TDH.....	82
Figura 5-6: Comparação do conteúdo médio de H <sub>2</sub> no biogás em função do TDH.....	85
Figura 5-7: Efeito do TDH na seletividade (HPrY/1,3-PDY) no RALF.....	96
Figura 5-8: Produção volumétrica de HPr e 1,3-PD em função do TDH.....	97
Figura 5-9: Microscopia eletrônica de varredura dos microrganismos aderidos às partículas de pneu no TDH de 0,5 h .....	101

## LISTA DE TABELAS

Tabela 3-1: Características físico-químicas do biodiesel (ésteres etílicos) de várias espécies vegetais e do óleo diesel convencional (tipo C).....	19
Tabela 3-2: Propriedades físico-químicas do glicerol .....	24
Tabela 3-3: Influência do pH no tempo de fermentação e na formação de produtos.....	30
Tabela 3-4: Máximo rendimentos teóricos de 1,3-Propanodiol a partir do glicerol.....	37
Tabela 3-5: Propriedades Físico-químicas do ácido propiônico .....	38
Tabela 3-6: Propriedades físico-químicas do 1,3-propanodiol.....	41
Tabela 3-7: Poder calorífico de diferentes combustíveis.....	45
Tabela 3-8: Principais microrganismos, tipo de reator e seus metabólitos formados a partir da fermentação do glicerol.....	53
Tabela 3-9: Principais microrganismos, tipo de reator e seus metabólitos formados a partir da fermentação do glicerol (Continuação).....	54
Tabela 4-1: Dimensão, densidade e velocidade de mínima fluidização para a partícula de pneu.....	62
Tabela 4-2: Composição da água residuária sintética .....	63
Tabela 4-3: Especificações do Glicerol utilizado no experimento .....	64
Tabela 4-4: Frequência de análises de monitoramento do reator .....	67
Tabela 5-1: Valores médios de conversão e concentração em função do TDH .....	69
Tabela 5-2: Comparação entre o trabalho atual e os reportados na literatura em relação à conversão de glicerol.....	71
Tabela 5-4: Concentração e eficiência de redução de DQO em função do TDH.....	74
Tabela 5-5: Valores de pH afluente e efluente em função do TDH .....	76
Tabela 5-6: Concentração ( $\text{g L}^{-1}$ ) dos principais metabólitos obtidos em função do TDH .....	78
Tabela 5-7: Porcentagem molar dos principais metabólitos obtidos em função do TDH .....	83
Tabela 5-8: Conteúdo de $\text{H}_2$ no biogás formado em função do TDH .....	87
Tabela 5-9: Produção volumétrica média de hidrogênio.....	87
Tabela 5-10: Produção volumétrica de hidrogênio em função do TDH de $\text{TCO}_{\text{apl}}$ .....	89
Tabela 5-11: Rendimento de ácido propiônico em função do TDH.....	91
Tabela 5-12: Rendimento de 1,3-propanodiol em função do TDH.....	94
Tabela 5-13: Produção volumétrica de HPr e 1,3-PD em função do TDH.....	98
Tabela 5-14: Balanço de DQO do RALF .....	102

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

1,3-PD: 1,3-propanodiol

C DQO: Concentração de DQO

Cg: Concentração de glicerol

CSTR: Reator Contínuo de Tanque Agitado

DQO: Demanda Química de Oxigênio

E d<sub>qo</sub>: Eficiência de redução de DQO

E<sub>cg</sub>: Eficiência de conversão de glicerol

EtOH: Etanol

HAc: Ácido Acético

HBu (Iso): Ácido Isobutírico

HBu: Ácido Butírico

HPr: Ácido Propiônico

HVa: Ácido Valérico

HSu: Ácido Succínico

RALF: Reator Anaeróbico de Leito Fluidizado

SST: Sólidos Suspensos Totais

SSV: Sólidos Suspensos Voláteis

TDH: Tempo de Detenção Hidráulica

UASB: Reator Anaeróbico de Fluxo Ascendente e Manta de Lodo

## SUMÁRIO

RESUMO .....	6
ABSTRACT .....	7
1. INTRODUÇÃO .....	13
2. OBJETIVOS.....	16
2.1. Objetivo Geral.....	16
2.2. Objetivos Específicos .....	16
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
3.1 Biodiesel .....	17
3.2 Glicerol .....	22
3.2.1 Fermentação do glicerol: Rotas metabólicas.....	25
3.2.2 Fatores que influenciam a fermentação do glicerol .....	30
3.2.3 Rendimentos de ácido propiônico, 1,3-propanodiol e outros metabólitos a partir do glicerol.....	35
3.3 Ácido propiônico: produção e aplicações .....	38
3.4 1,3-Propanodiol: produção e aplicações .....	40
3.5 Hidrogênio: produção e aplicações.....	45
3.6 Biorreatores utilizados para a produção de ácido propiônico, 1,3-propanodiol e hidrogênio e outros metabólitos a partir de glicerol .....	48
3.6.1 Reator Contínuo de Tanque Agitado (CSTR).....	49
3.6.2 Reator anaeróbio de fluxo ascendente com manta de lodo (UASB).....	49
3.6.3 Reator granular de leito expandido (EGSB) .....	50
3.6.4 Reator Anaeróbio de Leito fixo.....	51
3.7 Reator anaeróbio de leito fluidizado (RALF) .....	55
3.8 Considerações Finais .....	58
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	59
4.1 Reator anaeróbio de leito fluidizado (RALF) .....	60
4.2 Material suporte .....	61
4.3 Condições hidrodinâmicas .....	62
4.4 Água residuária sintética.....	63
4.5 Inóculo .....	64
4.6 Procedimento de partida do reator .....	64

4.7 Métodos analíticos .....	65
4.7.1 Composição e produção volumétrica do biogás.....	65
4.7.2 Determinação da concentração do glicerol .....	65
4.7.3 Demais análises físico-químicas .....	66
4.7.4 Determinação de Ácido propiônico, 1,3-propanodiol, etanol e ácidos orgânicos voláteis.....	66
4.7.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	66
4.8 Frequências de Análises.....	67
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	68
5.1 Conversão de glicerol .....	68
5.2 Redução de DQO .....	72
5.3 Variação do pH.....	75
5.4. Produção de ácido propiônico, 1,3-propanodiol, hidrogênio e outros metabólitos .....	78
5.4.1 Conteúdo de hidrogênio no biogás produzido e produção volumétrica de hidrogênio.....	85
5.4.2 Rendimento de ácido propiônico e 1,3-propanodiol .....	90
5.4.3 Produção volumétrica de ácido propiônico e 1,3-propanodiol .....	97
5.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	100
5.6 Balanço de DQO .....	102
6. CONCLUSÕES.....	103
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	104

## 1. INTRODUÇÃO

Visando um futuro sustentável energeticamente, a procura por fontes de energia renováveis tem sido intensificada devido ao gradativo esgotamento das fontes energéticas tradicionais provenientes de combustíveis fósseis. Nesse contexto, biocombustíveis como o biodiesel, tem ganhado destaque no mercado mundial de combustíveis limpos visto que este representa uma alternativa renovável e não agressiva ao meio ambiente.

Atualmente, a produção de biodiesel encontra-se em crescimento acelerado no país, pois o governo brasileiro estabeleceu a obrigatoriedade da adição de biodiesel ao combustível de petróleo mediante a lei 11097/2005. A Agência Nacional do Petróleo (ANP) estima que a atual produção de biodiesel seja da ordem de 176 milhões de litros anuais. Diante disto, o destino dos resíduos gerados no processo produtivo do biodiesel merece atenção, pois a larga produção pode ocasionar problemas ambientais devido ao acúmulo de resíduos no meio ambiente.

O principal resíduo obtido na produção de biodiesel é o glicerol bruto. Para cada tonelada de biodiesel formado, são gerados 100 kg de glicerol. Este composto, resultante da reação de transesterificação, apresenta impurezas como sais, ésteres, álcool e óleo residual, o que lhe conferem um baixo valor agregado. A purificação do glicerol seria uma alternativa atrativa, pois este em sua forma pura apresenta variadas aplicações na produção de cosméticos, detergentes, fármacos, dentre outros. Entretanto, tais tratamentos de purificação acabam sendo inviáveis devido ao elevado custo desses tipos de processos (Rivaldi et al., 2008).

Uma alternativa bastante promissora para a utilização do glicerol bruto é o reaproveitamento direto deste resíduo, sem tratamento, como fonte de carbono em processos fermentativos para a obtenção de produtos de interesse. Dessa maneira, é possível combinar tratamento de resíduos, geração de produtos, além de tornar a produção de biodiesel mais competitiva.

Produtos que podem ser obtidos a partir da fermentação do glicerol e que possuem variadas aplicações são: ácido propiônico, 1,3-propanodiol e hidrogênio. O ácido propiônico e os seus sais de cálcio, sódio e potássio são comumente utilizados como conservantes de alimentos para humanos e para ração de animais, além de ser um



importante intermediário químico na síntese de fibras de celulose, herbicidas, perfumes e produtos farmacêuticos (Harada, 2012). O 1,3-propanodiol possui uma infinidade de aplicações podendo ser utilizado em produção de laminados, solventes, molduras, adesivos, resinas, detergentes, cosméticos, desodorantes, entre outros (Kaur et al., 2012). O H<sub>2</sub> pode ser utilizado em célula a combustível, visto que este é capaz de gerar eletricidade com alta eficiência energética e com diversas aplicações para a sociedade em geral. De acordo com Nath e Das (2005) a utilização do hidrogênio é distribuída em: 50% na produção de amônia; 37% em refinarias de óleo para remover impurezas ou para o aprimoramento do óleo pesado em frações mais leves de produtos de maior valor; 8% na produção de metanol e 4% numa larga variedade de processos químicos, metalurgia e outros. Apenas 1% da produção de hidrogênio é usada para programas espaciais.

A fermentação do glicerol bruto pode ser realizada através do metabolismo de diferentes microrganismos, podendo ocorrer por meio de duas vias metabólicas competitivas: a via redutiva e a via oxidativa. Na via redutiva, obtêm-se o 1,3-propanodiol como produto final. Na via oxidativa ocorre à formação de produtos como propionato, hidrogênio, lactato, acetato, butanol, Butirato e etanol (Da Silva et al., 2009).

O ácido propiônico pode ser produzido a partir de diferentes fontes de carbono, como o glicerol. Muitos microrganismos são capazes de produzi-lo, porém *Propionibacteria* sp tem sido os mais estudados. Esses microrganismos podem metabolizar variadas fontes de carbono em propionato através da via do ácido dicarboxílico, que possui succinato como intermediário (Dishida et al. 2015). Semelhantemente ao ácido propiônico, o hidrogênio pode ser obtido através da fermentação de diferentes fontes de carbono, dentre elas o glicerol. Microrganismos do gênero *Clostridium* sp têm sido dominantes para a produção de hidrogênio por processos fermentativos anaeróbios.

Diferentemente do ácido propiônico e do hidrogênio, o 1,3-propanodiol é um produto típico da fermentação do glicerol e não tem sido obtido em qualquer outro processo de conversão anaeróbia utilizando diferentes substratos orgânicos. Cepas de bactérias como *Enterobacter agglomerans*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pantoea agglomerans* e *Clostridium butyricum* (Suratago e Nootong., 2012) foram identificadas como produtoras de 1,3-propanodiol. Os microrganismos

mais estudados tem sido a *Klebsiella pneumoniae* e *Clostridium butyricum* (Zeng, 1996).

Diversas pesquisas têm sido realizadas com o intuito de obter produtos da fermentação do glicerol em processos em batelada e em processos contínuos. Pesquisadores como Chookaew et al. (2012), Liu et al. (2013) e Boenigk et al. (1993), realizaram experimentos em reatores em batelada enquanto que Ito et al. (2005) e Gonen et al. (2013) utilizaram reatores de leito fixo. Reatores de mistura perfeita (CSTR) e de Manta de Lodo (UASB) também têm sido adotados em pesquisas encontradas na literatura como se pode verificar nos trabalhos de Lo et al. (2013) e Reungsang et al. (2013a), respectivamente.

Uma configuração de reator que vem ganhando destaque em processos fermentativos é o reator anaeróbio de leito fluidizado (RALF). De acordo com Shida (2008), essa configuração tem sido extensivamente estudada no campo do tratamento de águas residuárias por muitos anos devido a sua capacidade em oferecer vantagens de acumulação de grande quantidade de biomassa sobre o meio suporte, possibilidade para altas taxas de carregamento orgânico, baixos TDH e boas características de mistura, mostrando assim a eficiência do RALF para produzir ácido propiônico, 1,3-propanodiol, e H<sub>2</sub>. Trabalhos como os de Wu et al. (2003), Shida (2008), Barros et al. (2010), dentre outros, comprovam a viabilidade tecnológica do reator anaeróbio de leito fluidizado em processos fermentativos.

Com o intuito de contribuir para o desenvolvimento de pesquisas relacionadas com a produção de ácido propiônico, 1,3-propanodiol, hidrogênio e outros metabólitos a partir de resíduos da produção de biodiesel, o presente trabalho visou caracterizar um sistema biológico em reator de leito fluidizado que permitiu avaliar o potencial do resíduo na geração destes compostos. O rendimento da produção dos metabólitos foi analisado com variação do TDH entre 8 h e 0,5 h, em condições mesofílicas (30 °C) com pH em torno de 4,5. O reator foi alimentado com meio contendo glicerol na concentração de 5 g L<sup>-1</sup> e solução de nutrientes. O pneu triturado foi utilizado como material suporte para imobilização da biomassa, no qual também foi avaliada a influência desse tipo de meio suporte no processo fermentativo.

## **2. OBJETIVOS**

### 2.1. Objetivo Geral

O principal objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de ácido propiônico, 1,3-propanodiol e hidrogênio a partir da fermentação de glicerol bruto em reator anaeróbio de leito fluidizado. O reator foi operado em condições mesofílicas (30 °C) e preenchido com pneu triturado, atuando como material suporte para a adesão microbiana. O inóculo utilizado foi proveniente de lodo granular de reator anaeróbio de fluxo ascendente com manta de lodo (UASB), utilizado para o tratamento de efluentes de abatedouro de aves.

### 2.2. Objetivos Específicos

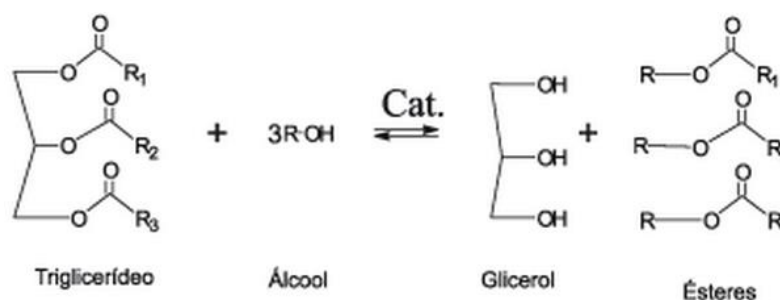
- Identificar o melhor tempo de detenção hidráulica (TDH) para a produção de ácido propiônico, 1,3-propanodiol e H<sub>2</sub>.
- Quantificar os principais metabólitos produzidos em função do TDH.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Biodiesel

Considerado um substituto natural e renovável do diesel de petróleo, o biodiesel é um combustível composto de mono-alkilésteres de ácidos graxos de cadeia longa obtido a partir da reação de transesterificação de triglicerídeos, mostrada na Figura 3.1 (Ferrari et al., 2005). O processo global de transesterificação é composto de três reações reversíveis e consecutivas em que os diglicerídeos e os monoglicerídeos são os intermediários. Nesta reação, são necessários três moles de álcool para um mol de triglicerídeo. Entretanto, visando aumentar o rendimento em ésteres e permitir a separação do glicerol formado, é sempre utilizado um excesso de álcool, ocasionando o deslocamento da reação para o lado dos produtos (Rodriguez, 2010).

Figura 3-1: Reação de transesterificação de triglicerídeos com álcool



Fonte: Rodriguez, 2010.

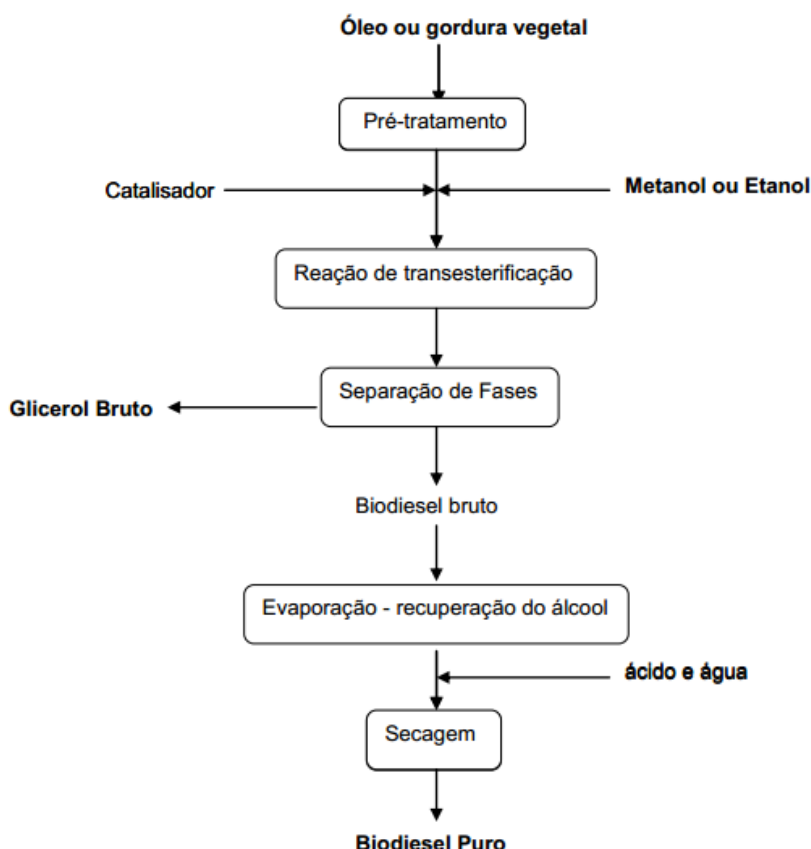
A reação de transesterificação ocorre sob a atuação de um catalisador básico, ou mesmo ácido, na presença de metanol ou etanol. Nesta reação são formadas três moléculas de ésteres metálicos ou etílicos dos ácidos graxos e uma molécula de glicerol (Sakai et al., 2007). A transesterificação etanólica é a mais utilizada no Brasil e, em geral, os catalisadores alcalinos são mais comumente utilizados, dentre eles estão o hidróxido de sódio e hidróxido de potássio (Gonçalves et al., 2009).

A transesterificação alcalina utiliza catalisadores como NaOH, KOH, carbonatos, metóxido ou etóxido de sódio. O processo ocorre em batelada na temperatura de 60 - 70°C e pressão atmosférica contendo um excesso de álcool. No

final da reação, a massa reacional é composta de duas fases, sendo a pesada constituída de glicerol e a fase leve constituída por biodiesel. A separação de fases ocorre através de decantação e/ou centrifugação (Rodriguez, 2010).

O excedente de álcool é retirado do biodiesel bruto por evaporação e, em seguida, o biodiesel é lavado com água, centrifugado e desumificado (Kim et al., 2004). O processo geral é mostrado na Figura 3.2:

Figura 3-2: Esquemática do processo básico de produção de biodiesel



Fonte: Rodriguez (2010).

Entre as principais fontes de triglicerídeos para produção do biodiesel estão os óleos vegetais, as gorduras animais e óleos residuais como os oriundos da fritura de alimentos. Naturalmente, os triglicerídeos estão entre os principais componentes destes, juntamente a outros componentes minoritários como ácidos graxos livres, água, esteróis, fosfolipídios e outras impurezas como produtos de reações hidrolíticas e oxidativas que, por vezes, estão presentes nos óleos utilizados para cozimento de alimentos (Ramos et al., 2000).

O biodiesel é praticamente livre de enxofre e aromáticos, possuindo um alto número de cetanos e um teor médio de oxigênio (em torno de 11%). Possui também maior viscosidade e maior ponto de fulgor quando comparado com o diesel convencional (Ramos, 1999). As características físico-químicas do biodiesel são apresentadas na Tabela 3.1.

Tabela 3-1: Características físico-químicas do biodiesel (ésteres etílicos) de várias espécies vegetais e do óleo diesel convencional (tipo C).

Características	Origem do biodiesel					Óleo Diesel <sup>a</sup>
	mamona	babaçu	dendê	algodão	piqui	
Poder calorífico (kcal/kg)	9046	9440	9530	9520	9590	10824
Ponto de névoa (°C)	-6	-6	6	ND	8	1
Índice de cetano	ND	65	ND	57,5	60	45,8
Densidade a 20°C (g/cm <sup>3</sup> )	0,9190	0,8865	0,8597	0,8750	0,8650	0,8497
Viscosidade a 37,8° (cSt)	21,6	3,9	6,4	6,0	5,2	3,04
Inflamabilidade (°C)	208	ND	ND	184	186	55
Ponto de fluidez (°C)	-30	ND	ND	-3	5	ND
Destilação a 50% (°C)	301	291	333	340	334	278
Destilação a 90% (°C)	318	333	338	342	346	373
Corrosividade ao cobre	0	0	0	0	0	£2
Teor de cinzas (%)	0,01	0,03	0,01	0,01	0,01	0,014
Teor de enxofre (%)	0	ND	ND	0	0	0,24
Cor (ASTM)	1,0	0	0,5	1,0	1,0	2,0

<sup>a</sup>Diesel do tipo C, propriedades determinadas no Instituto de Tecnologia do Paraná (Tecpar, Curitiba, PR); ND = não determinado

Fonte: Ramos et al., 2000.

Nas regiões brasileiras existem diversas espécies vegetais que podem ser utilizadas para produzir biodiesel das quais destacamos a mamona, dendê, girassol, babaçu, amendoim, pinhão manso e soja. Atualmente 75% da produção brasileira é obtida a partir do óleo de soja, 20% com gordura animal e o restante com diversas outras fontes, como as citadas anteriormente (ANP, 2012). A Figura 3.3 mostra a potencialidade brasileira para produção e consumo de combustíveis vegetais.

Figura 3-3: Potencialidade brasileira para produção e consumo de combustíveis vegetais



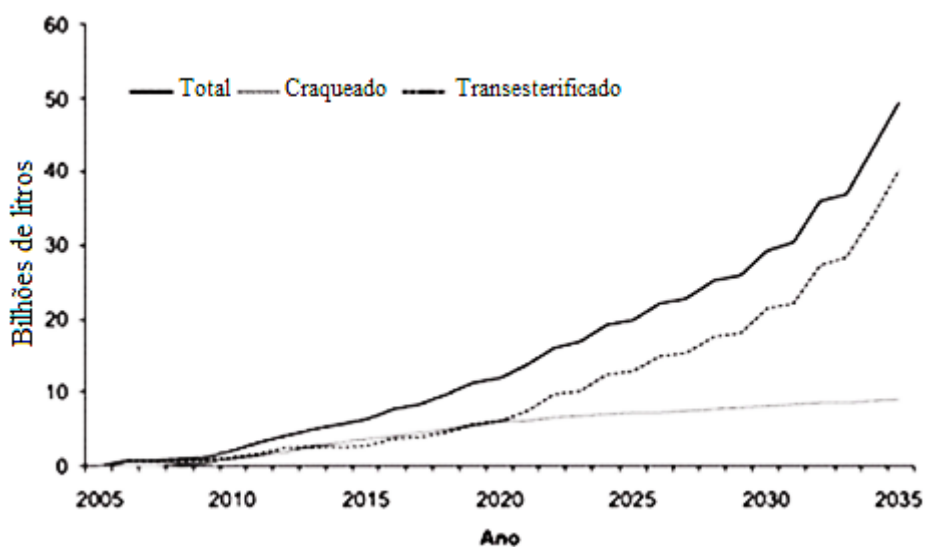
Fonte: biodieselbr (2009).

O óleo diesel comercializado em todo o Brasil possuía 5% de biodiesel desde 1º de janeiro de 2010. Esta regra foi estabelecida pela Resolução nº 6/2009 do Conselho Nacional de Política Energética (CNPE), publicada no Diário Oficial da União (DOU) em 26 de outubro de 2009, que aumentou de 4% para 5% o percentual obrigatório de mistura de biodiesel ao óleo diesel. Desde novembro de 2014, o percentual passou a ser 7% (ANP, 2014).

A ANP estima que a produção brasileira de biodiesel seja da ordem de 176 milhões de litros anuais. Em julho de 2014, a indústria brasileira de biodiesel computou a maior produção mensal de sua história. De acordo com os dados da ANP, as usinas

fabricaram 19,7 % mais biodiesel que em junho. O Brasil poderá produzir, para consumo interno (Figura 3.4), um volume aproximado de 50 GL no qual 80% dessa produção será feita via transesterificação e o restante por craqueamento. A produção por transesterificação atenderá o grande mercado atacadista, direcionado à mistura com petrodiesel, o abastecimento de frotistas ou de consumidores interessados em aumentar a proporção de biodiesel no petrodiesel.

Figura 3-4: Estimativa da produção de biodiesel para consumo interno

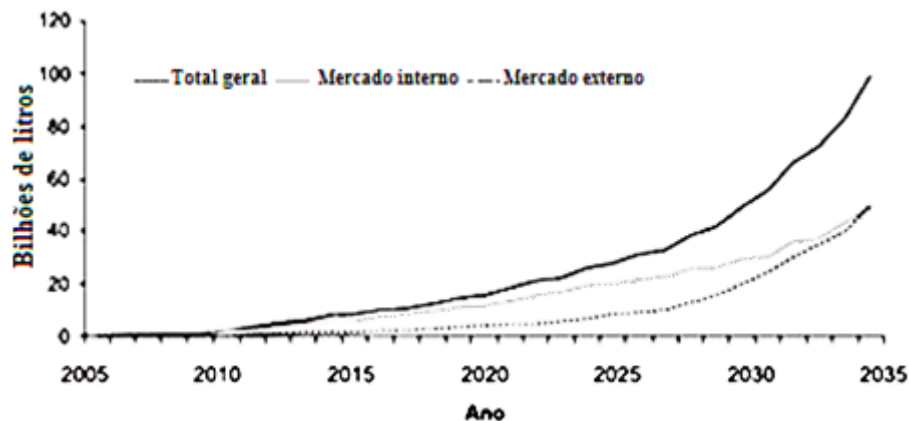


Fonte: biodieselbr (2009).

Estima-se que a produção de biodiesel para os mercados externos e internos, no final do período, será equivalente (Figura 3.5). Entretanto, nos primeiros 10 anos, o mercado interno absorverá a totalidade da produção. No conjunto do mercado interno e externo, a rota de transesterificação etanólica responderá por 90% do total do biodiesel produzido. Nesse cenário, no final do período, haverá uma demanda de 6 GL de etanol e uma produção 4Mt de glicerol, evidenciando o potencial de integração de cadeias com a produção de biodiesel.



Figura 3-5: Estimativa de produção total de biodiesel



Fonte: biodieselbr (2009).

### 3.2 Glicerol

As características físicas, químicas e nutricionais do glicerol bruto dependem do tipo de ácido graxo (gordura animal ou óleo vegetal) e do tipo de catálise empregada na produção de biodiesel (Yazdani e Gonzalez, 2007).

Diante do excesso de glicerol produzido é importante buscar medidas que evitem o acúmulo de glicerol, como a purificação ou reaproveitamento do mesmo em novos processos industriais, permitindo assim a redução dos custos e tornando a produção de biodiesel mais competitiva e ambientalmente viável.

O glicerol é considerado uma fonte de carbono altamente assimilável por bactérias e leveduras sob condições aeróbias e anaeróbias para a obtenção de energia metabólica, como regulador do potencial redox e para a reciclagem de fosfato inorgânico dentro da célula (Dillis et al., 1980).

Impurezas presentes no glicerol proveniente da produção de biodiesel (em torno de 20 %) encarecem processos produtivos que o utilizam como matéria-prima. Dentre as impurezas presentes, destacam-se ácidos graxos, metanol, catalisadores, sais de potássio e sódio, metais pesados, sabão, lignina e outras impurezas orgânicas. Os ácidos graxos de cadeia longa, cloretos, sulfatos e sulfetos afetam significativamente o metabolismo microbiano já que são considerados compostos tóxicos ou recalcitrantes (Viana, 2011). Por outro lado, o glicerol contém elementos nutricionais como fósforo,

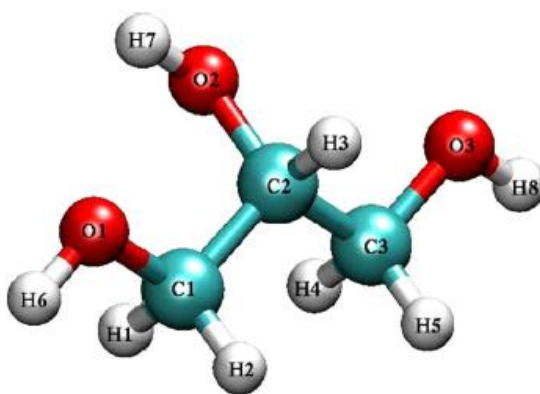
magnésio, cálcio, enxofre, nitrogênio e sódio que podem ser utilizados pelos microrganismos para o seu crescimento durante processos fermentativos (Rossi, 2012).

A presença de três grupos hidroxila na estrutura do glicerol é responsável pela solubilidade em água e sua natureza higroscópica. Estudos teóricos indicam que as contribuições entálpicas e entrópicas para a energia livre de Gibbs são importantes para uma determinação precisa das preferências conformacionais e energéticas do glicerol. Nesses estudos, as preferências conformacionais foram determinadas a partir de métodos de teoria de densidade funcional (DFT), existindo 126 possíveis confômeros para o glicerol. Na fase aquosa, a molécula de glicerol é estabilizada por uma combinação de ligações de hidrogênio intramoleculares e solvatação intermolecular das hidroxilas (Beatriz et al., 2011).

Em baixas temperaturas a glicerina tende a passar por um sub-resfriamento ao invés de cristalizar. Devido à resistência ao congelamento, soluções aquosas de glicerina são utilizadas como anticongelantes em sistemas de refrigeração. O glicerol tem baixa volatilidade e baixa pressão de vapor, o que é estritamente ligada à sua propriedade higroscópica.

A Figura 3.6 mostra a estrutura molecular do glicerol, seguida da Tabela 3.2, que mostra as propriedades físico-químicas do glicerol.

Figura 3-6: Estrutura molecular do glicerol



Fonte: Arruda et al. (2007).

Tabela 3-2: **Propriedades físico-químicas do glicerol**

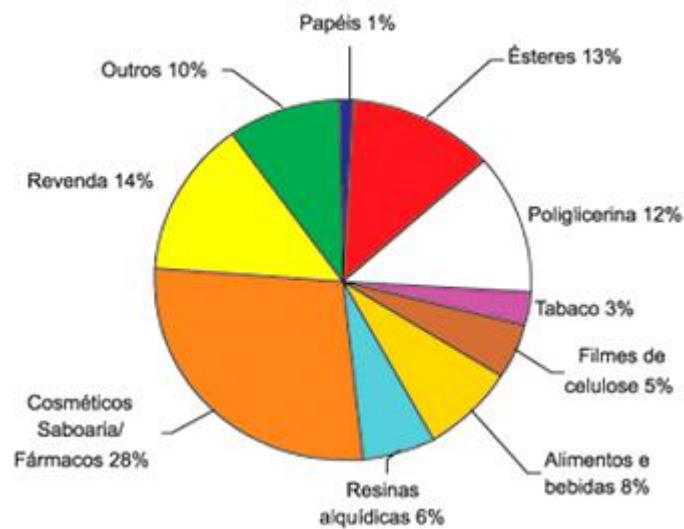
<b>Propriedades físico-químicas</b>	
Peso molecular (g/mol)	92,09
Densidade (glicerol 100%) 25°C	1,262 Kg/mG
Viscosidade 20 °C	939 cps
Ponto de ebulição (101,3 KPa)	290°C
Ponto de fusão	18°C
Ponto de inflamação	177°C
Tensão superficial 20°C	63,4 mN/m
Calor específico (glicerol 99,94%) 26°C	2,435 J/g
Calor de evaporação 55°C	88,12 J/mol

Fonte: Arruda et al. (2007).

No ano de 2010, 250.000 toneladas de glicerol foram geradas pelas usinas brasileiras de biodiesel (Scaramuzzo, 2011). Em 2013, a produção de glicerina brasileira bateu um novo recorde. Segundo o Anuário Estatístico de 2014 elaborado pela ANP a partir dos dados de mercado do ano passado, a produção de glicerina coproduto do biodiesel foi 5,67 % maior que no ano anterior. Essa é a maior produção do principal coproduto do biodiesel já registrada desde que a agência começou a fazer o monitoramento, em 2005.

O glicerol puro possui diversas aplicações industriais principalmente nos setores de cosméticos, higiene pessoal, alimentos, medicamentos e fumo. Em termos de transformação química ela ainda apresenta aplicações limitadas, sendo as principais na produção de explosivos, como a nitroglicerina, e na formação de resinas alquídicas. A Figura 3.7 mostra uma distribuição de aplicações mais usuais da glicerina (Mota et al., 2009).

Figura 3-7: Principais setores industriais de aplicação da glicerina



Fonte: Mota et al. (2009).

### 3.2.1 Fermentação do glicerol: Rotas metabólicas

A fermentação do glicerol bruto proveniente de resíduos da produção de biodiesel tem sido realizada através do metabolismo de diferentes microrganismos. Pesquisas como as de Reungsang et al. (2013a), Zheng et al. (2008) e Gungormusler et al. (2010), foram realizadas utilizando cultura pura de microrganismos. Já Selembo et al. (2009) e Dietz et al. (2014), desenvolveram trabalhos utilizando culturas mistas de microrganismos com o intuito de produzir 1,3 – propanodiol, H<sub>2</sub> e outros metabólitos.

Devido ao fato de que o glicerol é deficiente em nitrogênio, a adição de elementos traços e vitaminas são essenciais para atingir um ótimo crescimento de bactérias com elevados valores de produção de metabólitos (Suratago e Nootong, 2012).

Na literatura diferentes microrganismos são empregados na fermentação do glicerol como a *Klebsiella oxytoca* e *Citrobacter freundii* (Homann, 1990), *Klebsiella pneumoniae* (Oh et al., 2008; Cheng et al., 2007), *Escherichia coli* (Thong, 1991), *Citrobacter amalonaticus* (Ainala, 2013), *Clostridium beijerinckii* (Gonen et al., 2013), *Clostridium butyricum* (Suratago e Nootong (2012)), *Enterobacter aerogenes* (Reungsang et al., (2013b); Ito et al., (2005)).

Outro aspecto relevante observado na literatura é que microrganismos específicos favorecem a formação de determinados produtos durante a fermentação do glicerol. De acordo com Barbirato et al. (1998) e Da Silva et al. (2009), *C. pasteurianum* é responsável pela produção 1,3 – propanodiol, ácido acético, ácido láctico, ácido fórmico, ácido succínico e etanol. Para Cheng et al. (2007) e Oh et al. (2013), *Klebsiella pneumoniae* favorece a formação de 1,3 – propanodiol, etanol, lactato, 2,3-butanodiol, acetato, succinato.

Segundo Kaur et al. (2012) ácido butírico e o ácido acético são os principais subprodutos obtidos através da *C. butyricum* enquanto que butanol é produzido por *C. pasteurianum*. Além destes, o etanol, ácido láctico, ácido succínico, 2,3-butanodiol, constituem os principais metabólitos produzidos por enterobactérias (Zeng et al., 2002).

O glicerol pode ser degradado por duas vias metabólicas competitivas: a via oxidativa e a via redutiva. A via oxidativa é catalisada por duas enzimas, a glicerol desidrogenase e a di-hidroxiacetona cinase. A primeira delas converte o glicerol em di-hidroxiacetona e a segunda fosforila o glicerol a di-hidroxiacetona-fosfato. O di-hidroxiacetona formado é canalizado para a via glicolítica, gerando ATP e equivalentes redutores (NADH). A via redutiva e a oxidativa se complementam em termos de geração e balanço de aceptores de elétrons, neste caso  $\text{NAD}^+$  (Biebl, 1999).

O piruvato, que é o principal produto da via oxidativa, pode ser utilizado por diversos microrganismos podendo ser responsável pela formação de metabólitos como  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$ , acetato, butirato, propionato, etanol, butanol, lactato e succinato. Nas enterobactérias, o piruvato é clivado a acetil-CoA e formato numa reação catalisada pela enzima piruvato-formiato liase. A partir do acetil-CoA, ácido acético é formado via acetil-fosfato, produzindo extra ATP bem como etanol, envolvendo duas etapas NADH - oxidante tendo acetaldeído como intermediário. Formato é usualmente clivado a hidrogênio e dióxido de carbono através da enzima formiato liase. Análises da fermentação de produtos mostram que parte do glicerol é convertida nos mesmos produtos da fermentação do açúcar. Essa conversão proporciona a energia necessária para o crescimento, mas para muitos outros produtos, equivalentes redutores são lançados, sendo estes oxidados na conversão via redutiva do glicerol, levando a formação de 1,3-propanodiol (Biebl, 1999).

Nas linhagens de *C. butyricum*, ácido acético e butírico são formados além de 1,3-propanodiol. Ácido butírico é formado após condensação de duas moléculas de acetil-CoA em uma reação em cadeia que envolve duas etapas de oxidação-NADH,

gerando ATP. Pequenas quantidades de etanol também são encontradas (Biebl, 1999). Na via redutora, a enzima glicerol desidratase retira uma molécula de água do glicerol, convertendo-o em 3-hidroxiacetaldeído. A enzima 1,3-propanodiol oxirredutase reduz o 3-hidroxiacetaldeído a 1,3 – propanodiol, regenerando os NADH gerados na via oxidativa (Da Silva et al., 2009). As vias metabólicas podem ser observadas na Figura 3.8.

Da Silva et al. (2009) afirmam que a preferência por determinada via metabólica depende da fonte do nutriente limitante. Em caso de a fonte de carbono ser o fator limitante, a via utilizada será aquela que rende o máximo de energia, ou seja, a via de formação do ácido butírico utilizando *C. butyricum*, e a via de formação do etanol utilizando *K. pneumoniae*, ao invés da via de formação de 1,3-propanodiol e ácido acético. Em processos no qual a fonte de carbono está em excesso e existe a limitação de um nutriente inorgânico ou inibição por produto, ocorrerá à formação de 1,3-propanodiol e ácido acético, já que estes causariam menor inibição (Biebl, 2001). Da Silva et al. (2014) afirmam que elevadas concentrações de glicerol favorecem a via redutiva de fermentação do glicerol enquanto que baixas concentrações direcionam a rota para a formação de produtos da via oxidativa.

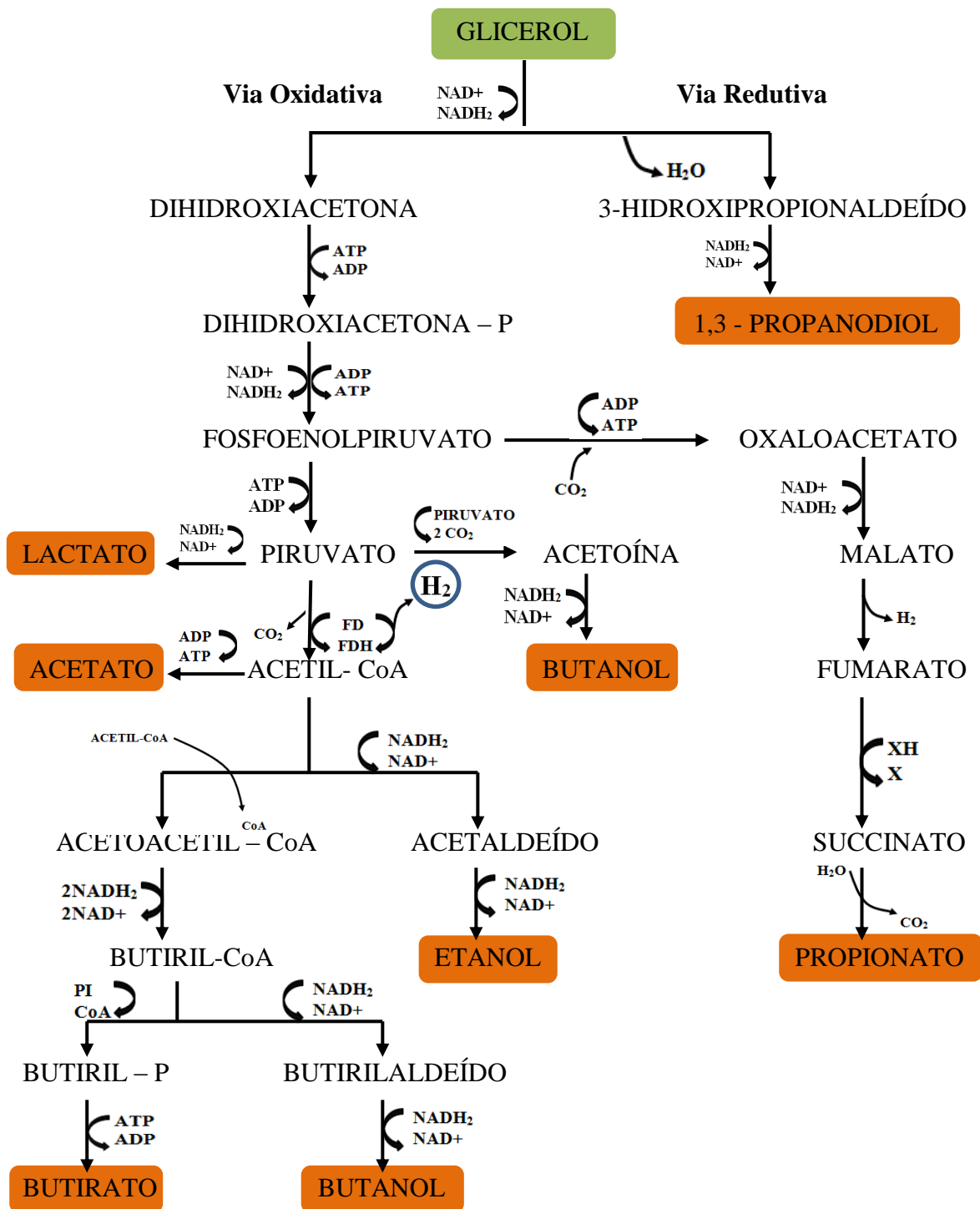
Segundo Biebl et al. (1999), o pH é um dos parâmetros que determina a formação dos produtos na fermentação. A formação de 2,3-butanodiol se inicia com pH de 6.6 e atinge o rendimento máximo com pH 5.5. Quando acetato é o principal subproduto, o rendimento de 1,3-propanodiol é maior pelo fato da conversão de piruvato a acetato produzir ATP, mas não consumir equivalentes redutores (NADH) necessários para a produção de 1,3-propanodiol. Diversos trabalhos encontrados na literatura no qual ocorre a fermentação do glicerol têm indicado que maiores rendimentos de 1,3-propanodiol são alcançados ao adotar valores de pH entre 6 e 7. Vlassis et al. (2012) avaliaram a produção de H<sub>2</sub> a partir de glicerol bruto utilizando cultura mista de microrganismos em condições mesofílicas. Os autores estudaram o efeito do pH (entre 4.5 e 8) no processo e constataram que o rendimento de H<sub>2</sub> foi maior em pH ácidos do que em pH alcalinos. Dessa forma, pode-se sugerir que pH ácidos favorecem a via oxidativa enquanto que valores de pH próximo a alcalinidade, ocorre o direcionamento da rota para a via redutiva

Outro aspecto que pode favorecer diferentes rotas de fermentação do glicerol é a adição de vitamina B12 no meio de cultivo. Zhang et al. (2007), Kivisto et al. (2011) e Pflugl et al.(2013) operaram reatores em batelada com temperatura de 40, 37 e 30 °C e

pH de 8, 7.4 e 5.7, respectivamente. Os autores observaram que o nível de produção de 1,3-propanodiol aumentou com a adição da vitamina B12, sendo assim, pode-se concluir que a adição de vitamina B12 ao meio reacional favorece a via reductiva de degradação do glicerol, pois esta é necessária para o adequado funcionamento da enzima glicerol desidratase, incluída na primeira etapa de produção do 1,3-propanodiol.

Observa-se na literatura que a maioria das pesquisas realizadas para a produção de 1,3-propanodiol ocorreu em condições mesofílicas (Bósio, 2014; Oh et al., 2008; Sattayasamitsathit et al., 2011; Drozdzyńska et al., 2014). Entretanto, Ferreira (2014) operando um RALF termofílico (55 °C) obteve percentual molar de 1,3-propanodiol considerável, entre 30 e 50%.

Figura 3-8: Produtos finais a partir da fermentação do glicerol por diferentes microrganismos



Fonte: Adaptado de Da Silva et al. (2009).



### 3.2.2 Fatores que influenciam a fermentação do glicerol

Parâmetros de grande impacto na produção de metabólitos constatados na literatura são: temperatura, pH, concentração de substrato e nutrientes. Dentro de uma faixa inapropriada, uma variação de tais parâmetros podem afetar o crescimento e a atividade dos microrganismos (Suratago e Nootong, 2012).

#### 3.3.2.1 pH e temperatura

O pH é um importante parâmetro no processo fermentativo que pode ser usado para controlar o metabolismo e selecionar os microrganismos que possuem maior capacidade de sobrevivência. O pH afeta severamente parâmetros microbianos como taxa de crescimento, utilização da fonte de carbono, eficiência de conversão de substrato, etc (Temudo et al., 2008).

Biebl (2001) estudou a fermentação do glicerol através da *Clostridium pasteurianum* com o intuito de verificar a influência das condições de cultura na formação de produtos. Operando em batelada a 35 °C e com concentração de glicerol de 50 g L<sup>-1</sup>, o autor constatou que o butanol foi o produto principal no processo, acompanhado da formação de 1,3-propanodiol, ácidos butírico e acético, e etanol. Fermentações com valores de pH constantes entre 4,5 e 7,5, não apresentaram diferenças significantes na formação de produtos, exceto num aumento do conteúdo de etanol no pH 6,5, podendo ser observado na Tabela 3.3.

Tabela 3-3: **Influência do pH no tempo de fermentação a na formação de produtos**

pH	Tempo de fermentação (h)	Rendimento (mol/ 100 mol glicerol)				
		Butanol	1,3-PD	Etanol	Butirato	Acetato
4,5	<50	38,8	9,1	2,4	0,2	2,3
5,0	22	23,1	10,8	1,3	7,2	2,2
5,5	24	17,7	22,5	1,3	10,6	3,9
6,0	21	32,4	5,1	4,5	2,9	1,3
6,5	20	23,5	19,1	7,2	1,1	2,4
7,0	21	20,0	20,9	13,9	0,1	4,1
7,5	20	22,2	5,8	26,5	0,2	0,2

Fonte: Biebl (2001).

Barbirato et al. (2007) pesquisaram a produção de ácido propiônico utilizando cultura pura de microrganismo e glicerol bruto (20 g L<sup>-1</sup>) em batelada. As condições de pH e temperatura adotadas foram de, respectivamente, 6.8 e 30 °C. Nestas condições, os autores comprovaram que o glicerol se apresentou como fonte de substrato promissora para a produção de ácido propiônico em termos de rendimento (0.844 mol/mol) e produtividade (0.18 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>).

Coral et al. (2008) avaliaram a produção de ácido propiônico utilizando diferentes fontes de carbono, sendo o glicerol (20 g L<sup>-1</sup>) uma delas. O experimento ocorreu em batelada com temperatura de 30 °C, pH inicial de 6.9, com cultura pura. Os pesquisadores constaram elevado rendimento de ácido propiônico (0.724 g/g) e estes afirmaram que *Propionibacterium* são bastante sensíveis ao pH e que normalmente necessitam de controle de pH, pois pequeno crescimento ocorre em pH abaixo de 5.0

A maior parte das pesquisas realizadas com o intuito de direcionar a rota metabólica para a via reductiva (produzir 1,3-propanodiol) de fermentação do glicerol tem mostrado que o pH ótimo para o processo é 7. Mesmo assim, é encontrado trabalhos em que o processo ocorreu com pH igual a 8, como é o caso de Gonen et al. (2012) que utilizaram *K. pneumoniae* em batelada alimentada.

Homann et al. (1990) pesquisaram a produção de 1,3-propanodiol em batelada mantendo o pH em 7 a 32 °C. *K. pneumoniae* DSM 2026 apresentou a maior concentração final (61 g L<sup>-1</sup>) e a melhor produtividade (1,7 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) enquanto que a *C.freundii* Zu e K2 atingiram 35 g L<sup>-1</sup> e 1,4 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, respectivamente.

Zhang et al. (2007) investigaram o efeito da temperatura e do pH em batelada na produção de 1,3-propanodiol, utilizando glicerol na concentração de 20 g L<sup>-1</sup>. Os autores constataram que o crescimento celular e a formação de 1,3-propanodiol aumentaram gradualmente quando a temperatura variou-se de 28 a 40 °C. Mas na temperatura de 45 °C ocorreu uma acentuada diminuição da formação de 1,3-propanodiol. Os autores averiguaram também que a formação de biomassa e 1,3-propanodiol foi fortemente influenciada pelo pH. Eles trabalharam com valores de pH entre 6,5 e 8,5 e notaram que valores mais baixos de pH inibiram o crescimento celular e a formação de 1,3-propanodiol, enquanto que os maiores valores de pH conduziram a formação de 1,3-propanodiol. A máxima concentração de 1,3-propanodiol encontrada foi obtida no processo com pH igual a 8.

Oh et al. (2008) otimizaram a produção de 1,3-propanodiol utilizando a metodologia Response Surface Methodology (RSM), que foi adotado para gerar um

modelo estatístico para os efeitos individuais e interativos do glicerol bruto, do  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , pH, tempo de cultivo e temperatura na produção de 1,3-propanodiol. Os autores verificaram que as condições ótimas de pH e temperatura para a produção de 1,3-propanodiol foram 7,3 e 36,8 °C, respectivamente.

Sattayasamitsathit et al. (2011) avaliaram o aumento da produção de 1,3-propanodiol a partir do glicerol bruto em batelada e batelada alimentada, tendo como estratégia o controle do pH. Os autores estudaram o efeito do pH (na faixa de 6,5-7,5) no crescimento celular e na produção de 1,3-propanodiol e ácidos orgânicos. O glicerol foi rapidamente consumido em todos os valores de pH adotados e foi completamente esgotado em torno de 14 - 16 h de fermentação. O rendimento ótimo de produção de 1,3-propanodiol obtido foi de 0,64 mol mol<sup>-1</sup>, sendo o pH do processo igual a sete. Os autores operaram com temperaturas de 31, 34, 37 e 40 °C. O crescimento celular na faixa de 31- 37°C não mostrou diferença significativa. Mas ao aumentar a temperatura de 37 °C para 40 °C ocorreu uma queda de 32- 40% no crescimento e na produção de 1,3-propanodiol. Na temperatura de 40 °C ocorreu uma inibição celular devido à inativação da atividade da enzima na glicólise e no ciclo de Krebs, conseqüentemente decrescendo o metabolismo do carbono.

Drozdzyńska et al. (2014), pesquisaram aproximadamente 4000 cepas da família *Enterobacteriaceae* capazes de produzir 1,3-propanodiol. O objetivo do estudo foi isolar bactérias produtoras de 1,3-propanodiol, identificar e caracterizar as que obtiveram melhores desempenhos. A conversão do glicerol em 1,3-propanodiol através da *Hafnia alvei* foi estudada pela primeira vez neste trabalho. A fermentação ocorreu no biorreator operado em 30 e 37 °C e pH no valor de 7. Os melhores resultados foram obtidos na temperatura de 30°C.

### 3.3.2.2 Concentração de substrato

A concentração de substrato utilizada no processo fermentativo possui papel importante na atividade dos microrganismos, já que determinados valores de concentrações de glicerol podem favorecer a via oxidativa ou redutiva de fermentação do glicerol.

Chookaew et al. (2012) pesquisaram a produção de H<sub>2</sub> em batelada a partir de glicerol bruto, utilizando *Klebsiella pneumoniae*. Durante 36 h de fermentação com pH

inicial de 8 e temperatura de 40 °C, os autores constataram que com o aumento da concentração de glicerol (20 até 100 g L<sup>-1</sup>), houve um aumento da concentração de ácido acético de 0.74 para 3.65 g L<sup>-1</sup>. Houve o aumento também da concentração de etanol (5.47 – 7.36 g L<sup>-1</sup>) e ácido succínico (0.94 – 2.09 g L<sup>-1</sup>). Mas, a concentração de 1,3-propanodiol e 2,3-butanodiol foram as maiores detectadas em função do aumento da concentração de glicerol. Para 1,3-propanodiol, a concentração variou entre 7.73 e 18.3 g L<sup>-1</sup> e a concentração de 2,3-butanodiol variou entre 2.70 e 13.3 g L<sup>-1</sup>.

Em processos fermentativos no qual a fonte de carbono encontra-se em excesso e existe limitação de um nutriente inorgânico ou inibição por um produto, os metabólitos formados serão aqueles que causam menor inibição, ou seja, 1,3-propanodiol e ácido acético em detrimento de ácido butírico ou etanol. As enterobactérias, por exemplo, sofrem inibição durante a fermentação do glicerol devido ao acúmulo de 3-hidroxi-propionaldeído, intermediário da via propanodiólica que é altamente tóxico (Da Silva et al., 2014).

Sattayasamitsathit et al. (2011), avaliaram a influência da concentração de glicerol na produção de 1,3-propanodiol em batelada com temperatura de 37 °C e pH mantido em 6,5. Os autores observaram que o maior crescimento celular obtido foi na concentração de 60 g L<sup>-1</sup> de glicerol. Eles observaram também que as maiores concentrações de 1,3-propanodiol obtidas foram na concentração de 60 e 80 g L<sup>-1</sup> de glicerol sendo que, as concentrações máximas de 1,3-propanodiol não foram significativamente diferentes (21, 50 e 21, 64 g L<sup>-1</sup> de 1,3-propanodiol para 60 e 80 g L<sup>-1</sup> de glicerol, respectivamente).

Suratago e Nootong (2012) avaliaram a fermentação do glicerol em um reator de mistura com pH 7 utilizando cultura pura de microrganismos (*C. butyricum*). A máxima concentração de 1,3-propanodiol alcançada foi de 33,8 g L<sup>-1</sup> com condições operacionais de 60 g L<sup>-1</sup> de concentração de glicerol. Mantendo alimentação do reator com concentrações de glicerol maiores que 60 g L<sup>-1</sup>, foi notada a diminuição da atividade microbiológica visto que a concentração e rendimentos de 1,3-propanodiol decresceram. Segundo os autores, essa observação é coerente com recomendações encontradas na literatura que afirmam que, para evitar a inibição dos microrganismos, concentrações de glicerol abaixo de 80 g L<sup>-1</sup> devem ser utilizadas.

### 3.3.2.3 Nutrientes

A composição do meio de cultura em processos fermentativos exerce grande influência na atividade dos microrganismos já que a adição ou remoção de nutrientes, bem como a variação da concentração destes, favorecem a formação de determinados produtos de acordo com a rota metabólica influenciada pelo nutriente específico. Esse fato pode ser comprovado na pesquisa realizada por Moon et al. (2011) que otimizaram um meio de cultura com o intuito de favorecer a produção de butanol e 1,3-propanodiol através da *Clostridium pasteurianum* utilizando glicerol bruto. Através de planejamento estatístico e ensaios experimentais, os pesquisadores constataram que a composição ótima do meio para a produção de 1,3-propanodiol e butanol foi diferente, provando que a formação dos produtos é controlada pelo meio de cultura.

Dabrock et al. (1992) estudaram a fermentação do glicerol em modo contínuo utilizando *C. pasteurianum* em condições limitantes de ferro e fosfato. O meio continha 4% (p/v) de glicerol, temperatura mantida em 37 °C e taxa de diluição de 0.05 h<sup>-1</sup>. O pH no meio com condições limitantes de fosfato foi mantido em 7 e o meio com condições limitantes de ferro foi mantido em 6.7. Os autores observaram primeiramente uma diminuição da formação de etanol de 30 mol/100 mol de glicerol (limitação de fosfato) para 4 mol/100 mol (limitação de ferro [10.8 µM]), enquanto que a produção de butanol aumentou de 18 para 30 mol/100 mol. Posteriormente, uma redução ainda maior da concentração de ferro de 10.8 para 6.8 e 2.5 µM favoreceu a formação de lactato (10 e 25 mol/100 mol, respectivamente) e de 1,3-propanodiol (17 e 34 mol/100 mol, respectivamente). Em geral, na cultura contínua com condições limitantes de fosfato, somente traços de acetato e butirato foram produzidos, enquanto que etanol (30 mol/100 mol), butanol (18 mol/100 mol) e 1,3-propanodiol (18 mol/100 mol) foram os produtos majoritários. Em condições limitantes de ferro, a relação desses produtos favoreceu a produção de 1,3-propanodiol (34 mol/100 mol). Além disso, lactato foi produzido em quantidades significantes (25 mol/100 mol).

Himmi et al. (1999) pesquisaram os nutrientes necessários para a conversão de glicerol (puro e bruto) em batelada utilizando cepa de *Clostridium butyricum*. Três meios foram adotados no experimento: o meio rico (RM), o meio com baixa concentração de nutrientes (LNM) e o meio LNM-YE, no qual ocorreu apenas à substituição da biotina por extrato de levedura no meio LNM. Os resultados mostraram que somente 4 µg L<sup>-1</sup> de biotina foi suficiente para converter 129 g L<sup>-1</sup> de glicerol bruto em uma grande

quantidade de 1,3-propanodiol, com concentração de  $67 \text{ g L}^{-1}$  ( $0,63 \text{ mol/mol}$ ). Também ficou provado no meio (LNM) proposto, que o nitrogênio constitui um fator limitante para a fermentação do glicerol, especialmente quando relação C/N foi menor que 81:1. Apesar de sua composição simples, o meio sintético LNM fornece o mesmo desempenho que o meio rico (RM), que é baseado em extrato de levedura. Adotando diferentes concentrações de glicerol para os meios RM ( $113 \text{ g L}^{-1}$ ) e LNM ( $121 \text{ g L}^{-1}$ ), as concentrações dos metabólitos obtidos foram aproximadas. Para o meio RM, as concentrações de 1,3-propanodiol, acetato, butirato e lactato foram de 61,5, 7,7, 7,4 e  $1,0 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente. Para o meio LNM, as concentrações de 1,3-propanodiol, acetato, butirato e lactato foram de 65,5, 11,5, 5,0 e  $0,3 \text{ g L}^{-1}$ .

Moon et al. (2011) investigaram as condições ótimas do meio de cultura para a produção de butanol e 1,3-propanodiol, como citado anteriormente, utilizando a cepa de *C. pasteurianum* DSM 525 em batelada.  $\text{FeSO}_3 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e extrato de levedura foram consideradas como variáveis significantes para a produção dos produtos desejados. A composição ótima do meio para a produção de 1,3-propanodiol foi de  $0 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{FeSO}_3 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ ,  $0 \text{ g L}^{-1}$  de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e  $8 \text{ g L}^{-1}$  de extrato de levedura.

Kivisto et al. (2011) estudaram o efeito da vitamina  $\text{B}_{12}$  na produção de hidrogênio e 1,3-propanodiol, em batelada, através da fermentação do glicerol pela *Halanaerobium saccharolyticum subsp. saccharolyticum*. Os autores constataram que a produção de 1,3-propanodiol é dependente da vitamina  $\text{B}_{12}$  enquanto que a produção de  $\text{H}_2$  é altamente favorecida quando a produção de 1,3-propanodiol é bloqueada pela falta de suplementação da vitamina  $\text{B}_{12}$ . Sem a presença de vitamina  $\text{B}_{12}$  no meio, o consumo de glicerol atingido foi de 18,7%, com rendimentos de  $2,16 \text{ mol H}_2/\text{mol}$  de glicerol,  $1,05 \text{ mol}$  de  $\text{CO}_2/\text{mol}$  de glicerol e ausência de 1,3-propanodiol. Entretanto, ao adicionar  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  de vitamina  $\text{B}_{12}$ , a produção de 1,3-propanodiol foi favorecida, alcançando rendimento de  $0,22 \text{ mol/mol}$ , tendo a produção de  $\text{H}_2$ ,  $\text{CO}_2$  e acetato reduzida, atingindo valores de 0,62, 0,58 e  $0,14 \text{ mol/mol}$ , respectivamente.

### 3.2.3 Rendimentos de ácido propiônico, 1,3-propanodiol e outros metabólitos a partir do glicerol

A partir das rotas metabólicas mostradas na Figura 3.8, diferentes produtos podem ser obtidos de acordo com a via metabólica favorecida e, em função de cada produto final, diferentes rendimentos de produtos são alcançados.

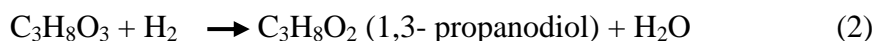
Segundo Wang e Yang (2013), a produção de ácido propiônico através da fermentação do glicerol, resulta em um rendimento de ácido propiônico de 1 mol HPr/mol de glicerol e nenhum ácido acético através da via glicolítica anaeróbia (Embeden-Meyrhof - EMP), sendo o rendimento teórico de ácido propiônico de 0,88 g HPr/g de glicerol. Entretanto, o rendimento real de ácido propiônico pode ser menor devido à fração de substrato utilizada para a biomassa celular ou maior se a rota pentose fosfato (hexose monophosphate – HMP) for utilizada na glicólise, sendo esta afetada pelas condições de crescimento. Nesta conversão, não ocorre produção de hidrogênio. A Equação 1, a seguir, mostra a formação de ácido propiônico a partir do glicerol.



No estudo realizado por Wang e Yang (2013), a produção de ácido propiônico a partir da co-fermentação de glicerol e glicose através de *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* foi avaliada. Bateladas com glicerol, glicose e mistura de glicerol e glicose, foram estudadas a 37 °C e pH inicial de 6.8. Como esperado, a fermentação do glicerol gerou um maior rendimento de ácido propiônico em relação à glicose. Em comparação com a glicose, o glicerol com o maior estado redutivo produziu uma elevada relação HPr/HAc (P/A) para equilibrar o balanço NADH/NAD<sup>+</sup>. O glicerol produziu também uma maior razão HPr/HSuc (P/S) quando comparado a fermentação da glicose com pH 6.5, mas tal razão foi menor quando a fermentação ocorreu sem controle de pH. A forte inibição causada pelo ácido propiônico resultou em maior acúmulo de ácido succínico.

Para Dishida et al. (2012) o rendimento teórico de ácido propiônico é de 1 mol HPr/mol de glicerol. Entretanto, em condições experimentais, o rendimento oscila entre 0,6 e 0,9 mol mol<sup>-1</sup>.

Quando ocorre a formação de 1,3- propanodiol a partir da fermentação do glicerol, 1 mol de H<sub>2</sub> é consumido no processo, como se pode ver na Equação 2, a seguir:



De acordo com Tong e Cameron (1992) o balanço de massa global do processo fermentativo gera um rendimento teórico máximo de 1,3-propanodiol de 0,875 mol/mol de glicerol (Equação 3). Nenhum microrganismo conhecido é capaz de fermentar

glicerol inteiramente em 1,3-Propanodiol e CO<sub>2</sub>. Em vez disso, outros produtos são gerados como acetato, no qual o rendimento teórico máximo é reduzido 0,75 mol/mol de glicerol (Equação 4) ou mistura de subprodutos como acetato e formato, reduzindo o rendimento máximo teórico para 0,667 mol/mol de glicerol (Equação 5). O máximo rendimento teórico de 1,3-Propanodiol é mostrado na Tabela 3.3.

Tabela 3-4: **Máximo rendimentos teóricos de 1,3-Propanodiol a partir do glicerol.**

<b>Balanco de massa global</b>	
8 Glicerol	→ 7 1,3-Propanodiol + 2 CO <sub>2</sub> + 4 H <sub>2</sub> O (3)
Rendimento = 0,875 mol/mol	
<b>Balanco sujeito a formação de diferentes metabólitos</b>	
4 Glicerol	→ 3 1,3-Propanodiol + acetato + CO <sub>2</sub> + 2 H <sub>2</sub> O (4)
Rendimento = 0,75 mol/mol	
3 Glicerol	→ 2 1,3-Propanodiol + acetato + formato + H <sub>2</sub> O (5)
Rendimento = 0,667 mol/mol	

Fonte: Adaptado de Tong e Cameron (1992).

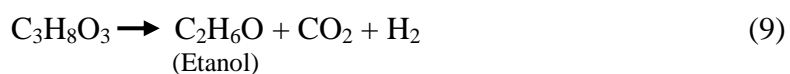
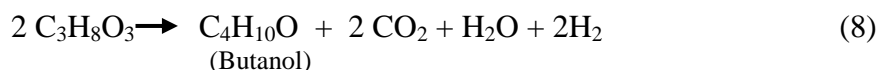
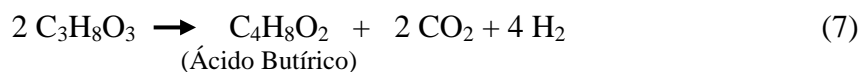
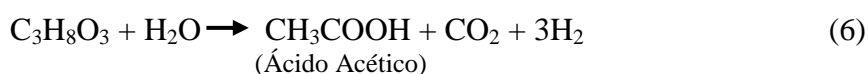
Para Biebl et al. (1999), o rendimento de 1,3-propanodiol por glicerol é determinado pela disponibilidade de NADH<sub>2</sub>, que é principalmente afetada pela distribuição de produtos (via oxidativa) e depende, antes de tudo, dos microrganismos utilizados e também das condições do processo (tipo de fermentação, excesso de substrato, vários inibidores).

Para Da Silva (2010) apud Biebl et al. (1999), durante a fermentação do glicerol, as culturas que apresentam maior rendimento em 1,3-propanodiol são as que produzem somente ácido acético como coproduto, além de CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>. Ao contrário, se as duas moléculas de NADH produzidas durante a formação de uma molécula de piruvato são completamente reutilizadas para posterior processamento do próprio piruvato, isto é, são utilizadas na formação de etanol ou butanol, o rendimento de 1,3-propanodiol é menor, no entanto, o rendimento em biomassa é maior. O rendimento de 1,3-propanodiol pode ser ainda melhorado reduzindo-se a evolução de H<sub>2</sub>.

De acordo com Sarma et al. (2012), o glicerol pode ser convertido em H<sub>2</sub> quando ocorre a formação de ácido acético, ácido butírico, butanol e etanol. As equações



estequiométricas (Equação 6, 7, 8 e 9) mostrando o rendimento de H<sub>2</sub> e metabólitos durante a conversão do glicerol (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>) são apresentadas a seguir:



### 3.3 Ácido propiônico: produção e aplicações

O ácido propiônico é um ácido carboxílico de cadeia curta que, no seu estado natural, é um líquido incolor, corrosivo, miscível em água e em diversos solventes orgânicos comuns (Harada, 2012). Suas propriedades físico-químicas são representadas na Tabela 3.5, a seguir.

Tabela 3-5: **Propriedades Físico-químicas do ácido propiônico**

Propriedades Físico-Químicas	
Nomenclatura IUPAC	Ácido propanóico
Fórmula molecular	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>
Peso molecular	74,08 g/mol
Aparência	Líquido incolor
Solubilidade em água, P <sub>a</sub> à 20 °C	Miscível
Ponto de fusão	-20,7 °C
Ponto de ebulição	140,8 °C
Viscosidade a 20 °C	1,1 cP
Densidade relativa (água = 1)	0,99 g cm <sup>-3</sup>

Fonte: Adaptado de Harada (2012).

O ácido propiônico e os seus sais de cálcio, sódio e potássio são comumente utilizados como conservantes de alimentos para humanos e para ração de animais, além de ser um importante intermediário químico na síntese de fibras de celulose, herbicidas, perfumes e produtos farmacêuticos. Atualmente, quase todo o ácido propiônico é produzido por síntese química a partir de matéria-prima de petróleo. Mas, a fermentação tem se tornado uma alternativa atrativa para produzir este ácido através de recursos renováveis (Zhu et al., 2010).

No decorrer dos anos, algumas fontes de carbono tem sido utilizadas para produzir ácido propiônico como a glicose, xilose, maltose, sacarose e soro de leite. Entretanto a competitividade da produção microbiana de ácido propiônico a partir de carboidratos tem sido limitada devido ao baixo rendimento de ácido propiônico e a elevada formação de subprodutos, tais como o ácido acético (Himmi et al., 2000).

A produção fermentativa de ácido propiônico utilizando o glicerol gera poucos subprodutos devido ao grau de redução de ambos os produtos. Esse grau de redução é expresso como o número equivalente de elétrons disponíveis por átomo de carbono. Dessa forma, o glicerol e o ácido propiônico possuem o mesmo grau de redução (4,67), o que explica porque não há necessidade de produzir outros metabólitos para equilibrar o balanço redox (Himmi et al., 2000).

Na maioria das fontes de carbono pesquisadas (glicose, xilose, sacarose, e etc), com exceção do glicerol, ácido acético foi obtido como produto majoritário com uma elevada razão molar com relação ao ácido propiônico de, aproximadamente, 0,42 moles de ácido acético/ mol de ácido propiônico. Em contraste, o glicerol, induz a formação de ácido propiônico, rendendo até 0,9 mol de ácido propiônico/ mol de glicerol, tendo a produção de ácido acético minimizada para 1 mol para cada 30 moles de ácido propiônico formado (Dishida et al., 2012).

Barbirato et al. (1997) avaliaram a produção de ácido propiônico utilizando glicerol com fonte de carbono. Três cepas de bactérias, *Propionibacterium acidipropionici*, *Propionibacterium acnes* e *Clostridium propionicum*, foram testadas para avaliar a habilidade destas em converter glicerol em ácido propiônico em batelada. *P. acidipropionici* apresentou a maior eficiência em termos de tempo de fermentação e de conversão. O ácido propiônico foi obtido como produto majoritário, atingindo um rendimento de 0,844 mol/mol. Outros produtos foram obtidos em menores proporções: ácido succínico (0,055 mol/mol), ácido acético (0,023 mol/mol), ácido fórmico (0,020 mol/mol) e n-propanol (0,036 mol/mol).

No estudo realizado por Coral et al. (2008) foi investigada a produção de ácido propiônico através da *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965 utilizando glicerol, lactato de sódio e melão de cana como fonte de carbono. Esta estratégia teve o intuito de verificar qual substrato possui o maior potencial para a produção de ácido propiônico. O experimento foi realizado em batelada variando duas temperaturas diferentes (30 e 36 °C), sem controle de pH. Os resultados obtidos mostraram que a produção de ácido propiônico foi maior na temperatura de 30 °C para todos os substratos utilizados. Outro aspecto importante é que o maior rendimento alcançado foi quando o glicerol foi fonte de carbono adotada (0,724 g/g). Os autores destacam que, ao utilizar glicerol, não foi constatada a presença de ácido acético, mas ao utilizar as outras fontes de carbono, este apareceu como produto indesejável.

Kósmider et al. (2010) pesquisaram a conversão de glicerol bruto e soro de leite em ácido propiônico utilizando *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*. O experimento foi conduzido em batelada com concentrações iniciais de 20 g L<sup>-1</sup> e 40 g L<sup>-1</sup> de glicerol e soro de leite, respectivamente. Os resultados mostraram que a maior produção de ácido propiônico foi alcançada com 4% de fonte de carbono no meio de cultura. A maior concentração de ácido propiônico atingida para as diferentes condições de substrato foi de 22,57 g L<sup>-1</sup>, utilizando somente soro de leite no meio, 22,47 g L<sup>-1</sup>, utilizando soro de leite com glicerol puro e 24,8 g L<sup>-1</sup> utilizando soro de leite com glicerol bruto. Os resultados também comprovaram que a substituição de 50% de soro de leite por glicerol puro/bruto ocasionou a diminuição da produção de ácido acético.

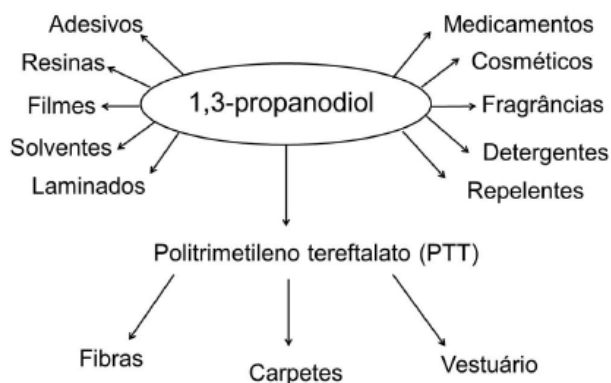
#### 3.4 1,3-Propanodiol: produção e aplicações

O 1,3-propanodiol foi um dos primeiros produtos da fermentação microbiana conhecidos. Em 1881, o químico austríaco August Freund o descobriu utilizando cultura mista contendo *Clostridium pasteurianum* (Da Silva et al., 2014).

O 1,3-propanodiol é um composto alifático linear, líquido, incolor, inodoro, miscível em água, álcool e éter e que possui uma infinidade de aplicações podendo ser utilizado em produção de laminados, solventes, molduras, adesivos, resinas, detergentes, cosméticos, desodorantes, entre outros. O 1,3-propanodiol é um importante intermediário para síntese orgânica, podendo ser utilizado em vários tipos de

medicamentos, repelente de insetos, perfumes, etc. Algumas aplicações podem ser observadas na Figura 3.9 (Kaur et al., 2012).

Figura 3-9: Aplicações do 1,3-propanodiol



Fonte: Adaptado de Kaur et al. (2012).

Mesmo possuindo propriedades físico-químicas interessantes para aplicações industriais, exibidas na Tabela 3.6, às limitações encontradas para sua produção em larga escala, como o alto custo, fez com que o 1,3-propanodiol apresentasse pouca utilização, com aplicações restritas a solventes e produção de dioxanos. Esse cenário mudou (1995-1998) após o anúncio da comercialização do 1,3-propanodiol baseado em poliéster, chamado de polítrimetileno tereftalato (Kaur et al., 2012).

Tabela 3-6: Propriedades físico-químicas do 1,3-propanodiol

Nome IUPAC	Propan-1,3-diol
Outros nomes	1,3-propanodiol, trimetilenoglicol, 1,3-di-hidroxi-propano
Fórmula molecular	$C_3H_8O_2$
Solubilidade em água	$100 \text{ g L}^{-1}$
Massa molar	$76,09 \text{ g mol}^{-1}$
Temperatura de ebulição	$210-212 \text{ }^\circ\text{C}$
Temperatura de fusão	$-28 \text{ }^\circ\text{C}$
Densidade	$1,0597 \text{ g cm}^{-3}$
Calor específico	$0,53 \text{ BTU/lb/}^\circ\text{F}$
Viscosidade	52 cp
Pressão de vapor	0,08 mmHg

Fonte: Da Silva et al., 2014. Condições padrão:  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  e 1 bar.

Atualmente, o 1,3-Propanodiol é produzido a partir de dois processos diferentes. Em uma das rotas produtivas, a acroleína é hidratada a 3-hidroxi-propionaldeído, que é posteriormente hidrogenado, obtendo-se o 1,3-propanodiol. Na outra rota, o óxido de etileno reage com monóxido de carbono na presença de um catalisador organometálico, produzindo hidroxi-aldeído, que é finalmente reduzido ao diol por hidrogenação. De modo geral, a produção química de 1,3-propanodiol necessita de elevadas temperaturas, alta pressão e catalisadores de custo elevado. Nesse processo ocorre a geração de intermediários tóxicos e poluentes, além de depender de combustíveis fósseis (Da Silva et al., 2014).

Uma alternativa particularmente atrativa para a produção de 1,3-propanodiol tem sido através de síntese biológica na qual matéria-prima renovável e condições normais de temperatura e pressão podem ser adotadas. O único substrato que pode ser fermentado a 1,3-propanodiol é o glicerol, sendo que esta fermentação ocorre naturalmente e sem a geração de sub-produtos tóxicos (Gallardo et al., 2014).

Somente poucos organismos são capazes de formá-lo. Estes organismos incluem enterobactérias do gênero *Klebsiella* (*K. pneumoniae*), *Enterobacter* (*E. agglomerans*), *Citrobacter* (*C. freundii*), *Lactobacillus* (*L. brevis* e *L. buchneri*) e espécies de *Clostridium* dos grupos *C. butyricum* e *C. pasteurianum*, dentre outros (Rossi, 2012).

Zhang et al. (2007) avaliaram a produção de 1,3-propanodiol utilizando cepa de *Klebsiella pneumoniae*. Os parâmetros ótimos de cultivo encontrados para pH e temperatura foram 8 e 40 °C, respectivamente. A concentração ótima de fonte de nitrogênio e carbono foram 6 g L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 20 g L<sup>-1</sup> de glicerol. Após 8 horas de fermentação em batelada, a concentração de 1,3-propanodiol atingiu o máximo de 12 g L<sup>-1</sup> e todo o glicerol foi consumido. *Citrobacter amalonaticus* também foi utilizada na produção anaeróbia de 1,3-propanodiol em batelada. O nível de produção de 1,3-propanodiol aumentou com a adição de vitamina B12. Em condições anaeróbias, o crescimento celular e a produção de 1,3-propanodiol só foram possíveis com a adição de nitrato ou fumarato. O efeito da vitamina B12 e do cloreto de cobalto sobre o crescimento celular e produção de 1,3-propanodiol também foram investigados.

Gungormusler et al. (2010) avaliaram a produção de 1,3-propanodiol utilizando *Clostridium saccharobutylicum* e compararam os resultados utilizando outros tipos de microrganismos anaeróbios (*Clostridium spp.*, *Pantoea agglomerans*, *Ochrobactrum anthropi*, *Chyreseomonas luteola* e *Klebsiella pneumoniae*) e aeróbio (*Lactobacillus spp.*). Os experimentos foram realizados em batelada com duração de 48 horas. A

concentração de 1,3-propanodiol foi medida a cada 24 horas. A maior concentração de 1,3-propanodiol obtida foi através da *C. beijerinckii* (8,9 g L<sup>-1</sup>) e o maior consumo de glicerol encontrado foi através de experimento contendo *C. saccharobutylicum* (93%). *C. saccharobutylicum* e *C. pasteurianum* obtiveram resultados de concentração de 1,3-propanodiol de 6,7 g L<sup>-1</sup> e 6,9 g L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Reungsang et al. (2013b) avaliaram a produção simultânea de hidrogênio e etanol a partir de glicerol residual utilizando *Enterobacter aerogenes* KKU-S1. A metodologia baseada em planejamento fatoriais de Plackett-Burman foi adotada para a identificação dos parâmetros que mais influenciavam a produção simultânea de H<sub>2</sub> e Etanol. Os resultados indicaram que o pH inicial, temperatura, concentração de extrato levedura e concentração de glicerol tem, estatisticamente, significância na produção de hidrogênio e etanol. As condições ótimas de máxima produção de H<sub>2</sub> e etanol foram: 1 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 37 g L<sup>-1</sup> de glicerol, pH inicial de 8.14 e temperatura de 37 °C. A taxa de produção máxima de H<sub>2</sub> e etanol atingida foram de, respectivamente, 0.24 mmol H<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> e 120 mmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> de etanol. Outro composto de interesse produzido no processo foi o 1,3 – propanodiol que, nas condições ótimas desse estudo, foi obtido com concentração de 8,5 mmol L<sup>-1</sup>.

Pflugl et al. (2013) estudaram o potencial da *Lactobacillus diolivorans* em produzir 1,3-propanodiol a partir de glicerol residual. Diferentes parâmetros de cultivo, principalmente a composição do meio, foram testados em batelada e batelada alimentada. A concentração de 1,3-propanodiol obtida em batelada foi de 41,7 g L<sup>-1</sup>. Esse valor aumentou para 73,7 g L<sup>-1</sup> em batelada alimentada tendo glicose como co-substrato. No meio foi adicionado extrato de levedura e vitamina B12. Ressalta-se que a adição de vitamina B12 no meio aumentou a produção para 84,5 g L<sup>-1</sup> de 1,3-propanodiol em batelada alimentada.

Drozdzyńska et al. (2014) pesquisaram a produção de 1,3-propanodiol através da *Citrobacter freundii* e *Hafnia alvei*. O experimento foi realizado em batelada com pH constante no valor de 7 e temperatura de 30°C e 37°C. Após 48 horas de fermentação, *H. alvei* produziu 11 g L<sup>-1</sup> de 1,3-propanodiol na temperatura de 37 °C. Para *C. freundii*, os melhores resultados foram obtidos na temperatura de 30 °C. Após 24 horas de fermentação, a concentração de 1,3-propanodiol atingiu 23 g L<sup>-1</sup>.

Culturas mistas de microrganismos possuem grande potencial para gerar produtos químicos em geral. Entretanto poucos trabalhos são encontrados na literatura no qual culturas mistas são utilizadas para converter glicerol em produtos. Uma das

grandes vantagens em utilizar esse tipo de cultura é a possibilidade de operar em condição não estéril, o que viabiliza economicamente o processo (Dietz e Zeng., 2014).

Para Ghazali et al. (2004) as vantagens da utilização de culturas mistas em processos fermentativos pode ser atribuído aos efeitos das interações sinérgicas entre os membros da cultura de microrganismos. Os autores ressaltam também que microrganismos individuais podem metabolizar somente uma faixa limitada de substratos, enquanto que culturas mistas possuem ampla capacidade enzimática.

Selembo et al. (2009) produziram hidrogênio e 1,3-propanodiol através da fermentação anaeróbia de glicerol puro e glicerol residual de indústria de biodiesel. O processo ocorreu em batelada com cultura mista de microrganismos proveniente de solo de produção de tomate. Os rendimentos de produção de hidrogênio obtidos foram de  $0,28 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ glicerol}_{\text{consumido}}$  para o glicerol puro e  $0,31 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ glicerol}_{\text{consumido}}$  para o glicerol residual. Nesse estudo também foi quantificada a produção de 1,3- propanodiol no qual, tendo glicerol puro como substrato, obteve-se  $0,69 \text{ mol-PD/mol glicerol}_{\text{consumido}}$ . Já no processo onde o glicerol residual atuou como substrato, o rendimento foi de  $0,59 \text{ mol-PD/mol-glicerol}_{\text{consumido}}$ . Tais resultados demonstram que a produção de biodiesel pode ser combinada com a produção de hidrogênio e 1,3- propanodiol para a máxima utilização dos recursos e minimização dos resíduos gerados.

Liu et al. (2013) estudaram a conversão do glicerol bruto em hidrogênio e 1,3-propanodiol em batelada, utilizando solo orgânico como inóculo. A produção de hidrogênio no headspace e de 1,3-propanodiol na fase líquida foram avaliada em função do diferentes tempos de retenção de hidrogênio (HyRTs), que foram controlados pelos intervalos de coletas de gás (GCIs) e pela coleta inicial de gás (IGCTs). Dois estágios de purificação do glicerol (P2 e P3) foram testados em três diferentes concentrações ( $3,5$  e  $7 \text{ g L}^{-1}$ ). Longos HyRT (maiores GCI e IGCT) proporcionaram menores rendimentos de hidrogênio, mas conduzem a maiores rendimentos de 1,3-propanodiol. O glicerol P3 na concentração de  $7 \text{ g L}^{-1}$ , atingiu o maior rendimento de 1,3-propanodiol ( $0,65 \text{ mol/mol}$ ) e o maior rendimento de hidrogênio ( $0,75 \text{ mol/mol}$ ). Os resultados mostraram que a produção de hidrogênio e 1,3-propanodiol podem ser otimizadas através do ajuste de HyRT na fermentação anaeróbia do glicerol.

Dietz e Zeng (2014) avaliaram a aplicabilidade de culturas mistas para a produção de 1,3-propanodiol a partir do glicerol bruto. Três diferentes fontes de cultura mista de microrganismos foram testadas sendo que, a cultura proveniente de estação

municipal de tratamento de águas residuárias (HH), mostrou melhores resultados. As culturas foram obtidas a partir de diferentes plantas de produção de biogás da Alemanha. Todas as plantas foram operadas em temperatura mesofílica (35-37 °C) e pH entre 7,5 e 7,6. O processo fermentativo para produzir 1,3-propanodiol ocorreu em batelada e batelada alimentada, tendo glicerol bruto como fonte de carbono com concentração inicial de 25 g L<sup>-1</sup>. A temperatura foi mantida em 37 °C e o pH foi regulando em 7. O 1,3-propanodiol pode ser obtido como produto principal em meio a subprodutos como ácidos orgânicos típicos (acético e butírico). No processo em batelada, os microrganismos provenientes de planta de biogás alimentada somente por resíduo agrícola (HA), não produziram metabólitos. Já a cultura proveniente de planta de biogás, alimentada por água residuária municipal (HH), apresentou a formação de 1,3-propanodiol (15,21 g L<sup>-1</sup>), acetato (3,10 g L<sup>-1</sup>) e butirato (1,56 g L<sup>-1</sup>). A cultura de planta alimentada por mistura de resíduo doméstico, comercial e agrícola (FW), apresentou a formação de 1,3-propanodiol (12,54 g L<sup>-1</sup>), acetato (5,84 g L<sup>-1</sup>), lactato (1,79 g L<sup>-1</sup>), etanol (3,13 g L<sup>-1</sup>) e formato (2,77 g L<sup>-1</sup>).

### 3.5 Hidrogênio: produção e aplicações

O hidrogênio possui elevado poder calorífico no qual, pode ser observado na Tabela 3.7, que este possui valor bastante elevado quando comparado a outros hidrocarbonetos. O H<sub>2</sub> pode ser utilizado em célula a combustível, visto que esta é capaz de gerar eletricidade com alta eficiência energética com diversas aplicações para a sociedade em geral.

Tabela 3-7: Poder calorífico de diferentes combustíveis

Combustível	Valor do poder calorífico superior (a 25 °C e 1 atm)	Valor do poder calorífico inferior (a 25 °C e 1 atm)
Hidrogênio	141.86 kJ/g	119.93 kJ/g
Metano	55.53 kJ/g	50.02 kJ/g
Propano	50.36 kJ/g	45.6 kJ/g
Gasolina	47.5 kJ/g	44.5 kJ/g
Etanol	30.57 kJ/g	27.71 kJ/g
Metanol	19.96 kJ/g	18.05 kJ/g

Fonte: Santos e Santos, (2005).



Os métodos de produção de hidrogênio podem ser divididos em função das três principais matérias-primas utilizadas, que são os combustíveis fósseis, água e biomassa. Os principais métodos de produção que utilizam combustíveis fósseis são a reforma a vapor do gás natural, a oxidação parcial de hidrocarbonetos pesados e gaseificação do carvão. As desvantagens destes processos estão principalmente nos impactos ambientais, riscos aos operários nas usinas, como incêndio e exposição a agentes cancerígenos e altas temperaturas.

Em métodos no qual a matéria prima utilizada é a água, destacam-se a eletrólise, os processos foto-eletrouímicos e processos termoquímicos. Os processos biológicos (biofotólise da água, foto-fermentação e fermentação anaeróbia), a gaseificação da biomassa, a reforma a vapor do etanol e a reforma em fase líquida, são métodos adotados quando a biomassa é a matéria prima utilizada no processo produtivo (Souza, 2009). Os processos biológicos vêm ganhando destaque, pois estes contribuem para o tratamento de águas residuárias ao passo que geram fonte de energia alternativa.

A produção biológica de hidrogênio e outros compostos tendo como substrato o glicerol têm sido apresentados em diversos trabalhos na literatura. Tais estudos, na grande maioria, foram operados em biorreatores em batelada.

Nakashimada et al. (2002) produziram hidrogênio a partir de diferentes substratos como glicose, frutose, galactose, sorbitol, manitol, gluconato e glicerol. No estudo foi observado que o maior rendimento de produção de hidrogênio foi obtido quando o glicerol foi utilizado como substrato. Sendo assim, os autores sugeriram que o elevado estado redox intracelular (elevada razão NADH/NAD) acelera a produção de H<sub>2</sub>.

Costa (2010) estudou a seleção de bactérias capazes de degradar o glicerol residual da síntese química do biodiesel, tendo como subprodutos a formação de H<sub>2</sub> e etanol através de fermentação realizada em reator de cultivo submerso. Na etapa inicial do experimento foram isoladas e identificadas as bactérias presentes no consórcio microbiano ambiental (lodo) no qual a bactéria *Klebsiella pneumoniae* BLb01 apresentou o maior potencial de degradação do glicerol (100%) e conversão em bioprodutos. Os resultados obtidos mostraram que a maior produção de hidrogênio foi obtida com meio de cultivo com 30 g L<sup>-1</sup> de glicerol a 39 °C.

Ngo et al. (2011) avaliaram a produção de biohidrogênio a partir da bactéria termófila *Thermotoga neapolitana* DSM 4359. O processo foi realizado em batelada no

meio de cultura contendo glicerol puro ou glicerol residual como único substrato, tendo a concentração de 5 g L<sup>-1</sup>. O glicerol residual passou por um pré-tratamento que consistiu em remover metanol e etanol por evaporação rotativa a 45 °C e sólidos através de centrifugação a 15 000 rpm por 15 minutos. A produção de hidrogênio após 49 h de fermentação foi de 1,02 mol-H<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> glicerol<sub>consumido</sub> para o glicerol puro e 1,28 mol-H<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> glicerol<sub>consumido</sub> para o glicerol residual. Outro aspecto importante abordado no artigo foi que o rendimento de produção de H<sub>2</sub> tendo como substrato o glicerol pré-tratado foi maior quando comparado com o glicerol puro. Após 56 horas de fermentação a produção do biogás foi de 1,97 mol-H<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> glicerol<sub>consumido</sub>, para o glicerol pré-tratado e 1,27 mol-H<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> glicerol<sub>consumido</sub> para o glicerol puro, mostrando que o pré-tratamento do substrato é fundamental para a conversão do glicerol residual através da *Thermotoga neapolitana*.

De Sá (2011) avaliou a produção de hidrogênio em batelada utilizando diferentes substratos como a sacarose, glicose, frutose e glicerol com concentração de 10 g L<sup>-1</sup>. O processo ocorreu a 35 °C e pH inicial de 5,5. No experimento, o inóculo passou por pré-tratamentos ácido, alcalino e térmico, no qual foi avaliado o desempenho das comunidades bacterianas responsáveis pela produção de H<sub>2</sub>. O processo no qual o inóculo foi tratado termicamente, obteve-se o rendimento de 4,62 mol de H<sub>2</sub>/ mol de sacarose em 72 horas de fermentação, sendo este o maior rendimento constatado no estudo de Sá. Os outros substratos obtiveram os seguintes rendimentos: 2,19 mol de H<sub>2</sub>/ mol de glicose, 2,09 mol de H<sub>2</sub>/ mol de frutose, 1,88 mol de H<sub>2</sub>/ mol de xilose e 0,80 mol de H<sub>2</sub>/ mol de glicerol. Com base nos rendimentos teóricos máximos de até 8 mol de H<sub>2</sub>/ mol de sacarose, 4 mol de H<sub>2</sub>/ mol de açúcar C6, 6 mol de H<sub>2</sub>/ mol de açúcar C5 e 3 mol de H<sub>2</sub>/ mol de glicerol, com a respectiva formação de ácido acético em todos os casos, de Sá constatou bons rendimentos da produção de H<sub>2</sub> para os diferentes substratos testados: 52% para a sacarose 1, 53% para a sacarose 2, 55% para a glicose, 52% para frutose, 31% para xilose 1, 15% para xilose 2 e 27% para o glicerol.

Bernal et al. (2013) estudaram a produção biológica de hidrogênio utilizando 13 cepas nativas de bactéria (*Clostridium* spp) isoladas do solo colombiano. As cepas foram incubadas a 37 °C por 24 horas em condições anaeróbias para promover o crescimento do inóculo. Tendo como substrato o glicerol de fonte industrial (50 g L<sup>-1</sup>), a conversão em hidrogênio foi investigada usando fermentação em batelada, ocorrendo esta em duplicata durante 72 horas. Os resultados obtidos foram quantificados em

relação à produção de ácidos, hidrogênio, biomassa e solvente. O rendimento de produção de hidrogênio foi de  $0,19 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}$  glicerol.

### 3.6 Biorreatores utilizados para a produção de ácido propiônico, 1,3-propanodiol e hidrogênio e outros metabólitos a partir de glicerol

A formação de produtos através de processos fermentativos sofre elevada influência das condições fluidodinâmicas estabelecidas pelo tipo de reator adotado no processo. Tais condições podem implicar em variações de transferência de massa e de calor que estão diretamente relacionadas ao desenvolvimento dos microrganismos fermentativos (Reis, 2010).

Com o intuito de serem operados com baixos tempos de detenção hidráulica e elevados tempos de retenção celular, os reatores anaeróbios necessitam reter uma elevada quantidade de biomassa, caracterizando assim os sistemas de alta taxa, no qual podem ser classificados de acordo com o tipo de crescimento da biomassa no sistema. Esse crescimento bacteriano pode ser disperso ou aderido no qual, no primeiro caso, ocorre à presença de flocos ou grânulos de bactérias inteiramente livres. No segundo caso, ocorre um crescimento de bactérias agregadas ao material suporte, levando à formação de um filme biológico. Os reatores anaeróbios de leito fixo e leito fluidizado são considerados sistemas com crescimento bacteriano aderido. Já os sistemas com crescimento bacteriano disperso são obtidos nos reatores anaeróbios de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB), de leito granular expandido (EGSB) e reator anaeróbio de agitação contínua (CSTR) (Pestana et al., 2009).

Grande parte dos estudos realizados para produzir metabólitos por via fermentativa foi efetivados por meio de reatores descontínuos devido à praticidade de operação e controle dos mesmos. Reatores do tipo leito fixo, manta de lodo, leito fluidizado e contínuo com agitação, também foram projetados para realizar ensaios de produção de diferentes metabólitos. Atualmente, nenhum trabalho na literatura é encontrado com o foco na produção de ácido propiônico e 1,3-propanodiol em reator anaeróbio de leito fluidizado. Entretanto, estudos mais recentes tem verificado que os reatores anaeróbios de leito fluidizado possuem alto desempenho na produção de etanol e hidrogênio quando comparado com outros tipos (Amorim et al., 2009). Portanto, pode-se considerar o RALF uma configuração de reator promissora para a produção fermentativa de ácido propiônico, 1,3-propanodiol e hidrogênio.

### 3.6.1 Reator Contínuo de Tanque Agitado (CSTR)

O reator contínuo de tanque agitado consiste em um cilindro com agitação mecânica podendo ser utilizado com biomassa livre ou imobilizada. Este reator tem sua capacidade bastante variada de acordo com o tipo de processo no qual está sendo empregado. Devido sua facilidade de operação, os reatores contínuos de tanque agitado destacam-se em situações nas quais necessitam de um grande controle de operação. Além de necessitarem de cuidados para evitar que a agitação mecânica cause danos a biomassa, tais reatores necessitam de atenção quando são utilizados baixos tempos de detenção hidráulica, podendo assim acarretar arraste da biomassa. Com o intuito de evitar o arraste, geralmente é feito o uso de biomassa imobilizada para garantir a presença de biomassa dentro do reator durante o processo (Reis, 2010; Silveira, 2006).

Suratago e Nootong (2012) pesquisaram a produção de 1,3-propanodiol através do *Clostridium butyricum* DSM 5431 em um reator de mistura tendo partículas de plástico atuando como meio suporte. As partículas foram lavadas com água fervida durante 15 minutos seguida de outra lavagem em solução de etanol 95%. Posteriormente, foram esterilizadas com vapor durante 15 minutos. O biorreator de escala laboratorial foi construído em acrílico com 19 cm de diâmetro interno e 25 cm de altura. Quatro chicanas foram acopladas na parede interna para aumentar o grau de mistura, sendo esta alcançada com o auxílio de uma barra magnética. O reator foi operado em modo batelada durante 48 h.

Os resultados da operação indicaram que a produção de 1,3-propanodiol em reator de mistura era viável. O intervalo do pH durante o experimento foi de 6,9 – 7,0. A máxima concentração de 1,3-propanodiol ( $33,8 \text{ g L}^{-1}$ ), o rendimento do produto ( $0,7 \text{ mol mol}^{-1}$ ) e a produtividade ( $16,9 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) foram obtidos quando o reator foi operado utilizando uma concentração de glicerol na entrada e uma taxa de diluição de  $60 \text{ g L}^{-1}$  e  $0,5 \text{ h}^{-1}$ , respectivamente.

### 3.6.2 Reator anaeróbio de fluxo ascendente com manta de lodo (UASB)

Os reatores anaeróbios de fluxo ascendente com manta de lodo (UASB) são reatores que tratam biologicamente efluentes com base na decomposição anaeróbia da matéria orgânica. Esse reator é composto de três partes que são distribuídas em zona de decomposição, zona de separação de fases e zona de sedimentação.

Através do movimento ascendente do afluente por meio da base do reator, o líquido entra em contato com o leito de lodo na zona de decomposição no qual os sólidos orgânicos suspensos são digeridos através de uma transformação anaeróbia produzindo biogás e novas células microbianas. Dessa forma, o sistema não necessita de dispositivos de mistura, pois esta é efetuada pelo fluxo ascensional e pelas bolhas de gás formadas.

Posteriormente, em direção à zona de separação de fases, o biogás e o líquido passam pelo separador de fases permitindo a coleta dos gases e o retorno da biomassa para a zona de sedimentação. O retorno da biomassa ocorre devido ao escoamento ascendente do líquido que, ao se aproximar da superfície líquida livre, tem sua velocidade progressivamente reduzida, de modo a ser superada pela velocidade de sedimentação das partículas (van Haandel e Lettinga, 1994).

Chookaew et al. (2014) avaliaram a produção de hidrogênio a partir de glicerol bruto utilizando *Klebsiella sp.* TR17 imobilizada em um reator anaeróbio de manta de lodo (UASB). O reator foi operado com temperatura de 40°C e pH entre 6,5 e 7. Diferentes tempos de detenção hidráulica (2 – 12 h) e concentração de glicerol (10, 20 e 30 g L<sup>-1</sup>) foram adotados no processo.

O meio de cultura contendo glicerol com concentrações de 10, 20 e 30 g L<sup>-1</sup> foi inserido em cada reator UASB. Os reatores foram monitorados a cada três dias com análises de sólidos suspensos voláteis e concentração de substrato, e a cada dois dias foi feita a medição dos metabólitos solúveis produzidos. A produção de biogás e o pH foram medidos diariamente.

A diminuição do tempo de detenção hidráulica acarretou num aumento da taxa de produção e rendimento de H<sub>2</sub>. A máxima taxa de produção de 242,15 mmol H<sub>2</sub>/L/d e rendimento de 44,27 mmol H<sub>2</sub>/g glicerol consumido, foram alcançadas no tempo de detenção hidráulica de 4 h e concentração de glicerol de 30 e 20 g L<sup>-1</sup>, respectivamente. O principal metabólito obtido foi o 1,3-propanodiol no tempo de detenção hidráulica de 12 h para todas as concentrações de glicerol testadas no experimento e o valor máximo obtido foi de 9 g L<sup>-1</sup> na concentração de 20 g L<sup>-1</sup> de glicerol.

### 3.6.3 Reator granular de leito expandido (EGSB)

O reator granular de leito expandido EGSB (Expanded Granular Sludge Bed) possui características hidrodinâmicas semelhante ao reator de leito fluidizado

diferenciando-se pelo fato de não utilizar biomassa imobilizada. Nesse tipo de reator a inoculação ocorre a partir do uso de biomassa já cultivada, provenientes de reatores UASB (lodos granulares). No reator EGSB são possíveis maiores velocidades ascensionais superiores ao UASB convencional devido às características geométricas do reator, em geral com seção menor e de maior altura. Com isso é possível uma maior expansão do leito favorecendo assim ao contato entre a biomassa e a água residuária (Kato et al., 2001).

Gallardo et al. (2014) produziram 1,3-propanodiol a partir de glicerol residual em três reatores granulares de leito expandido (EGSB). Um reator (R1) foi inoculado com lodo granular, o segundo reator (R2) com lodo granular tratado termicamente e o terceiro reator (R3) foi preenchido com lodo granular fragmentado. Diferentes tempos de detenção hidráulica foram aplicados começando de 24 h e variando posteriormente para 20, 12, 6 e 3 h. As fermentações contínuas foram conduzidas a 37°C e alimentados com 25 g L<sup>-1</sup> de glicerol e meio contendo nutrientes para suprir a atividade metabólica dos microrganismos. Recirculação interna de líquido foi utilizada para garantir a expansão dos grânulos dentro do reator. O pH do meio foi ajustado em 6,8.

Glicerol foi convertido em 1,3-propanodiol em todos os reatores. Acetato e butirato foram constatados em baixas concentrações (< 1 g L<sup>-1</sup>), exceto no R2 no TDH de 12 h (até 4 g L<sup>-1</sup>) e no R1 no TDH de 6 h (1,8 g L<sup>-1</sup>). O pH foi mantido na faixa de 5-6 para o TDH de 24 - 12 h decrescendo para a faixa de 4 - 5 com a diminuição do TDH (6 - 3 h). O máximo rendimento (0,52 mol mol<sup>-1</sup>) e produtividade (57 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) foram atingidas no R1 no tempo de detenção hidráulica de 12 e 3 h, respectivamente.

Bósio (2014) avaliou a produção de hidrogênio em reator EGSB utilizando glicerol bruto (5 g L<sup>-1</sup>) como fonte de carbono. A temperatura e o pH do sistema foram controlados, mantidos em 30 °C e 4.5, respectivamente. A autora constatou que o reator obteve um comportamento crescente de produção volumétrica de H<sub>2</sub> ao passo que o TDH do sistema foi diminuído. Os principais metabólitos detectados foram 1,3-propanodiol, etanol, ácido acético, ácido butírico e ácido propiônico.

### 3.6.4 Reator Anaeróbio de Leito fixo

O reator anaeróbio de leito fixo é constituído por um tanque preenchido com um leito de partículas inertes que atuam como meio suporte para imobilização da biomassa no interior do reator. Tratando-se de tratamento de efluentes, um aspecto positivo desse

tipo de reator é a redução do tempo de detenção hidráulica que passou de dias para algumas horas, pois o aumento da área superficial devido ao leito de partículas acarreta num aumento do contato entre os microrganismos e o afluente a ser tratado (Reis, 2010).

Alguns trabalhos são encontrados na literatura que visam a produção de 1,3-propanodiol em leito fixo, como é o caso de Gonen et al. (2012) que estudaram o efeito da pedra-pomes utilizada como meio suporte para imobilização de *Klebsiella pneumoniae* a partir de glicerol bruto.

*K. pneumoniae* foi imobilizada em três diferentes tipos de meio suporte: espuma de poliuretano (PUF), esferas de vidro (CB) e pedra-pomes (PS) para efeitos comparativos. Todos os biorreatores foram operados continuamente usando diferentes tempos de detenção hidráulica, variando entre 0,5 e 16 h. Os biorreatores possuíam 30 cm de altura e 4,5 cm de diâmetro interno, sendo estes preenchidos individualmente com os respectivos meios suportes. A altura do leito nos três reatores foi de 23 cm, aproximadamente. Visando reforçar a imobilização da biomassa no meio suporte, o meio de cultura foi continuamente reciclado dentro do reator com uma taxa de diluição de  $0,05 \text{ h}^{-1}$  durante uma semana e com temperatura fixa de  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .

A concentração máxima de 1,3-propanodiol ( $19,7 \text{ g L}^{-1}$ ) obtida foi alcançada com espuma de poliuretano no TDH de 8 h. Por outro lado, os reatores que utilizaram esferas de vidro e pedra-pomes como meio suporte obtiveram resultados semelhantes no TDH 50 % menor. A concentração de 1,3-propanodiol aumentou ( $19,7$ ,  $18,4$  e  $19,0 \text{ g L}^{-1}$  para PUF, PS e GB respectivamente) ao passo que o tempo de detenção hidráulica aumentou (4, 6 e 8 h, respectivamente).

Gonen et al. (2013) pesquisaram a produção de 1,3-Propanodiol utilizando glicerol residual através da imobilização de *Clostridium beijerinckii* B-593 em esferas e anéis de vidro em reator de leito empacotado. A fermentação ocorreu durante 40 dias no qual o tempo de detenção hidráulica foi variado entre 2 e 16 h. A produção volumétrica máxima constatada no experimento foi de  $7 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , com concentração de  $13 \text{ g L}^{-1}$ , sendo atingida no tempo de detenção hidráulica de 2 h.

Na Tabela 3.8, são mostradas pesquisas reportadas na literatura no qual o glicerol (puro e bruto) foi metabolizado por diferentes microrganismos em variadas configurações de reatores, gerando metabólitos diversificados.

Tabela 3-8: Principais microrganismos, tipo de reator e seus metabólitos formados a partir da fermentação do glicerol.

<b>Microrganismo</b>	<b>Tipo de reator</b>	<b>Substrato/ Concentração</b>	<b>Rendimentos</b>	<b>Concentração metabólitos</b>	<b>Principais Produtos</b>	<b>Referência</b>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Batelada	Glicerol Bruto 200 g L <sup>-1</sup>	0,64 mol de 1,3-PD/mol	1,3-PD: 24,98 g L <sup>-1</sup> 2,3-BD: 9,16 g L <sup>-1</sup>	1,3 - Propanodiol, 2,3-butanodiol, Acetato.	Sattayasamithit et al. (2011)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Batelada	Glicerol Bruto 20 – 100 g L <sup>-1</sup>	0,25 mol de H <sub>2</sub> /mol	1,3-PD: 3,52 g L <sup>-1</sup> 2,3-BD: 2,06 g L <sup>-1</sup> EtOH: 3,95 g L <sup>-1</sup>	H <sub>2</sub> , Ácido (Acético, Succínico), 1,3 – Propanodiol, 2,3 – Butanol, Etanol	Chookaew et al. (2012)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Leito Fixo	Glicerol Bruto 40 g L <sup>-1</sup>	0,45 g de 1,3-PD/g	1,3-PD: 19,7 g L <sup>-1</sup>	1,3-propanodiol, 2,3-butanodiol, etanol, ácido acético	Gonen et al. (2012)
<i>Clostridium beijerinckii</i>	Leito Fixo	Glicerol Bruto 45 g L <sup>-1</sup>	0,77 mol de 1,3-PD/mol	1,3-PD: 13 g L <sup>-1</sup> 2,3-BD: 1,48 g L <sup>-1</sup> EtOH: 2,53 g L <sup>-1</sup>	Ácido (Lático, Acético), 2,3 – Butanol e Etanol.	Gonen et al. (2013)
<i>Clostridium butyricum</i> , <i>Clostridium pasteurianum</i> , <i>Klebsiella sp.</i>	Batelada/ CSTR	Glicerol Bruto 10 g L <sup>-1</sup>	0,77 mol de H <sub>2</sub> /mol	1,3-PD: 2,7 g L <sup>-1</sup> Butanol: 1,8 g L <sup>-1</sup> HAc: 0,7 g L <sup>-1</sup>	H <sub>2</sub> , Etanol, 1,3 – Propanodiol, Butanol, Ácido (Acético, Lático Butírico)	Lo et al. (2013)



Tabela 3-9: Principais microrganismos, tipo de reator e seus metabólitos formados a partir da fermentação do glicerol (Continuação).

<b>Microrganismo</b>	<b>Tipo de reator</b>	<b>Substrato/ Concentração</b>	<b>Rendimentos</b>	<b>Concentração metabólitos</b>	<b>Principais Produtos</b>	<b>Referência</b>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	UASB	Glicerol Puro/ Bruto 25 g L <sup>-1</sup>	253 mmol H <sub>2</sub> /mol	1,3-PD: 70 mmol/L HPr: 17,1 mmol/L EtOH: 100 mmol/L	H <sub>2</sub> , Etanol, 1,3 – Propanodiol, Ácido (Acético, Fórmico)	Reungsang et al. (2013a)
<i>Cultura mista</i>	Batelada/ Batelada alimentada	Glicerol Bruto 25 g L <sup>-1</sup>	0,76 mol de 1,3-PD/mol	1,3-PD: 15,21 g L <sup>-1</sup> HAc: 3,10 g L <sup>-1</sup> Butirato: 1,56 g L <sup>-1</sup>	1,3-Propanodiol, acetato, lactato, butirato, etanol e formato	Dietz e Zeng (2014)
<i>Lodo granular</i>	EGSB	Glicerol Bruto 25 g L <sup>-1</sup>	0,59 mol de 1,3-PD/mol	HAc e butirato: < 1 g L <sup>-1</sup>	1,3-propanodiol	Gallardo et al. (2014)
<i>Clostridium pasteurianum</i>	Batelada	Glicerol Puro e bruto 10 – 25 g L <sup>-1</sup>	0,61 g de 1,3-PD/g	-	Butanol, 1,3-propanodiol, etanol	Khanna et al. (2014)

Fonte: Elaborado pela autora.

### 3.7 Reator anaeróbio de leito fluidizado (RALF)

O reator de leito fluidizado consiste de um vaso cilíndrico contendo meio suporte inorgânico. Tais sistemas se caracterizam pela capacidade em reter grandes quantidades de biomassa. Portanto, mesmo com a aplicação de elevadas cargas hidráulicas no sistema, é possível manter um elevado tempo de retenção de sólidos. Dessa forma, o RALF é compacto, com volume bastante inferior ao reator anaeróbio de crescimento suspenso, mantendo-se, no entanto, elevado grau de estabilização do lodo. Neste tipo de reator, o meio é fluidizado pela velocidade ascendente do líquido criada pelas taxas de escoamento de alimentação e recirculação. A eficácia de separação do líquido, biogás e sólido, é garantida pela presença de um separador no topo do reator (Barros, 2009).

Aspectos positivos dos reatores anaeróbios de leito fluidizado são o acúmulo de grande quantidade de biomassa aderida ao meio suporte, suportando elevadas Taxas de Carregamento Orgânico (TCO), possibilidade de aplicação de baixos Tempos de Detenção Hidráulica (TDH), e boas características de mistura, otimizando a transferência de massa entre o substrato e os microrganismos, além de promover alta velocidade de agitação na fase líquida. Este reator é de fácil controle e automação e, pelo fato de não haver pontos de empacotamento de leito, é possível ter um bom controle da temperatura. A eficiência do processo de leito fluidizado é garantida pelo máximo contato entre o líquido e o material suporte, pela minimização da formação de canais preferenciais, e retenção de gás (Wu et al., 2003).

Bósio (2014) avaliou a produção de hidrogênio em RALF tendo glicerol bruto ( $5 \text{ g L}^{-1}$ ) como substrato em temperatura fixa em  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  e pH controlado em 4.5. A autora variou o TDH entre 14 e 1 h e constatou elevados valores de produção volumétrica de hidrogênio e conteúdo de  $\text{H}_2$  no biogás formado no experimento. A autora afirmou também que o rendimento de  $\text{H}_2$  foi linear em todo o experimento, sendo em torno 0.85 mol/mol.

Ferreira (2014) operando um RALF em condições idênticas ao trabalho de Bósio (2014) exceto pela a temperatura, que foi fixada em  $55 \text{ }^\circ\text{C}$ , obteve 1,3-propanodiol como o principal metabólito. O rendimento de  $\text{H}_2$  também manteve um comportamento linear em função da variação do TDH, sendo este de 1 mol/ mol. No TDH de 1 h, o rendimento alcançado foi de 3 mol/mol.

Amorim (2009) estudou o efeito da adição de alcalinidade, da concentração da glicose e da taxa de carregamento orgânico na produção de hidrogênio e ácidos orgânicos em reator anaeróbico de leito fluidizado. O autor utilizou oito reatores idênticos no qual quatro deles, cujas concentrações de glicose foram de 2000, 4000, 10000 e 25000 mg L<sup>-1</sup>, estiveram operados sem adição de alcalinidade visando atingir o autoequilíbrio do pH. Os outros reatores possuíam a mesma concentração de glicose, sendo operados com adição de alcalinidade para controlar o pH. Os reatores foram preenchidos com partículas não uniformes de argila expandida (cinasita) para adesão da biomassa. A temperatura foi mantida em 30 °C por meio de encamisamento do reator em banho termostatizado. O tempo de detenção hidráulica (TDH) foi variado entre 8 e 1 hora.

Os ácidos orgânicos obtidos foram, principalmente, acético e butírico nos ensaios realizados com 2000 mg L<sup>-1</sup> e 4000 mg L<sup>-1</sup> de glicose. Foi constatada a produção volumétrica de hidrogênio máxima de 1,58 L h<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup>, para o reator operado com 10000 mg L<sup>-1</sup> de glicose com adição de alcalinidade e um rendimento máximo de 2,52 mol H<sub>2</sub>/ mol de glicose, para o reator operado com 4000 mg L<sup>-1</sup> de glicose com adição de alcalinidade. Em ambos os reatores, o conteúdo de hidrogênio aumentou com a redução do TDH de 8 h para 1 h.

Shida (2008) avaliou a produção de hidrogênio e ácidos orgânicos por fermentação acidogênica em reator anaeróbico de leito fluidizado contendo argila expandida como meio suporte de imobilização de biomassa. O sistema foi operado com TDH de 8, 6, 4, 2, 1 h, na temperatura de 30°C, e foi alimentado com água residuária sintética contendo 2000 mg L<sup>-1</sup> de glicose. Shida optou por uma baixa concentração de glicose com o intuito de garantir um bom crescimento de biomassa e aprofundar os efeitos desse parâmetro sobre a produção de hidrogênio e ácidos orgânicos.

A média de eficiência de consumo de glicose para todas as etapas do processo foi superior a 90%. Em TDH de 8, 6, 4, 2, 1 h, as eficiências alcançaram 93,52 %, 92,06 %, 98,08 %, 97,13 % e 97,57%, respectivamente. A alta eficiência de consumo de glicose observada nesses sistemas pode ser atribuída aos elevados tempos de retenção de sólidos devido ao sistema de crescimento aderido que proporciona maior acúmulo de biomassa no sistema (Shida, 2008 apud Gavala et al., 2006). A diminuição do TDH de 8 para 1 h conduziu a um aumento na velocidade média de produção de volumétrica de hidrogênio de 0,28 L. h<sup>-1</sup>.L<sup>-1</sup> para 1,15 L. h<sup>-1</sup>.L<sup>-1</sup>, respectivamente. O rendimento de hidrogênio aumentou com a diminuição do TDH, de 1,84 mols H<sub>2</sub>.mol glicose<sup>-1</sup> no

TDH de 8 h para 2,29 mols de  $H_2$ .mol glicose<sup>-1</sup> no TDH de 2 h. Foram alcançados bons desempenhos de produção de hidrogênio sob condições de pH em torno de 4,0. Os maiores metabólitos solúveis foram o ácido butírico e o ácido acético com insignificante concentração de etanol.

Barros (2009) investigou a influência de diferentes materiais suporte na produção de hidrogênio (poliestireno (R1), pneu triturado (R2) e PET (R3)). No experimento foram utilizados três reatores anaeróbios de leito fluidizado, sendo estes alimentados com meio contendo glicose (4000 mg L<sup>-1</sup>) como principal fonte de carbono. A temperatura do reator foi mantida em 30 °C por meio de encamisamento do reator em banho termostaticado e, o pH afluente em torno de 7,0 e efluente em torno de 5,5.

O tempo de detenção hidráulica (TDH) avaliado foi entre 8 e 0,5 h, correspondendo a seis fases distintas de experimentos. As mudanças nas fases de operação ocorreram após a avaliação do desempenho de cada reator relacionando as eficiências de remoção de glicose, redução de DQO e produção de hidrogênio, além dos outros parâmetros monitorados como alcalinidade, ácidos voláteis totais e pH. Em todos os reatores, a produção volumétrica de hidrogênio e o conteúdo de  $H_2$  no biogás aumentaram com a redução do TDH de 8 para 1 h e o rendimento de produção de hidrogênio aumentou com a redução do TDH de 8 para 2 h.

O reator contendo pneu triturado como meio suporte apresentou o melhor rendimento de  $H_2$  (2,15 mol- $H_2$ .mol<sup>-1</sup>-glicose), o melhor conteúdo de  $H_2$  no biogás (52,97%), maior conversão de glicose (90%) e uma maior produção de ácidos acético e butírico (42% e 36,5%, respectivamente). Entretanto, o R3 foi melhor na produção volumétrica de  $H_2$ , 1,07 L h<sup>-1</sup>L<sup>-1</sup>. Isso se explica devido à rugosidade do pneu triturado ser maior visivelmente do que a dos demais materiais empregados. A taxa de carregamento orgânico teve relação com a produção volumétrica de hidrogênio em todos os reatores, o que sugere que mudanças no metabolismo dos microrganismos ocorrem quando há redução do TDH.

Os trabalhos de Bósio (2014), Ferreira (2014), Amorim (2009), Shida (2008) e Barros (2009), comprovaram a viabilidade do reator anaeróbio de leito fluidizado para a produção de biogás e metabólitos através de processos fermentativos realizados por culturas de microrganismos. Sendo assim, a utilização do RALF, combinado com condições ideais de pH, concentração de substrato, microrganismos, nutrientes e temperatura, apresenta elevado potencial para a produção biológica de ácido propiônico, 1,3-propanodiol e hidrogênio.

### 3.8 Considerações Finais

No cenário atual, as fontes energéticas provenientes dos combustíveis fósseis estão cada vez mais escassas, resultando na busca por novas fontes de energia. Como apresentado na revisão de literatura deste trabalho, a produção de biodiesel tem sido intensificada, pois se trata de uma fonte limpa e renovável.

O crescente aumento da produção de biodiesel pode acarretar no acúmulo de glicerol no meio ambiente se um destino correto para esse resíduo não for realizado. Dessa forma, a utilização do glicerol em processos fermentativos para a obtenção de produtos de interesse tem sido uma alternativa atrativa para o mesmo, visto que processos de purificação do glicerol são de custos elevados.

Através da combinação de tratamento de resíduo e geração de energia e produtos, compostos como ácido propiônico, 1,3-propanodiol e hidrogênio podem ser obtidos através da fermentação do glicerol bruto em reatores anaeróbios. Entretanto, poucos trabalhos são encontrados na literatura em que reatores anaeróbios de leito fluidizado são utilizados em processos que utilizam glicerol bruto. Contudo, a literatura mostra que o RALF apresenta potencial elevado para a produção de metabólitos em processos fermentativos visto que muitos trabalhos, que utilizam glicose como substrato, são encontrados. Além disso, essa configuração de reator é favorável a processos fermentativos já que é possível acumular grande quantidade de biomassa no sistema e otimizar a transferência de massa entre o substrato e o microrganismo.

Diante da escassez de pesquisas que visam à fermentação do glicerol em RALF para a obtenção de produtos, o presente trabalho tem o intuito de contribuir para o desenvolvimento de pesquisas relacionadas com a produção de ácido propiônico, 1,3-propanodiol, hidrogênio e outros metabólitos a partir de resíduos da produção de biodiesel. O rendimento da produção dos metabólitos foi analisado com variação do TDH entre 8 h e 0,5 h, em condições mesofílicas (30 °C) com pH em torno de 4,5. O reator foi alimentado com meio contendo glicerol na concentração de 5 g L<sup>-1</sup> e solução de nutrientes. O reator foi recheado com pneu triturado para imobilização da biomassa, no qual também foi avaliada a influência desse tipo de meio suporte no processo fermentativo.

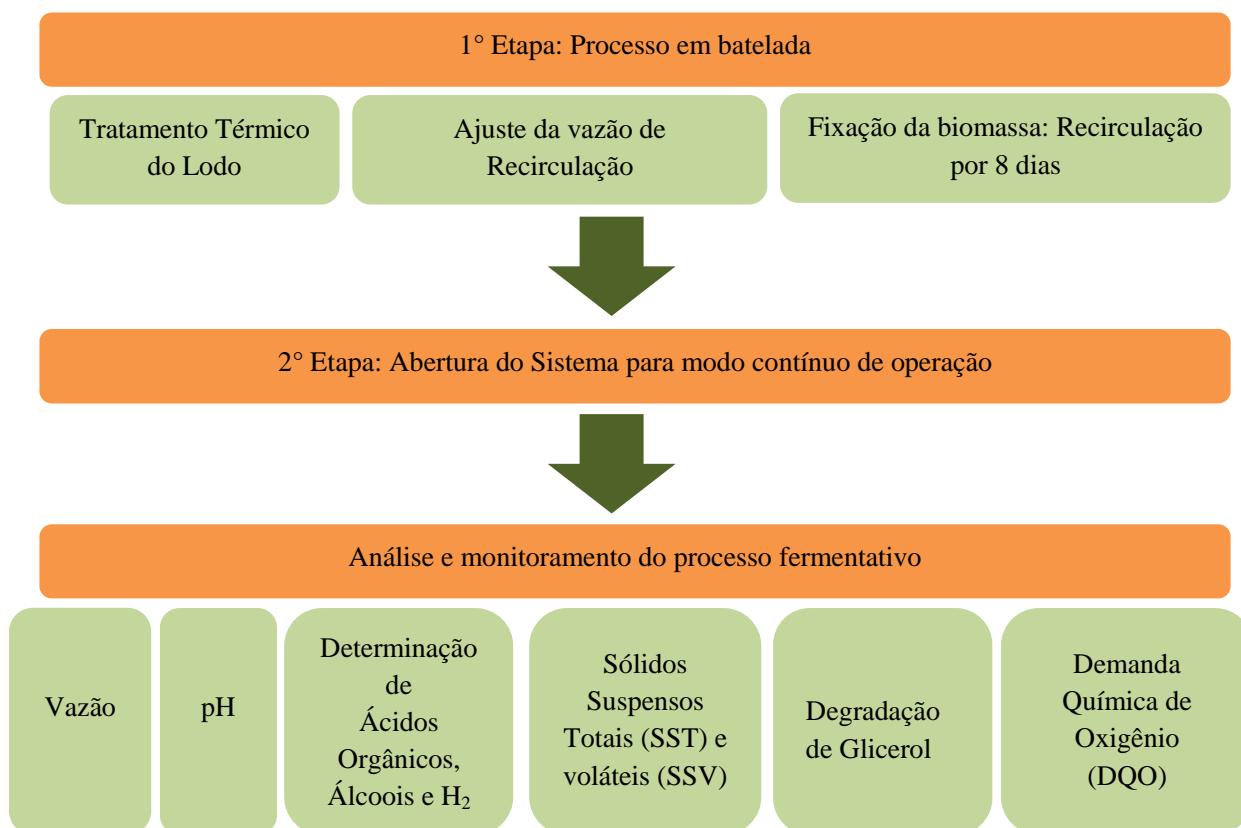
#### 4. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão apresentados o sistema experimental desenvolvido para a execução da parte experimental deste trabalho e os métodos adotados para a obtenção de dados durante a operação do reator. O fluxograma da etapa experimental é mostrado na Figura 4.1.

Com o intuito de produzir ácido propiônico, 1,3-propanodiol e hidrogênio, o reator foi operado em condições mesofílicas (30 °C), tendo pneu triturado como meio suporte para adesão da biomassa e glicerol bruto como fonte de carbono. Lodo proveniente de um reator UASB utilizado para tratar efluente de abatedouro de aves foi utilizado como inóculo.

O período de operação do reator foi distribuído em 6 fases (279 dias), sendo estas determinadas de acordo com a variação do tempo de detenção hidráulica (TDH), que foi entre 8 e 0,5 h.

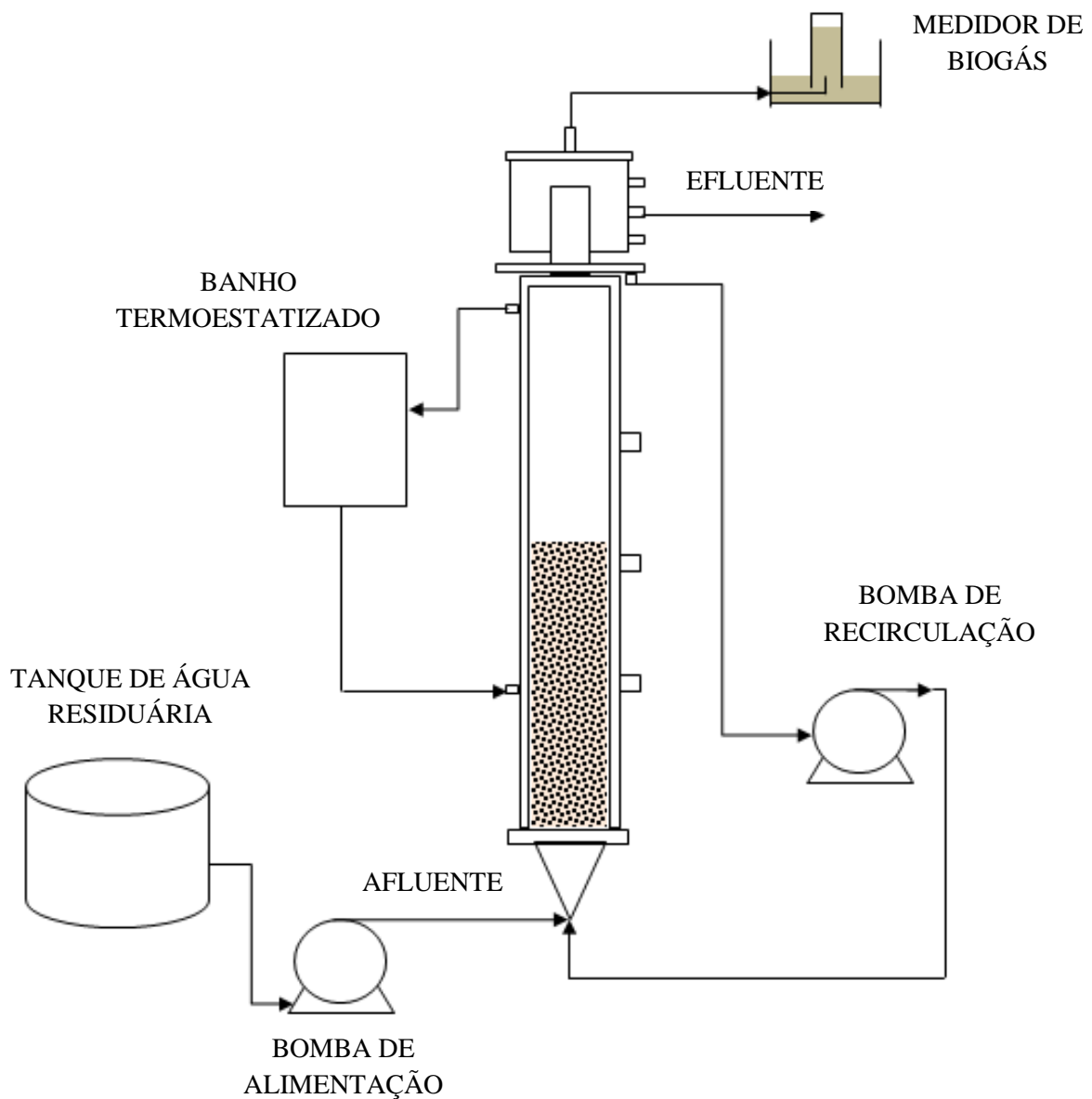
Figura 4-1: Fluxograma do procedimento experimental



#### 4.1 Reator anaeróbio de leito fluidizado (RALF)

O reator anaeróbio de leito fluidizado foi construído em acrílico transparente tendo 151 cm de altura, 5 mm de espessura, 3 cm de diâmetro interno e 1139 cm<sup>3</sup> de volume. A temperatura de 30 °C foi mantida com o auxílio de banho termostatizado e encamisamento do reator. A seguir tem-se o esquema da instalação experimental do processo (Figuras 4.2 e 4.3).

Figura 4-2: Esquema da instalação experimental do reator anaeróbio de leito fluidizado



A instalação experimental funcionava com a alimentação pela parte inferior do reator juntamente com a parcela de líquido proveniente da recirculação do sistema. A mistura de líquido ascendia pelo leito de partículas de pneu triturado até alcançar a parte superior do reator onde o biogás produzido era coletado e, parte do efluente era descartada e o restante seguia para a bomba de recirculação.

Figura 4-3: **Reator anaeróbio de leito fluidizado mesofílico**



#### 4.2 Material suporte

O material suporte utilizado para garantir a adesão dos microrganismos dentro do reator foi o pneu triturado inservível, como mostrado na Figura 4.4. Através do peneiramento de partículas, o pneu foi selecionado com granulometria entre 2,80 e 3,35 mm. As características como densidade, velocidade de mínima fluidização e rugosidade



da partícula foram determinadas de acordo com o método proposto por Aguiar (1995), sendo descritas na Tabela 4.1.

Figura 4-4: Material suporte (pneu triturado inservível)



As partículas de pneu inservível triturado foram tratadas de acordo com a metodologia proposta por Barros (2012). As partículas foram colocadas em solução de hidróxido de sódio 7,5 mM durante 30 minutos. Posteriormente estas foram lavadas com água e secas em estufa a 40 °C. Esse procedimento foi realizado três vezes com o intuito de retirar os resíduos de óleo encontrados nas partículas.

Tabela 4-1: Dimensão, densidade e velocidade de mínima fluidização para a partícula de pneu.

<b>Características da Partícula de Pneu</b>	
Forma	Irregular
Tamanho da Partícula (mm)	2,8 – 3,35
Densidade da partícula (g. cm <sup>-3</sup> )	1,14
Velocidade de mínima fluidização (cm.s <sup>-1</sup> )	1,18

O reator foi preenchido com 223 g de pneu, o que corresponde a uma altura de 51 cm (leito empacotado), representando 1/3 da altura do reator.

#### 4.3 Condições hidrodinâmicas

A partir das dimensões estabelecidas para o reator e de dados experimentais de velocidade de mínima fluidização para as partículas de pneu, foi calculada a vazão de

recirculação necessária para garantir a fluidização do sistema e elevar o grau de mistura entre biomassa e substrato dentro do reator. A vazão de recirculação necessária para que o reator atingisse as condições de fluidização correspondeu a 41,4 L h<sup>-1</sup>. Esse valor é 1,3 vezes maior do que a velocidade de mínima fluidização da partícula.

#### 4.4 Água residuária sintética

O sistema foi alimentado com água residuária sintética composta por glicerol na concentração de 5000 mg L<sup>-1</sup> (fonte de carbono) e nutrientes existentes no LCA-II para suprir as atividades metabólicas dos microrganismos.

O barrilete de alimentação, com composição mostrada na Tabela 4.2, foi preparado diariamente e, devido à elevada viscosidade do glicerol, foi necessário o aquecimento prévio deste para facilitar a sua homogeneização com a água e os nutrientes. Além disso, com o intuito de garantir o controle do pH no reator na faixa de 4 a 5, ácido clorídrico 30 % foi adicionado no barrilete de alimentação. A composição do meio foi de acordo com o meio proposto por Del Nery (1987), com modificações.

Tabela 4-2: Composição da água residuária sintética

Composto	Concentração (mg L <sup>-1</sup> )
Glicerol	5000
Uréia	125,0
Sulfato de níquel	1,0
Sulfato ferroso	5,0
Sulfato férrico	0,5
Cloreto de cálcio	47,0
Cloreto de cobalto	0,08
Óxido de selênio	0,07
Fosfato de potássio monobásico	85,0
Fosfato de potássio dibásico	1521,7
Fosfato de sódio dibásico	33,4
Cloreto de Amônio	2000

Fonte: Del Nery (1987), adaptada.

O glicerol utilizado no experimento foi proveniente da BioVerde Indústria e Comércio de Biocombustíveis S.A., localizada na cidade de Taubaté - SP. As características e especificações do glicerol são mostradas na Tabela 4.3.

Tabela 4-3: Especificações do Glicerol utilizado no experimento

<b>Parâmetros</b>	<b>Unidades</b>	<b>Valores</b>
<b>Especificação</b>		
Teor de Água	%	0,8
Glicerol Total	%	64,3
Aparência	–	Líquido Viscoso escuro
Sais	–	Sulfato de Sódio e Cloreto de Sódio
Teor de Ácido graxo total	%	22,1
<b>Valores Informativos</b>		
Ponto de Fugor	°C	110
Fluidez	°C	Fluído à 40 °C
Densidade aparente (30 °C)	g.ml <sup>-1</sup>	1,12
pH	–	8
Ponto de ebulição	°C	290 à 1 atm
Ponto de Fusão	°C	18 à 30

Fonte: Adaptada de BIOVERDE (Indústria e Comércio de Biocombustíveis S.A., (2012).

#### 4.5 Inóculo

O reator foi inoculado com lodo proveniente de reator mesofílico anaeróbico de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB) utilizado para tratamento de efluente de abatedouro de aves. O lodo foi submetido a um tratamento térmico que, de acordo com Kim et al (2006), consiste no aquecimento do mesmo a uma temperatura de 90 °C durante dez minutos seguido de banho de gelo até atingir 25°C. Esse processo tem o intuito de inibir a presença de microrganismos consumidores de hidrogênio, como as arqueias metanogênicas.

#### 4.6 Procedimento de partida do reator

O procedimento de operação do reator se iniciou com a etapa de inoculação do sistema que consistiu na preparação de um barrilete de inoculação que continha uma

solução de glicerol, nutrientes de acordo com Del Nery (1987) e lodo tratado (10% do volume total do barrilete). O pH do barrilete foi ajustado a 4,5 adicionando pequenas alíquotas de HCl 30%. Além disso, gás nitrogênio foi adicionado no barrilete e no topo do reator durante 10 minutos com o intuito de remover oxigênio dissolvido no líquido para garantir a anaerobiose do sistema.

O sistema foi operado durante oito dias em circuito fechado (batelada). Nesta etapa monitoraram-se as concentrações de glicerol do inóculo retirando-se amostras periódicas para análise e, à medida que o glicerol era consumido pelos microrganismos, adicionava-se o mesmo no sistema para atingir novamente a concentração correspondente a 5000 mg L<sup>-1</sup> de glicerol no barrilete de inoculação. Após a verificação de um consumo constante de glicerol no barrilete (após 8 dias) o sistema foi aberto, passando assim a operar em modo contínuo.

#### 4.7 Métodos analíticos

##### 4.7.1 Composição e produção volumétrica do biogás

O método de determinação do biogás produzido foi feito através de cromatografia gasosa, utilizando o cromatógrafo gasoso Shimadzu GC-2010, Japan. O equipamento era composto por uma coluna capilar Carboxen 1010 PLOT (30 m x 0,53 mm) e detector de condutividade térmica (DCT). A temperatura do injetor e do detector foi mantida em 220 e 230 °C, respectivamente. O gás de arraste utilizado foi o argônio, com vazão de 5,6 mL min<sup>-1</sup>. O volume de amostra injetado foi de 500 µL.

No procedimento, uma amostra de gás foi coletada no topo do reator com uma seringa “gás tight” com trava e injetada no equipamento para o mapeamento dos componentes.

A produção volumétrica do biogás gerado foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Walker et al. (2009).

##### 4.7.2 Determinação da concentração do glicerol

A quantificação do glicerol no afluente e no efluente do processo foi determinada através de metodologia adaptada pela técnica espectrofotométrica proposta por Bondioli e Bella (2005).

#### 4.7.3 Demais análises físico-químicas

A demanda química de oxigênio (DQO), sólidos suspensos totais e voláteis, e pH, foram analisados com base no Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (1998).

#### 4.7.4 Determinação de Ácido propiônico, 1,3-propanodiol, etanol e ácidos orgânicos voláteis

A determinação de Ácido propiônico, 1,3-propanodiol, etanol e ácidos orgânicos voláteis foi realizada através de cromatografia líquida utilizando HPLC. O cromatógrafo foi equipado com duas bombas HPCL (W515), um injetor automático com refrigeração (W717), um módulo de controle de temperatura (WATERS) e um detector de UV (W486) e IR (W410).

As condições de operação dos equipamentos foram as seguintes:

- Temperatura do injetor: 4 °C.
- Temperatura de separação: 65 °C.
- Detecção dos compostos:  $\lambda=210$  nm.
- Operação do sistema de bombeamento: isocrático
- Vazão da fase móvel: 0.6 mL min<sup>-1</sup>
- Coluna Aminex HPX-87H
- Fase móvel H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,005M

Foram injetados 20 µL de amostra durante o procedimento. A curva de calibração para ambos os compostos, bem como as amostras, foram diluídas de modo que as concentrações das mesmas ficassem entre o ponto de mínimo e o ponto de máximo da curva de calibração.

#### 4.7.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise de microscopia eletrônica de varredura teve por objetivo identificar a presença de microrganismos aderidos no meio suporte bem como a morfologia dos mesmos. No procedimento de análise, as amostras retiradas do reator foram imediatamente lavadas em solução de glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1 M e

pH 7,3 com o intuito de serem fixadas. As partículas submersas na solução descrita foram levadas a geladeira durante 12 h. Posteriormente foram lavadas com solução tampão fosfato 0,1 M e pH 7,3 por três vezes durante 10 minutos, seguindo-se da desidratação das amostras por etanol pelo uso de soluções: 50, 70, 80, 90 e 95 % durante dez minutos em cada solução. Finalizou-se a desidratação lavando com solução de etanol 100% por três vezes durante 10 minutos. Por fim, as amostras foram fixadas no suporte para “MEV” e levadas a estufa com temperatura inferior a 40 °C por 2 h. Após o preparo das amostras, estas foram submetidas à observação em microscópio eletrônico. O aparelho utilizado foi o Digital Scanning Microscope DSM 960, da empresa Zeiss West Germany. O equipamento encontra-se no Instituto de Física de São Carlos – USP.

#### 4.8 Frequências de Análises

O reator foi monitorado durante 279 dias de operação, no qual as análises realizadas durante esse período são mostradas na Tabela 4.4.

Tabela 4-4: **Frequência de análises de monitoramento do reator**

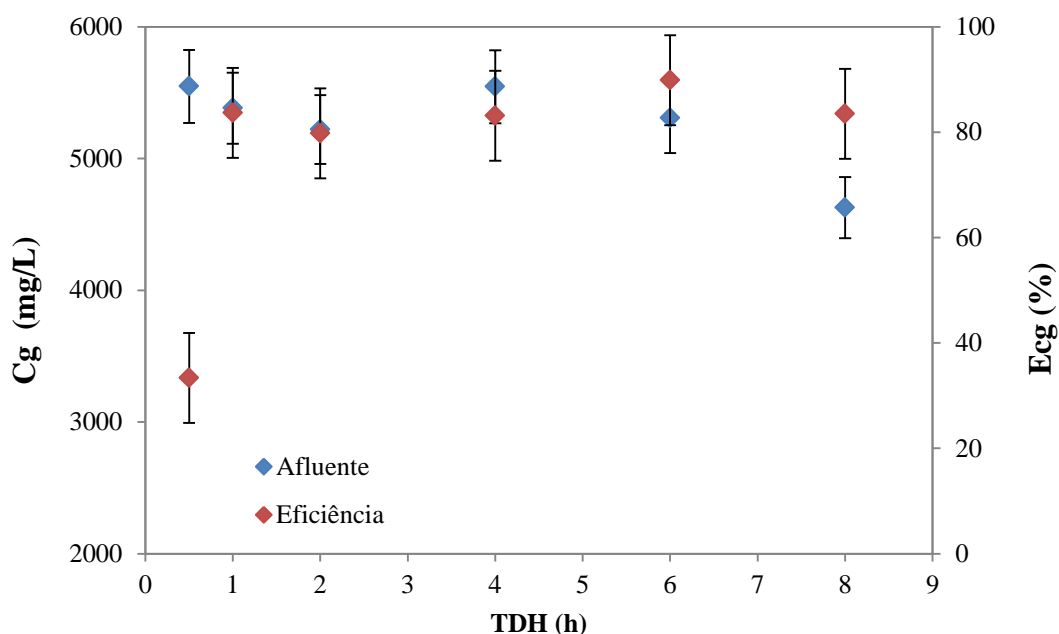
<b>Análise</b>	<b>Frequência</b>
pH	Diária
Glicerol bruto	3x semana
DQO	3x semana
Ácidos orgânicos voláteis	3x semana
Conteúdo do biogás (H <sub>2</sub> , N <sub>2</sub> e CO <sub>2</sub> )	3x semana
Produção de H <sub>2</sub>	3x semana
ST, SST, SSV	3x semana
Vazão	Diária

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Conversão de glicerol

A eficiência de conversão de glicerol se mostrou bastante elevada durante cinco fases de operação deste trabalho, tendo atingindo o maior valor de conversão de  $89,8 \pm 2 \%$  no TDH de 6 h. Nota-se, na Figura 5.1, que ocorreu um aumento na eficiência de consumo de glicerol entre o TDH de 8 e 6 h (de  $83,5 \%$  para  $89,8 \%$ ), seguido de uma diminuição no TDH de 4 h ( $83,1 \%$ ), mantendo uma certa estabilidade de valores no TDH de 2 e 1 h. Efeito não semelhante foi notado na última fase (TDH de 0,5 h) no qual a eficiência de conversão de substrato caiu bruscamente para o valor médio de  $33,3\%$ .

Figura 5-1: Concentrações e conversões médias de glicerol em função do TDH



Ferreira (2014) verificou que em baixos TDH, a queda de conversão de substrato deve-se à dificuldade de permanência dos microrganismos em uma alta taxa de carregamento orgânico (TCO).

Os valores médios de concentração de afluente e efluente, bem como a eficiência de conversão de substrato para todas as fases de operação deste trabalho são apresentados na Tabela 5.1.

Tabela 5-1: Valores médios de conversão e concentração em função do TDH

TDH	Glicerol afluente (mg L <sup>-1</sup> )	Glicerol efluente (mg L <sup>-1</sup> )	Eficiência %
8	4627 ± 280	786 ± 55	83,5 ± 1,5
6	5307 ± 375	540 ± 175	89,8 ± 2,1
4	5544 ± 395	833 ± 177	83,1 ± 2,9
2	5220 ± 229	1544 ± 108	79,7 ± 4,4
1	5381 ± 88	878 ± 109	83,6 ± 1,8
0,5	5547 ± 277	3698 ± 272	33,3 ± 2,0

Ito et al. (2005) também constataram elevada eficiência de remoção de substrato. Os pesquisadores estudaram a produção de hidrogênio e etanol utilizando glicerol (10 g L<sup>-1</sup>) e *Enterobacter aerogenes* HU-101, isolada de lodo metanogênico. As células foram cultivadas anaerobicamente a 37 °C e com pH inicial de 6,8. Extrato de levedura e triptona foram adicionados ao meio para acelerar a produção de H<sub>2</sub> e etanol. Os autores verificaram que rendimentos de H<sub>2</sub> e etanol decresceram com o aumento da concentração de glicerol bruto e puro no meio. Além disso, as taxas de produção de H<sub>2</sub> e etanol a partir do glicerol bruto foram muito menores que as taxas de produção de H<sub>2</sub> ao utilizar glicerol puro com mesma concentração. Tal fato foi atribuído ao elevado conteúdo de sais no resíduo que podem inibir o crescimento celular. No desenvolvimento da pesquisa, os autores utilizaram reator de leito fixo com cultura contínua auto-imobilizada e imobilizada em material suporte. Utilizando células imobilizadas em material suporte, o consumo de glicerol apresentado pelos pesquisadores foi de aproximadamente 99% para os TDH de 0,8, 1,5 e 2,2 h. Ao utilizar leito auto-imobilizado, o consumo de glicerol decresceu em função do aumento da taxa de diluição. Para os TDH de 10, 5, 2,5 e 2 h, o consumo de glicerol constatado foi de, aproximadamente, 95, 92, 85 e 82%, respectivamente.

Resultados semelhantes foram obtidos no trabalho de Bósio (2014) que avaliou a produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidizado tendo glicerol como fonte de carbono (5 g L<sup>-1</sup>), utilizando argila expandida como meio suporte para a imobilização da biomassa em condições mesofílicas. A autora obteve valores de



conversão de substrato entre 91 e 86 % para os TDH entre 14 e 4 h. Já no TDH de 1 h, o resultado atingido de conversão de glicerol foi de 37%.

Ferreira (2014), que estudou a produção de hidrogênio através da fermentação do glicerol ( $5 \text{ g L}^{-1}$ ) no mesmo tipo de reator (RALF) em condições termofílicas, obteve valores relativamente menores. Entre os TDH de 8 e 2 h, a conversão de substrato atingida foi entre 45,9 e 36,6 %. No TDH de 1 h, Ferreira obteve 15,8 % de consumo de substrato. O pesquisador relata que baixa eficiência de conversão de substrato é característica de biorreatores sob condições termofílicas.

Poucos trabalhos são encontrados na literatura que visam à fermentação do glicerol para a obtenção de  $\text{H}_2$  e metabólitos em reator anaeróbio de leito fluidizado. Grande parte dos trabalhos reportados com tal objetivo foi executada em reatores em batelada. Dessa forma, como comparativo, pode-se citar o estudo de De Sá (2011), que avaliou a produção de hidrogênio em batelada a partir de diferentes substratos, sendo um deles o glicerol puro. As condições de processo adotadas foram de  $10 \text{ g L}^{-1}$  de glicerol, pH 5.5 e temperatura de  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ . A autora constatou que a degradação do glicerol através de cultura mista de microrganismos foi de 97%, em 72 h de fermentação.

Lo et al. (2013) estudaram a produção de  $\text{H}_2$  a partir de glicerol bruto e puro utilizando *C. pasteurianum*. O experimento ocorreu em batelada e em reator de tanque agitado, tendo como principal objetivo a investigação de condições ótimas para a produção de  $\text{bioH}_2$ . As condições operacionais adotadas foram: temperatura,  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ ; TDH, 12 h; pH sem controle (inicial entre 5 e 9); concentração de glicerol,  $10 \text{ g L}^{-1}$ . Quando glicerol puro foi utilizado como fonte de carbono para a produção de  $\text{H}_2$  em modo contínuo (reator de tanque agitado), o rendimento de  $\text{H}_2$  foi de  $0,5 \text{ mol/mol}$ . Enquanto que, ao utilizar glicerol bruto o rendimento foi de  $0,77 \text{ mol/mol}$ . Os autores constataram também que a conversão de glicerol foi entre 98,4 e 100%.

Gonen et al. (2013) estudaram a produção de 1,3-propanodiol em reator de leito fixo utilizando glicerol, com concentração de  $45 \text{ g L}^{-1}$ , como fonte de carbono e *Clostridium beijerinckii* NRRL B-593. Os autores avaliaram a influência de dois tipos de material suporte empregados (anéis de Raschig-R1 e esferas de vidro-R2) e do TDH, que foi variando entre 2 e 16 h. No TDH de 8 h o consumo de glicerol para o reator R1 e reator R2 foi de 100%. No TDH de 6 h o consumo de glicerol foi de 100% para o R2 e 93% para o R1. Já para o TDH de 4 h o consumo caiu nos dois reatores, com valores de 80% para o R2 e 83% para o R1, apresentando certa estabilidade de valores no TDH de

2 h, com valores médios de 75% para os dois meio suportes empregados. O reator foi operado com pH entre 6 e 6,5 e com temperatura de 37 °C.

Gungormusler et al. (2013) estudaram a produção de 1,3-propanodiol a partir de glicerol bruto com concentração de 40 g L<sup>-1</sup>, imobilizando *Klebsiella pneumoniae* em reator de leito fixo. Três diferentes meio suportes foram testados no processo (fios de aço inoxidável, anéis de raschig e Vukopor<sup>®</sup>- filtro de cerâmica), sendo que o reator preenchido com fios de aço inoxidável apresentou a maior produtividade enquanto que o preenchido com anéis de raschig apresentou a maior concentração de 1,3-propanodiol (17,9 g L<sup>-1</sup>). A temperatura nos biorreatores foi mantida em 37 °C e o pH inicial foi ajustado para 7 e monitorado constantemente, porém sem realizar o controle do mesmo. O efeito do TDH (16, 12, 8, 6, 4, 2, 1 e 0,5 h) e diferentes meio suportes no crescimento celular e na produtividade de 1,3-propanodiol foi o objetivo principal do trabalho. A máxima conversão de glicerol alcançada foi de 71 % quando Vukopor<sup>®</sup> atuou como meio suporte. No TDH de 1 h, o consumo de substrato foi de 40 %, 59 % e 81 %, para anéis de raschig, VUK e fios de aço inoxidável, respectivamente.

De acordo com os trabalhos citados neste tópico de conversão de substrato, pode-se notar que, em relação aos trabalhos operados em modo contínuo, o consumo de glicerol do trabalho em questão está próximo aos valores encontrados na literatura. A Tabela 5.2 mostra a comparação do presente trabalho com outros reportados na literatura.

**Tabela 5-2:** Comparação entre o trabalho atual e os reportados na literatura em relação à conversão de glicerol

Glicerol (g L <sup>-1</sup> )	Temperatura (°C)	pH	Tipo de reator	Conversão Média	Referências
10	37	6,8	Leito Fixo*	TDH 10 – 2 h: 88,5 %	Ito et al. (2005)
10	35	5,5	Batelada**	97% em 72 h	De Sá (2011)
40	37	Inicial: 7	Leito Fixo*	TDH 1 h: 81%	Gungormusler et al. (2013)
45	37	6,5	Leito Fixo*	TDH 8 – 6 h: 100% TDH 4 h: 80 % TDH 2 h: 75 %	Gonen et al. (2013)
10	35	Inicial: 5	CSTR*	TDH 12 h: entre 99,2%	Lo et al. (2013)

**Tabela 5-2:** Comparação entre o trabalho atual e os reportados na literatura em relação à conversão de glicerol (Continuação)

Glicerol (g L <sup>-1</sup> )	Temperatura (°C)	pH	Tipo de reator	Conversão Média	Referências
5	37	4,5	Leito Fluidizado **	TDH 14 – 4 h: 89 % TDH 1 h: 37 %	Bósio (2014)
5	55	4,5	Leito Fluidizado**	TDH 8 – 2 h: 41,2 % TDH 1 h: 15,8 %	Ferreira (2014)
5	30	4,5	Leito Fluidizado**	TDH 8 – 1 h: 83,9 % TDH 0,5 h: 33 %	Neste trabalho

\*Cultura pura; \*\* Cultura mista.

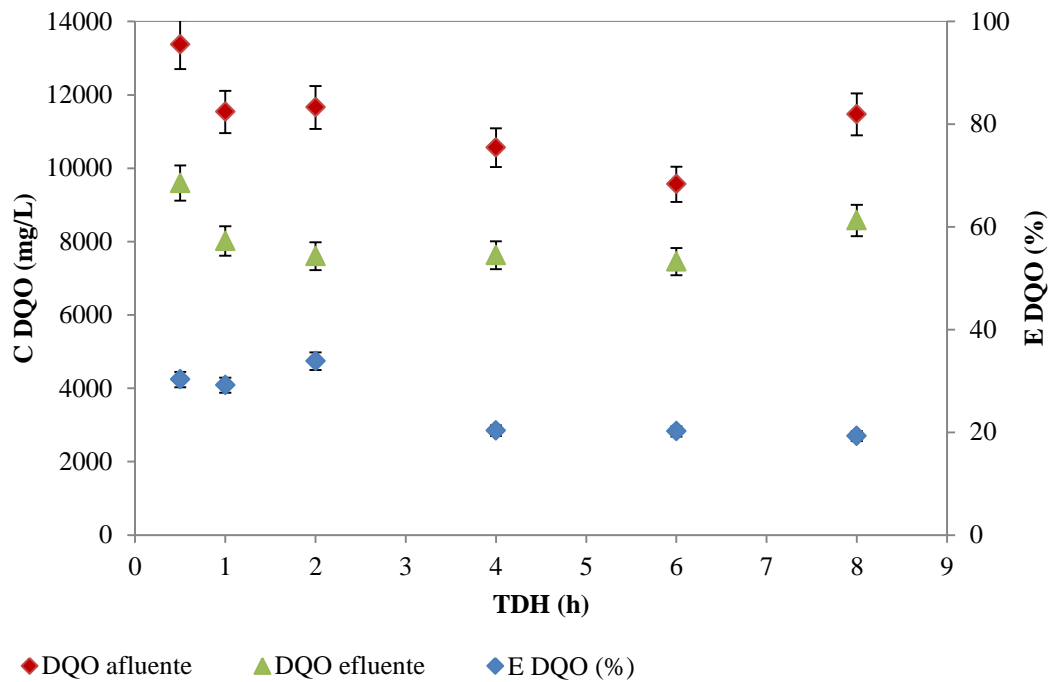
## 5.2 Redução de DQO

Processos que visam o tratamento de efluentes necessitam de parâmetros que indiquem a quantidade de matéria orgânica presente neste. Dessa forma, a DQO possui papel fundamental, pois através dela é possível medir o consumo de oxigênio durante a oxidação química da matéria orgânica sendo, portanto, uma indicação indireta de teor de matéria orgânica. Diante disto, uma redução elevada de DQO em águas residuárias industriais, por exemplo, tem sido o objetivo de muitas pesquisas encontradas na literatura.

Estudos têm sido realizados no qual, através de processos fermentativos, a produção de H<sub>2</sub> e outros metabólitos tem ocorrido juntamente com a redução de DQO. Entretanto, geralmente, baixos valores de redução de DQO são alcançados nesses processos já que, tal fato, é característica de reatores acidogênicos.

O reator operado no presente trabalho possuía uma redução de DQO média, para todas as fases operadas, de 25,5%. Na Figura 5.2 pode-se notar que entre o TDH de 8 e 6 h, um pequeno aumento de remoção ocorreu (0,94%). Já entre o TDH de 4 e 6 h houve um aumento significamente maior (5,7%). O máximo valor de redução atingindo foi de 34,7 % (TDH de 2 h) e o mínimo foi de 22% (TDH de 6 h).

Figura 5-2: Redução de DQO em função do TDH



Bósio (2014), que utilizou cultura mista de microrganismos em RALF tendo glicerol bruto como fonte de carbono, obteve uma redução média por fase de DQO de 23 e 22% para os respectivos TDH de 8 e 6 h, o que mostra um resultado bastante semelhante ao encontrado no presente trabalho. Entretanto, para os TDH de 4 e 2 h, a redução registrada foi de 18%, seguido de uma queda para 9% no TDH de 1 h. A pesquisadora afirma que esta diminuição de DQO é esperada já que a mesma se encontra vinculada a remoção de glicerol.

Resultados diferentes foram atingidos por Ferreira (2014), que obteve valores médios de redução de DQO entre 17,7 e 13,6 % para os TDH entre 8 e 4 h. E, semelhante ao trabalho de Bósio (2014), houve uma diminuição de eficiência de redução de DQO nos TDH de 2 (10,4%) e 1 h (11%). Essa diferença nos valores de redução deve-se ao fato das condições termofílicas adotada por Ferreira, já que este é um dos parâmetros diferenciais entre os dois trabalhos citados.

A redução de DQO no reator granular de leito expandido também exposto no trabalho de Bósio (2014) foi entre 27 e 17% para o TDH entre 8 e 4 h, respectivamente. Nesta pesquisa, Bósio avaliou a produção de hidrogênio e metabólitos em reator granular de leito expandido tendo glicerol bruto ( $5 \text{ g L}^{-1}$ ) como fonte de carbono na temperatura de  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Poucos trabalhos encontrados na literatura que visam à produção de H<sub>2</sub> e metabólitos a partir do glicerol apresentam valores de redução de DQO, já que esta redução não é o objetivo destes trabalhos. Dessa forma, para efeitos comparativos, podem-se citar trabalhos que tinham por objetivo a produção de H<sub>2</sub> e metabólitos em RALF utilizando glicose como fonte de carbono. Estes trabalhos apresentam comportamento semelhante aos trabalhos citados anteriormente e ao estudo em questão, como, por exemplo, o caso de Reis e Silva (2011) que avaliaram a produção de H<sub>2</sub> em reator anaeróbico de leito fluidizado utilizando cultura mista de microrganismos. Os autores obtiveram remoção máxima de DQO (30%) no TDH de 6 h e remoção de 25% nos TDH de 8 e 4 h.

Shida (2008), que também utilizou glicose como substrato, avaliou a produção biológica de H<sub>2</sub> e ácidos orgânicos em reator anaeróbico de leito fluidizado com temperatura de 30°C e pH 3,8, variando o TDH entre 8 e 1 h. A autora constatou que não houve variação significativa de redução de DQO em todos os TDH operados. No TDH de 8 h houve uma eficiência média de remoção de 23,98 % enquanto que no TDH de 6 e 4 h, a redução foi de 24,9 % e 27,3 %, respectivamente.

Na Tabela 5.4 são mostradas as concentrações de DQO do afluente e do efluente bem como a porcentagem de redução constatada no presente trabalho.

Tabela 5-3: **Concentração e eficiência de redução de DQO em função do TDH**

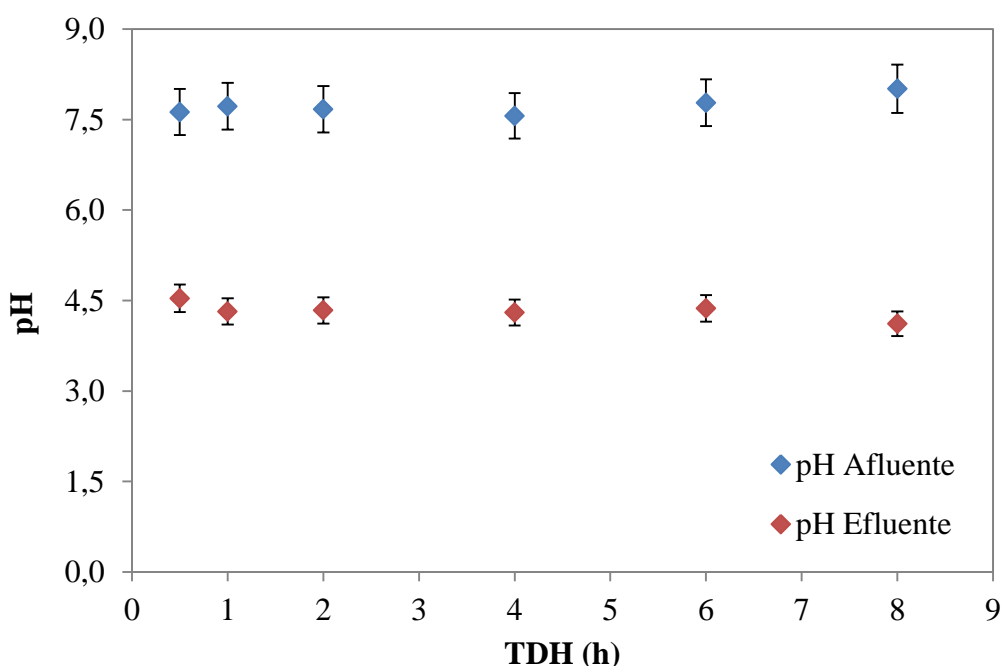
TDH	DQO Afluente (mg L <sup>-1</sup> )	DQO Efluente (mg L <sup>-1</sup> )	Eficiência (%)
8	11466 ± 271	8578 ± 398	19,2 ± 1,4
6	9562 ± 149	7455 ± 243	20,2 ± 2,6
4	10561 ± 216	7627 ± 315	20,3 ± 2,1
2	11656 ± 202	7603 ± 278	33,8 ± 1,9
1	11536 ± 277	8015 ± 396	29,2 ± 2,2
0,5	13372 ± 351	9593 ± 167	30,3 ± 1,6

### 5.3 Variação do pH

De acordo com Ntaikou et al. (2010), ao utilizar cultura mista de microrganismos é necessário controlar as condições de cultivo, como o pH, de modo a direcionar o metabolismo para a geração do produto desejado. Dessa forma, o controle do pH no experimento foi realizado com a adição de ácido clorídrico 30% no barrilete de alimentação.

A Figura 5.3 mostra o comportamento dos valores de pH do afluente e do efluente durante todas as fases de operação do reator. O máximo valor de pH afluente constatado foi de 8,01 no TDH de 8 h e o valor mínimo apresentado foi de 7,56, no TDH de 4 h. É possível observar também que o sistema operou sem grandes variações de pH do afluente e do efluente, demonstrando assim boas condições de tamponamento.

Figura 5-3: Valores médios de pH afluente e efluente em função do TDH



Com relação aos valores de pH do efluente, nota-se que ocorreu uma variação entre 4,12, para o TDH de 8 h, e 4,54, para o TDH de 0,5 h. Observar-se que estes valores encontram-se próximo ou abaixo de 4,5, podendo ser justificado devido a formação de ácidos orgânicos. Outro aspecto importante é que mantendo o sistema com pH em torno de 4,5, a atividade das bactérias acidogênicas é favorecida e ao mesmo

tempo, a inibição das arqueas metanogênicas é concretizada (Mohan et al., 2007). Valores médios de pH afluente e efluente do presente estudo são mostrados na Tabela 5.5.

Tabela 5-4: Valores de pH afluente e efluente em função do TDH

TDH	pH Afluente	pH efluente
8	8,01 ± 0,31	4,12 ± 0,20
6	7,78 ± 0,20	4,37 ± 0,10
4	7,56 ± 0,11	4,30 ± 0,08
2	7,67 ± 0,15	4,34 ± 0,32
1	7,72 ± 0,13	4,32 ± 0,10
0,5	7,63 ± 0,12	4,54 ± 0,18

Ito et al. (2005) operaram reator de leito fixo com células imobilizadas em material suporte e células auto-imobilizadas. Como mencionado anteriormente, as condições de operação adotadas foram de 10 g L<sup>-1</sup>, temperatura de 37 °C e pH inicial de 6,8. Os principais metabólitos obtidos foram: etanol, 1,3-propanodiol, lactato, formato e acetato. O etanol foi o metabólito obtido em maior concentração, seguido de 1,3-propanodiol. Com relação ao presente estudo, o principal metabólito obtido foi o ácido propiônico, seguido de 1,3-propanodiol. Apenas pequenas quantidades de etanol foram detectadas. As diferenças de rotas metabólicas favorecidas entre os estudos devem-se a distintas condições operacionais entre os dois processos, inclusive a diferença de pH do sistema, já que no estudo realizado por Ito, o pH inicial adotado foi de 6,8 (sem controle) e o do presente trabalho foi 4,5 (controlado).

Gonen et al. (2012) estudaram a produção de 1,3-propanodiol em reator de leito fixo a partir de glicerol bruto (40 g L<sup>-1</sup>), utilizando diferentes materiais suporte para imobilização de *Klebsiella pneumoniae*. Diferentes TDH foram adotados (entre 0,5 e 16 h) e a temperatura foi mantida constante em 37 °C. Nesse estudo o pH foi monitorado para estar entre 6 e 7 ao longo de todo o experimento e os autores observaram que o pH tende a diminuir, especialmente durante condições de longos TDH. Esse fato deve-se, possivelmente, a menor capacidade de tamponamento do afluente (com baixa taxa de fluxo) e a elevada concentração de ácidos-graxos. Os principais metabólitos obtidos, além do 1,3-propanodiol, foram: 2,3-butanodiol, ácido acético e etanol, que se

diferenciam do estudo em questão devido as diferentes condições operacionais adotadas.

Bósio (2014) constatou valores de pH do efluente em torno de 4 e 5, sendo estes justificados pelo controle de pH do afluente e com a formação de ácidos orgânicos no RALF. No reator EGSB, que também tinha glicerol como substrato, os resultados atingidos foram similares. O principal metabólito obtido em todos os TDH adotados no RALF e no EGSB foi o 1,3-propanodiol, seguido de etanol e, posteriormente, ácido propiônico. Nota-se que os principais metabólitos obtidos no trabalho de Bósio foram semelhantes aos obtidos no presente trabalho. Tal fato pode ser justificado devido à semelhança das condições operacionais entre os dois trabalhos, visto que o diferencial entre estes é o material suporte utilizado. Sendo assim, pode-se supor que o pneu favorece a colonização de bactérias produtores de ácido propiônico e a cinasita, utilizada no trabalho de Bósio, favorece as bactérias produtoras de 1,3-propanodiol e etanol.

Ferreira (2014) manteve o controle do pH afluente durante todas as fases de operação do RALF, direcionando-o para valores entre 6 e 7. Os valores de pH do efluente obtidos se mantiveram em torno de 4,4 e 5,1. Os principais metabólitos detectados no experimento foi 1,3-propanodiol, ácido butírico e etanol. Ferreira obteve baixas concentrações de ácido propiônico em relação aos principais metabólitos obtidos em sua pesquisa. Em todas as fases de operação, as concentrações de ácido propiônico atingiram valores que representavam, aproximadamente, 10% da concentração dos principais metabólitos obtidos. Tal fato pode ser atribuído às condições termofílicas adotadas pelo pesquisador.

Chookaew et al. (2014) produziram hidrogênio a partir de glicerol bruto em reator granular de manta de lodo (UASB), imobilizando a *Klebsiella sp. TR17*. O reator foi operado em 40 °C com pH inicial de 8, variando o TDH entre 2 e 12 h, e a concentração de glicerol entre 10 e 30 g L<sup>-1</sup>. O principal metabólito solúvel obtido foi o 1,3-propanodiol, que teve sua concentração reduzida em função da diminuição do TDH para as três concentrações de glicerol empregadas. Os resultados mostraram também que o pH aumentou em função da diminuição do TDH. Para o TDH de 12, 10, 8, 6, 4 e 2, o pH médio para as três concentrações de glicerol empregadas foi de 5.3, 5.6, 6.2, 5.8, 6.5 e 6.25, respectivamente.

Reungsang et al. (2013a) avaliaram a produção de hidrogênio em reator UASB utilizando *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, tendo glicerol bruto (25 g L<sup>-1</sup>) como



substrato. A taxa de carregamento orgânico foi otimizada com o intuito de maximizar a taxa de produção de hidrogênio. A condição ótima de TCO encontrada foi de 50 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, gerando um conteúdo de H<sub>2</sub> máximo de 24,3 % para glicerol bruto. Nas três taxas de carregamento orgânico empregadas de 37.5, 50 e 62.5 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, o pH obtido foi de 4.56, 4.3 e 5, respectivamente. Os principais metabólitos obtidos foram: etanol, 1,3-propanodiol, ácido fórmico e ácido acético.

#### 5.4. Produção de ácido propiônico, 1,3-propanodiol, hidrogênio e outros metabólitos

Na Tabela 5.6 estão apresentados os principais metabólitos obtidos durante a etapa experimental, variando-se o TDH. Os principais metabólitos obtidos foram: ácido propiônico, 1,3-propanodiol, etanol, ácido acético, ácido butírico e ácido isobutírico.

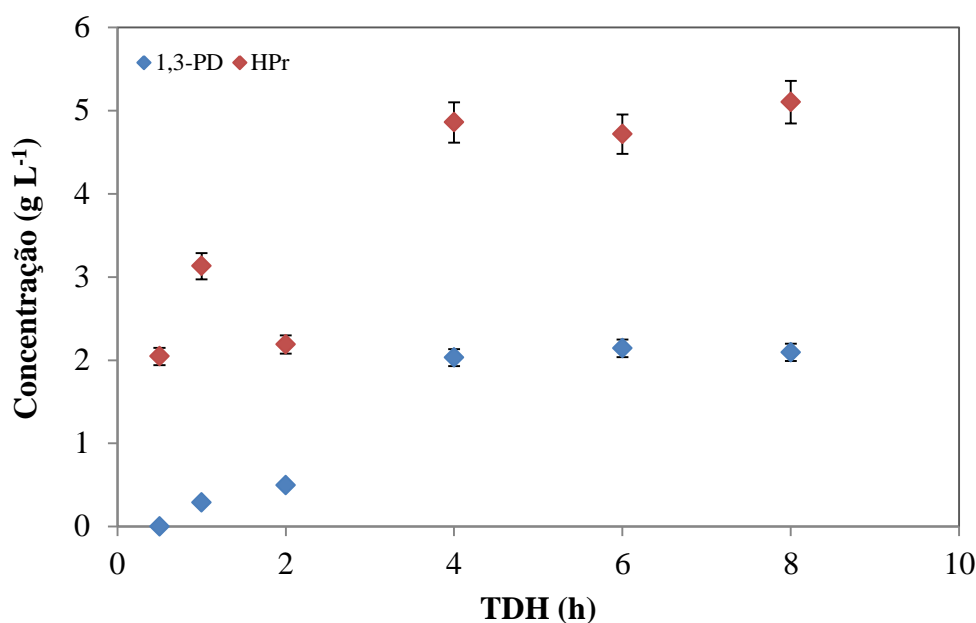
Tabela 5-5: Concentração (g L<sup>-1</sup>) dos principais metabólitos obtidos em função do TDH

TDH (h)	EtOH	HAc	1,3-PD	HPr	HBu	HBu (Iso)
8	0,077 ± 0,06	0,110 ± 0,04	2,15 ± 0,17	5,10 ± 1,67	0,149 ± 0,05	0,092 ± 0,06
6	0,030 ± 0,02	0,124 ± 0,02	2,14 ± 0,18	4,71 ± 0,59	0,081 ± 0,04	0,022 ± 0,01
4	0,014 ± 0,02	0,073 ± 0,02	2,03 ± 0,17	4,85 ± 0,66	0,084 ± 0,04	0,019 ± 0,01
2	0,079 ± 0,03	0,100 ± 0,02	0,49 ± 0,09	2,19 ± 0,61	ND	ND
1	0,057 ± 0,03	0,080 ± 0,02	0,29 ± 0,06	3,13 ± 1,10	ND	ND
0,5	0,016 ± 0,02	0,007 ± 0,01	ND	2,04 ± 0,62	0,017 ± 0,03	0,020 ± 0,01

EtOH: etanol; HAc: ácido acético; 1,3-PD: 1,3-propanodiol; HPr: ácido propiônico, HBu: ácido butírico, HBu (Iso): ácido isobutírico, ND: não detectado.

O perfil da variação das concentrações de ácido propiônico e 1,3-propanodiol em função do TDH é apresentado na Figura 5.4, na qual pode-se observar que a concentração de 1,3-propanodiol permanece em torno de 2 g L<sup>-1</sup> nos TDH de 8, 6 e 4 h, seguido de uma diminuição para 0,49 g L<sup>-1</sup> (TDH 2 h) e, cessando a produção no TDH de 0,5 h. Já as concentrações de ácido propiônico apresentam um perfil decrescente em função da diminuição do TDH, sendo a concentração máxima atingida no TDH de 8 h (5,1 g L<sup>-1</sup>) e a mínima no TDH de 0,5 h (2,04 g L<sup>-1</sup>).

Figura 5-4: Concentração de ácido propiônico e 1,3-propanodiol em função do TDH



A diminuição da concentração de 1,3-propanodiol em função da diminuição do TDH foi constatada no trabalho de Gonen et al. (2012) que visaram a produção de 1,3-propanodiol em reator de leito fixo variando o TDH entre 16 e 0,5 h tendo glicerol bruto como fonte de carbono (45 g L<sup>-1</sup>). Os autores verificaram que a concentração de 1,3-propanodiol aumentou em função do aumento do TDH até 8 h. Foi observado também que no TDH acima de 8 h, a concentração de 1,3-propanodiol começou a decrescer possivelmente devido a efeito de inibição de produtos secundários, tais como álcoois e outros ácidos graxos voláteis.

Em TDH mais baixos, Gonen et al. (2012) verificaram o decaimento da concentração de 1,3-propanodiol em função da diminuição do TDH, principalmente nos TDH de 2, 1 e 0,5 h. E possivelmente este fato deve-se a eliminação dos microrganismos devido o aumento da velocidade superficial aplicada ou devido à tensão de cisalhamento exercida nas partículas provocando desprendimento do biofilme. Ressalta-se também que em baixos TDH a transferência de massa é negativamente afetada devido à diminuição do tempo de contato entre bactéria e substrato.

Gungormusler et al. (2013) avaliaram a produção de 1,3-propanodiol a partir de glicerol bruto (40 g L<sup>-1</sup>) em reator de leito fixo sob condições mesofílicas (37 °C). Os autores pesquisaram o efeito da variação do TDH (16, 12, 8, 6, 4, 2, 1 e 0,5 h) e de diferentes materiais suportes (fios de aço inoxidável – R1, anéis de raschig – R2 e

Vukopor® - filtro de cerâmica – R3) na produção do metabólito. A máxima concentração de 1,3-propanodiol alcançada no R1 e R2 foi atingida no TDH de 12 h (13 g L<sup>-1</sup> para cada reator) e a máxima registrada foi de 17,9 g L<sup>-1</sup> no R3 no TDH de 4 h. Semelhante ao presente estudo, os autores constataram também um perfil decrescente da concentração de 1,3-propanodiol em função da diminuição do TDH em todos os reatores.

A produção de 1,3-propanodiol também foi avaliada na pesquisa de Gonen et al. (2013) no qual *Clostridium beijerinckii* B-593 foi imobilizado em dois materiais suportes, sendo estes esfera e anéis de vidro. O processo ocorreu em reator de leito fixo e o pH e a temperatura foram mantidos em 6 e 37 °C, respectivamente. Os TDH operados variaram entre 2 e 16 h e a concentração de glicerol adotada foi 45 g L<sup>-1</sup>. A máxima concentração de 1,3-propanodiol atingida para esferas e anéis de vidro foi de, respectivamente, 28 e 30 g L<sup>-1</sup>, no TDH de 8 h. Com o aumento do TDH de 8 para 12 h, a concentração dos produtos começaram a diminuir, atingindo o menor valor no TDH de 16 h. Os autores afirmam também que a produção de 1,3-propanodiol foi negativamente afetada por longos TDH.

Dietz e Zeng (2014) estudaram a produção de 1,3-propanodiol utilizando cultura mista de microrganismos em batelada e batelada alimentada, no qual glicerol bruto (25 g L<sup>-1</sup>) foi utilizado como fonte de carbono. A temperatura e o pH foram mantidos em 35 °C e 7.5, respectivamente. Operando em batelada alimentada, os autores verificaram que a concentração final de 1,3-propanodiol atingiu 40 g L<sup>-1</sup> e rendimento de 0.55 mol mol<sup>-1</sup> após duas adições de alimentação. A alta concentração final de 1,3-propanodiol foi alcançada com uma alimentação contínua de substrato. Glicerol bruto foi alimentado constantemente a uma taxa de 20 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Posteriormente, a taxa de alimentação foi reduzida para 10 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> de glicerol. A concentração de 1,3-propanodiol aumentou constantemente até atingir a concentração máxima de 70 g L<sup>-1</sup>. Acetato e butirato foram os principais sub-produtos formados. Segundo os autores, a concentração de 1,3-propanodiol aumentou acentuadamente de 35 para 60 g L<sup>-1</sup>, sendo assim a produção de butirato foi preferida em relação à formação de acetato.

Devido à possível inexistência de trabalhos que visam à produção de ácido propiônico a partir de glicerol em reatores contínuos até o presente momento, encontrou-se na literatura trabalhos que tinha tal objetivo em processos em batelada e batelada alimentada. Zhang e Yang (2009) pesquisaram a produção de ácido propiônico utilizando cultura pura de microrganismos em reator de leito fibroso a 37 °C. As

concentrações de ácido propiônico aumentaram em função do aumento de tempo de fermentação, sendo a mínima concentração atingida ( $8,5 \text{ g L}^{-1}$ ) em aproximadamente 18 h, e a máxima no tempo de 140 h (aprox.  $24 \text{ g L}^{-1}$ ). De forma semelhante ao presente trabalho, os pesquisadores notaram somente pequenas quantidades de ácido acético e succínico na fermentação.

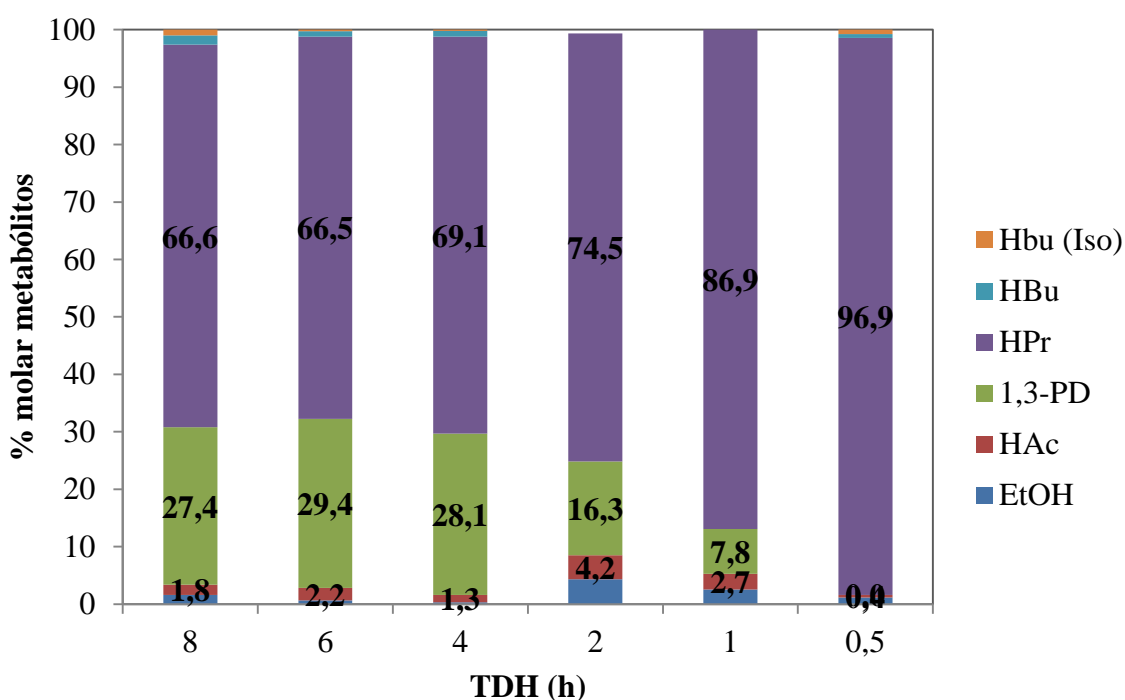
Zhu et al. (2010) avaliaram a produção de ácido propiônico a partir de glicerol bruto com diferentes concentrações de glicerol (20, 50, 70 e  $80 \text{ g L}^{-1}$ ) utilizando cultura pura de microrganismos em batelada alimentada. A máxima produção de ácido propiônico alcançada na concentração de  $20 \text{ g L}^{-1}$  de glicerol foi de  $15,72 \text{ g L}^{-1}$  após 120 h de fermentação. As concentrações de ácido succínico e acético foram 2,3 e  $1,20 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente. Com a concentração de  $50 \text{ g L}^{-1}$  de glicerol, a concentração máxima de ácido propiônico alcançada foi de  $28,5 \text{ g L}^{-1}$  após 150 h de fermentação. As concentrações de ácido succínico e acético foram 4,24 e 2,56, respectivamente. Adotando  $70 \text{ g L}^{-1}$  de concentração de glicerol, a concentração máxima de ácido propiônico alcançada foi de  $29,21 \text{ g L}^{-1}$  após 300 h de fermentação. As concentrações de ácido succínico e acético foram 5,5 e  $3,4 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente.

Dishida et al. (2012) avaliaram a produção em batelada e contínua de ácido propiônico a partir de glicerol utilizando células livres e imobilizadas de *Propionibacterium acidipropionici*. A fermentação em batelada ocorreu com células livres de *P. acidipropionici* e valores de glicerol e pH de, respectivamente,  $42 \text{ g L}^{-1}$  e 6.5. O glicerol foi totalmente consumido após 62.5 h, produzindo ácido propiônico com concentração de  $19,5 \text{ g L}^{-1}$ , rendimento de  $0,64 \text{ mol mol}^{-1}$  e uma taxa de produção volumétrica de  $0,34 \text{ g / L h}$ . Em modo contínuo de operação utilizou-se reator de tanque agitado (CSTR) com temperatura de  $32 \text{ }^\circ\text{C}$  e pH 7. Os autores adotaram concentrações de glicerol de 30 e  $40 \text{ g L}^{-1}$  e TDH de 17.5, 13.3 e 10 h. Variando o TDH (entre 13.3 e 10 h) e utilizando concentração de glicerol de  $30 \text{ g L}^{-1}$ , foi observado que não houve grande variação da produção volumétrica e do rendimento de ácido propiônico, que foram em torno de  $1,30 \text{ g / L h}$  e  $0,85 \text{ mol mol}^{-1}$ , respectivamente. Em contrapartida, ao adotar concentração de  $40 \text{ g L}^{-1}$  e TDH de 17,5 h, os autores constataram uma redução da produção volumétrica e do rendimento de ácido propiônico que foram, respectivamente,  $0,83 \text{ g / L h}$  e  $0,64 \text{ mol mol}^{-1}$ . As concentrações de ácido propiônico obtidas em células imobilizadas e em modo contínuo de operação foram de, aproximadamente,  $14,5 \text{ g L}^{-1}$  para todos os TDH e concentração de glicerol adotadas.

Os principais metabólitos detectados no presente trabalho foram: ácido propiônico, 1,3-propanodiol, etanol, ácido acético, ácido butírico e isobutírico. De acordo com a Figura 5.5, apresentada a seguir, percebe-se que a rota metabólica de produção de ácido propiônico foi favorecida em todas as etapas de operação do reator, atingindo o maior percentual molar no TDH de 0,5 h, com 96,9%. Como mencionado na revisão de literatura deste trabalho, a produção de ácido propiônico a partir do glicerol gera número reduzido de subprodutos. Esse fato é justificado pela similaridade do grau de redução do glicerol e do ácido propiônico, sendo assim não há necessidade de produzir outros metabólitos para equilibrar o balanço redox.

O percentual molar de 1,3-propanodiol apresentou-se estável nos TDH de 8, 6 e 4 h, variando entre 27,4% (TDH de 8 h) e 29,4% (TDH de 6 h). Entretanto, ocorreu uma diminuição para 16,3% no TDH de 2 h, decrescendo novamente para 7,8% no TDH de 1 h e, cessando completamente a produção, no TDH de 0,5 h. Tal fato pode ser justificado pelo favorecimento da via oxidativa de fermentação do glicerol, pois entre o TDH de 2 e 0,5 h, houve um crescente aumento do conteúdo de hidrogênio no biogás gerado, bem como um aumento do percentual molar de ácido propiônico, ou seja, compostos gerados na via oxidativa. A relação entre a porcentagem molar dos metabólitos e o conteúdo de H<sub>2</sub> em função do TDH é apresentada na Figura 5.5 e Tabela 5.6.

Figura 5-5: Porcentagem molar de metabólitos produzidos em função do TDH



A produção de ácido acético no reator foi baixa nas cinco fases de operação apresentadas. Esse fato pode ser atribuído ao estado redutivo do glicerol que, segundo Zhang (2009), a baixa produção de ácido acético deve-se ao elevado estado redutivo do glicerol, que prefere a produção de mais produtos redutivos (como o ácido propiônico) ao invés de mais metabólitos oxidados (como o ácido acético), a fim de equilibrar o potencial redox intracelular. Outra condição que pode ter favorecido a rota de formação de ácido propiônico foi a baixa concentração de glicerol utilizada já que, como foi mencionado na revisão de literatura deste trabalho, baixas concentrações de glicerol favorecem a via oxidativa.

Outro aspecto relevante é que baixas concentrações de glicerol induzem a formação de ácido propiônico. Segundo Harada (2012), relações C/N reduzidas podem favorecer a produção de ácido propiônico. Conclusão similar foi obtida no trabalho de Zhu et al. (2010) que sugere a utilização de baixas concentrações de glicerol com o intuito de maximizar a produção de ácido propiônico (Huang et al., 2002).

Tabela 5-6: Porcentagem molar dos principais metabólitos obtidos em função do TDH

TDH	EtOH	HAc	1,3-PD	HPr	HBu	HBu (Iso)
8	1,6	1,8	27,4	66,6	1,6	1,0
6	0,7	2,2	29,4	66,5	1,0	0,3
4	0,3	1,3	28,1	69,1	1,0	0,2
2	4,3	4,2	16,3	74,5	ND	ND
1	2,5	2,7	7,8	86,9	ND	ND
0,5	1,2	0,4	ND	96,9	0,7	0,8

EtOH: etanol; HAc: ácido acético; 1,3-PD: 1,3-propanodiol; HPr: ácido propiônico, HBu: ácido butírico, HBu (Iso): ácido isobutírico, ND: não detectado

Chookaew et al. (2012) avaliaram a produção de H<sub>2</sub> e metabólitos solúveis tendo glicerol bruto como fonte de carbono no processo fermentativo, utilizando *Klebsiella pneumoniae* TR17 em batelada. A produção de H<sub>2</sub> e metabólitos foi investigada em função da variação de condições de cultivo, como a mudança de temperatura (30 - 50 °C), de pH inicial (4.0 – 9.0) e concentração de glicerol (20 – 100 g L<sup>-1</sup>). Os resultados mostraram que as condições ótimas de cultivo foram: temperatura de 40 °C, pH de 8 e 20 g L<sup>-1</sup> de concentração de glicerol. Tais condições resultaram como metabólitos

majoritários o 1,3-propanodiol, 2,3-butanodiol e etanol, com as respectivas concentrações de 3.52, 2.06 e 3.95 g L<sup>-1</sup>.

Bósio (2014) constatou a predominância de 1,3-propanodiol em todas as fases analisadas no reator anaeróbio de leite fluidizado. No TDH de 8 h, a autora obteve uma porcentagem molar média de 1,3-propanodiol de 50,15% seguido de etanol com 24,76%. No TDH de 4 h houve uma redução da porcentagem molar de 1,3-propanodiol para 38,62% e uma pequena redução da porcentagem molar de etanol para 20,64%. Ressalta-se que no TDH de 4 h, houve um salto para 20,22% da porcentagem molar de ácido propiônico que, nas fases anteriores, encontrava-se entre 0,99 e 2,53%, entre os TDH de 24 e 8 h. Tal fato indica que baixos valores de TDH, favorecem a produção de ácido propiônico.

Chookaew et al. (2014) produziram hidrogênio a partir de glicerol bruto em UASB immobilizando a *Klebsiella sp.* TR1, como citado anteriormente. Com condições de 40 °C e pH inicial de 8, o reator foi operado em seis TDH diferentes, variando entre 12 e 2 h. Nas três concentrações de glicerol adotadas (10, 20 e 30 g L<sup>-1</sup>), houve a predominância de 1,3-propanodiol em todos os TDH operados. Na concentração de 10 g L<sup>-1</sup>, a maior concentração de metabólito atingida foi de 1,3-propanodiol, seguida de ácido acético, etanol e posteriormente de 2,3-butanodiol, para os TDH entre 12 e 6 h. Nos TDH entre 4 e 2 h, o 1,3-propanodiol permaneceu em maior quantidade e os outros metabólitos mencionados anteriormente (ácido acético, etanol e 2,3 - butanodiol) encontraram-se em concentrações aproximadas, variando entre 0,8 e 1,5 g L<sup>-1</sup>.

Ferreira (2014) operando um RALF em condições termofílicas, como citado anteriormente, obteve 1,3-propanodiol, etanol, ácido acético, ácido butírico e ácido propiônico como principais metabólitos. Entre os TDH de 14 e 2 h, houve a predominância de 1,3-propanodiol, etanol ácido acético e ácido butírico. A porcentagem molar de tais metabólitos foi bastante significativa quando comparada com os demais. Ferreira afirma que os valores de porcentagem para 1,3-propanodiol e etanol foram ainda maiores, e variaram de 50 a 30% e de 29 a 13%, respectivamente, até o TDH de 2. Ao reduzir o TDH para 1 h, a produção de etanol foi interrompida e a produção de ácido propiônico foi favorecida. A porcentagem molar dos metabólitos obtidos no TDH de 1 h foram: 56% de ácido propiônico, 30% de 1,3-propanodiol, 11% de ácido acético e 3% outros.

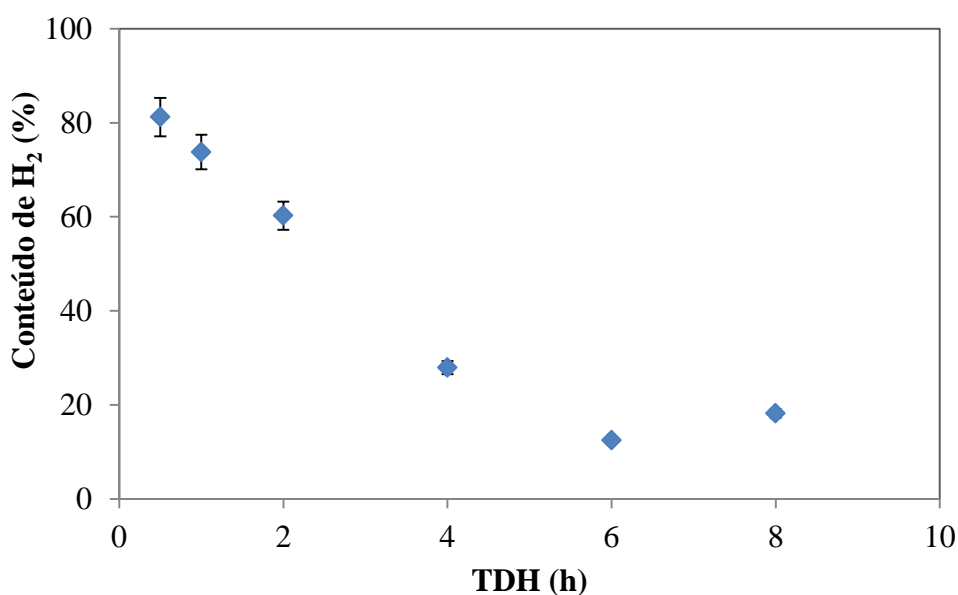
#### 5.4.1 Conteúdo de hidrogênio no biogás produzido e produção volumétrica de hidrogênio

O biogás produzido no reator operado neste trabalho foi composto de  $H_2$  e  $CO_2$ . Um aspecto relevante ao conteúdo de biogás produzido é que não ocorreu a presença de metano. Este fato pode ser atribuído ao sucesso do tratamento térmico realizado na etapa de início de operação do reator, onde ocorreu a eliminação das arqueas metanogênicas.

A Figura 5.6 mostra o conteúdo de  $H_2$  presente no biogás produzido onde se pode observar que o conteúdo máximo de  $H_2$  obtido foi atingido do TDH de 0,5 h, com percentual de 81,21% e o conteúdo mínimo observado foi de 12,4% no TDH de 6 h. Nessa figura também é possível notar que o conteúdo de  $H_2$  aumenta ao passo em que TDH é diminuído.

O aumento do conteúdo de  $H_2$  em função da diminuição do TDH também foi observado no trabalho de Chookaew et al. (2014), que operando um reator UASB utilizando *Klebsiella sp.* TR17 em 40 °C obtiveram um perfil crescente de conteúdo de  $H_2$  em função da diminuição do TDH. Os autores avaliaram a influência das concentrações de glicerol empregadas (10, 20 e 30 g  $L^{-1}$ ) em diferentes TDH. Nos TDH de 12 e 10 h, o conteúdo de  $H_2$  médio para a concentração de 10  $L^{-1}$  foi de 25%. Entre os TDH de 8 e 2 h, o conteúdo de  $H_2$  permaneceu praticamente constante, em torno de 45%.

Figura 5-6: Comparação do conteúdo médio de  $H_2$  no biogás em função do TDH.





Lo et al. (2013) produziram H<sub>2</sub> utilizando cultura pura de microrganismos (*C. pasteurianum*) e, como já mencionado anteriormente, as condições operacionais adotadas foram: temperatura, 35 °C; TDH, 12 h; pH sem controle (inicial entre 5 e 9); concentração de glicerol, 10 g L<sup>-1</sup>. Em tais condições, o percentual de H<sub>2</sub> obtido foi em torno de 75%. O elevado percentual de H<sub>2</sub> atingido pode ser justificado pelas condições operacionais adotadas já que, para os autores, estas foram condições ótimas para a produção de hidrogênio.

Reungsang et al. (2013a), que operaram em condições de temperatura e pH (37 °C e pH 5.5) semelhantes ao presente trabalho, avaliaram a produção de hidrogênio em reator UASB utilizando *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, tendo glicerol (25 g L<sup>-1</sup>) bruto/puro como substrato. Ao utilizar glicerol bruto no processo, o conteúdo de H<sub>2</sub> obtido foi em torno de 23%.

No estudo realizado por Bósio (2014), o conteúdo de hidrogênio manteve-se em torno de 50% nos TDH de 10, 8 e 6 h. Entre os TDH de 4 e 1 h, ocorreu uma redução de 45 para 36% do conteúdo de H<sub>2</sub>. Já no trabalho de Ferreira (2014), a porcentagem de H<sub>2</sub> no biogás em função do TDH manteve-se em torno de 60% em quase todas as fases de operação, tendo seu ponto mínimo no TDH de 10 h (50%) e seu ponto máximo no TDH de 1 h (70%).

No presente trabalho, o baixo conteúdo de hidrogênio constatado nas três primeiras fases de operação do reator pode ser justificado pelo favorecimento da rota de produção de ácido propiônico, pois este apresentou concentração predominante nas três fases analisadas. Outro aspecto relevante é que a via reductiva de degradação do glicerol também foi favorecida, já que foram obtidas elevadas concentrações de 1,3-propanodiol. Esta análise é também fundamentada no fato de se tratar de cultura mista de microrganismos, na qual diversas vias fermentativas podem ser consideradas.

Ressalta-se também que para formação de 1 mol de 1,3-propanodiol, 1 mol de H<sub>2</sub> é consumido e que os maiores rendimentos de produção de hidrogênio estão relacionados com a geração de ácido acético e butírico, o que não é o caso do presente trabalho nas fases apresentadas. De acordo Bartacek et al. (2007), elevadas concentrações de ácido propiônico ocasionam na redução da produção de hidrogênio, o que também justifica os dados de conteúdo de H<sub>2</sub> apresentados. Dessa forma, as diferenças dos resultados entre os estudos citados e o presente trabalho, devem-se ao fato das diferentes condições de operação, tipo de microrganismos empregados e da

diversidade de rotas metabólicas de degradação do glicerol. A Tabela 5.8 apresenta os dados de conteúdo médio de H<sub>2</sub> em função do TDH.

Tabela 5-7: **Conteúdo de H<sub>2</sub> no biogás formado em função do TDH**

TDH	% MÉDIA DE H <sub>2</sub>
8	18,1± 7,6
6	12,4± 3,5
4	27,9± 3,6
2	60,25 ± 7,2
1	73,77 ± 6,0
0,5	81,21 ± 13,5

A produção volumétrica de hidrogênio (PVH) não foi constatada nas fases I, II e III de operação do reator. Supõe-se que a ausência de produção deve-se ao direcionamento da rota metabólica (via oxidativa) para a formação de ácido propiônico e para a rota (via redutiva) de formação de 1,3-propanodiol. De acordo com a Figura 3.8, apresentada na revisão de literatura desta pesquisa, observa-se que a rota de formação de propionato antecede a via de formação do piruvato, que é um dos principais compostos antecedentes de formação de hidrogênio.

A inibição da produção de hidrogênio pode ocorrer devido ao acúmulo de ácidos não-dissociados que podem levar a um desequilíbrio no balanço fisiológico da célula devido a penetração destes na membrana celular. Sendo assim, pode-se considerar a inibição da produção de H<sub>2</sub> devido ao acúmulo da produção de ácido propiônico no sistema (Reis, 2010). A Tabela 5.9 apresenta os dados de produção volumétrica de H<sub>2</sub>, quando houve, para as respectivas fases de operação do reator.

Tabela 5-8: **Produção volumétrica média de hidrogênio**

Fase	TDH	PVH (mL/h L)	TD*
IV	2	5,96	7
V	1	13,19	7
VI	0,5	4,25	4

TD\*: Total de dias de produção volumétrica de H<sub>2</sub> na fase.

Ferreira (2014) avaliou a produção biológica de H<sub>2</sub> em condições termofílicas (55 °C) a partir de glicerol bruto (5 g L<sup>-1</sup>) com cultura mista de microrganismos. Ferreira constatou que a produção volumétrica de hidrogênio aumentou em função da diminuição do TDH. Para os TDH de 8, 6, 4, 2 e 1 h, a produção volumétrica de hidrogênio foi de 158.6, 236.7, 399.1, 667.3 e 1508.7 mL h<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Bósio (2014) em condições mesofílicas (37 °C) e pH controlado em 4.5 operou um RALF tendo glicerol bruto como fonte de carbono. Semelhantemente a Ferreira, Bósio verificou que a produção volumétrica de H<sub>2</sub> aumentou com a diminuição do TDH. Para os TDH de 8, 6, 4, 2 e 1 h, a produção volumétrica de hidrogênio foi de 0.20, 0.24, 0.29, 0.46 e 0.73 L h<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup>.

Durante a etapa experimental desta pesquisa, notou-se que a produção volumétrica de hidrogênio ocorria logo após a mudança de fase do reator, e cessava após um determinado tempo. Acredita-se que, devido à mudança do TDH de uma fase para a outra, os microrganismos foram submetidos a condições de “estresse”, podendo ser choque de carga orgânica ou hidráulico. Dessa forma, tais condições podem ter favorecido a produção de H<sub>2</sub> no sistema.

Aquino e Chernicharo (2005) afirmam que, durante choques de carga orgânica em reatores anaeróbios, os microrganismos acidogênicos (que são de rápido crescimento) produzirão mais hidrogênio, pois assim estes se encontram em condições de excesso de fonte de energia. Os autores alegam também que em alguns trabalhos encontrados na literatura, há um aumento no acúmulo de hidrogênio no biogás durante condições de choque de carga orgânica e/ou hidráulica no reator. O acúmulo de hidrogênio em reatores anaeróbios durante choques de carga orgânica ocorre devido a limitações de transferência de hidrogênio dos microrganismos produtores para os consumidores.

A variação da carga orgânica no sistema está atrelada a diminuição do TDH no reator. Sendo assim, no estudo em questão, a redução do TDH proporciona um aumento da carga orgânica aplicada já que, durante o experimento, a concentração de substrato na alimentação foi mantida constante. A Tabela 5.9 a seguir, mostra a relação da PVH com a taxa de carregamento orgânico aplicada (TCO<sub>apl</sub>) em função do TDH.

Tabela 5-9: **Produção volumétrica de hidrogênio em função do TDH de TCO<sub>apl</sub>**

Fase	TDH	PVH (mL/h/L)	TCO <sub>apl</sub> (kg/m <sup>3</sup> d)
IV	2	6,0	239,4 ± 9,7
V	1	13,2	486,4 ± 58,7
VI	0,5	4,2	1091,6 ± 58,6

Percebe-se, na Tabela 5.10, que houve um aumento da produção volumétrica de hidrogênio ao passo que a taxa de carregamento orgânica aplicada foi aumentada entre as fases IV e V. Alguns trabalhos reportados na literatura comprovam que ocorre aumento da produção volumétrica de hidrogênio diante de um aumento da taxa de carregamento orgânico. Amorim (2009) operando um RALF mesofílico tendo glicose como fonte de carbono avaliou o efeito da taxa de carregamento orgânico na produção de H<sub>2</sub>. O pesquisador observou que ocorreu um aumento da produção volumétrica de 0,08 a 0,97 L h<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup> diante do aumento da taxa de carregamento orgânico de 15,7 a 116,6 Kg DQO m<sup>-3</sup> dia<sup>-1</sup>. Fenômeno semelhante foi constatado no trabalho realizado por Reis (2010) que avaliou a influência da velocidade ascensional em reator anaeróbio de leito fluidizado para a produção de hidrogênio. O reator foi alimentado com meio contendo glicose com concentração de 5 g L<sup>-1</sup>. O autor verificou que, nos quatro reatores operados, houve um aumento da produção volumétrica de hidrogênio ao passo que a taxa de carregamento orgânico aplicada aumentava.

Apesar de muitos trabalhos na literatura afirmarem que a produção volumétrica de hidrogênio aumenta com a elevação da taxa de carregamento orgânico, pode-se dizer que a relação entre tais parâmetros não são claras. Em alguns casos, um aumento da TCO resulta no decréscimo da produção volumétrica e do conteúdo de H<sub>2</sub>. Dessa forma, um controle da TCO é um passo importante para obtenção de eficiente produção de H<sub>2</sub>, pois ao utilizar uma TCO acima ou abaixo da TCO<sub>ótima</sub> de um processo específico de obtenção de H<sub>2</sub>, efeitos adversos na produção podem ocorrer. A operação com TCO abaixo do nível de TCO<sub>ótima</sub> implica que a concentração de substrato utilizada foi menor que a requerida para os microrganismos, com isso ocorre a redução do crescimento e da atividade dos microrganismos. Além disso, uma baixa TCO pode reduzir o contato entre célula microbiana e substrato devido à baixa velocidade ascendente (Reungsang et al., 2013a).

Em contrapartida, um aumento da TCO acima da  $TCO_{ótima}$  resulta no aumento da velocidade ascendente, que pode produzir elevadas concentrações de substrato e exceder o nível de inibição por substrato. Além disso, um aumento da concentração de substrato acima do nível ótimo pode desenvolver pressão osmótica no interior da célula, que pode causar danos nas células microbianas (Reungsang et al., 2013a).

Dessa forma, pode-se supor que o decaimento da produção volumétrica de  $H_2$  entre o TDH de 1 e 0,5 h pode está relacionado à  $TCO_{apl}$  nesta fase, no qual esta pode está acima da  $TCO_{ótima}$  para a produção de  $H_2$  na pesquisa em questão. Resultado semelhante foi obtido no trabalho de Barros (2012) que avaliou a produção de  $H_2$  e etanol em RALF tendo glicose como fonte de carbono com concentração de  $4000 \text{ mg L}^{-1}$ , variando o TDH entre 8 e 1 h. No processo, a temperatura foi mantida em  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  e diferentes materiais suportes (poliestireno – R1, pneu inservível triturado – R2 e PET – R3) foram utilizados. A autora observou que em todos os reatores, a produção volumétrica de hidrogênio aumentou com a diminuição do TDH até 2 h. Porém, no R2 (pneu), a PVH diminui com a redução do TDH para 1 h, enquanto que o R1 (poliestireno) e o R3 (PET), a PVH aumentou com a redução do TDH para 1 h.

Outra hipótese para a momentânea produção volumétrica de hidrogênio no reator seria a presença de elevadas quantidades de biomassa gerada no interior do reator em baixos TDH, visto que com a diminuição do TDH, foi notada visualmente a presença de flocos de biomassa no meio líquido e na região do copo do reator (vide Figura 4.3). Em baixos TDH ocorreu o crescimento da biomassa com uma maior velocidade, apresentando assim efeitos negativos sobre a produção de hidrogênio. Dessa forma pode-se supor que a produção volumétrica de hidrogênio não foi interrompida, mas ocorreu o consumo do hidrogênio produzido.

#### 5.4.2 Rendimento de ácido propiônico e 1,3-propanodiol

##### 5.4.2.1 Rendimento de Ácido propiônico

Os rendimentos de ácido propiônico para todas as fases de operação do reator são apresentados na Tabela 5.11:

Tabela 5-10: **Rendimento de ácido propiônico em função do TDH.**

TDH	HY (mol de HPr/mol glicerol )	HY (g HPr/g glicerol)
8	2,1	1,8
6	1,5	1,2
4	1,6	1,3
2	0,7	0,6
1	0,9	0,8
0,5	1,7	1,4

HPr: Ácido Propiônico

Os dados apresentados na Tabela 5.11 mostram elevados rendimentos de ácido propiônico para todas as fases de operação do reator. Pode-se notar também um comportamento decrescente do rendimento ao se reduzir o TDH. Essa tendência de diminuição simultânea do rendimento em função do TDH deve-se ao favorecimento da rota de formação de H<sub>2</sub>. Como foi mencionado no tópico de produção volumétrica de hidrogênio deste trabalho, a redução do TDH acarretou num aumento do conteúdo e da produção volumétrica de H<sub>2</sub>. Entretanto, percebe-se que no TDH de 0,5 h, a rota foi novamente direcionada para a formação de ácido propiônico, visto que nesse TDH ocorreu uma diminuição da produção volumétrica de hidrogênio juntamente com o aumento do rendimento de ácido propiônico.

De acordo com Wang e Yang (2013), o rendimento teórico de produção de ácido propiônico é 1 mol de ácido propiônico/ mol de glicerol consumido. Dessa forma, de acordo com a Tabela 5.11, os rendimentos atingidos neste trabalho encontram-se acima do teórico, exceto nas fases IV (TDH de 2 h) e V (TDH de 1 h). Portanto, conclui-se que os rendimentos alcançados no estudo em questão devem-se a presença de outras fontes de carbono presente no glicerol bruto, o que ocasiona a formação de ácido propiônico em função de outro substrato. Tratando-se de uma cultura mista de microrganismos empregada, pode-se supor também que rotas desconhecidas de formação de ácido propiônico foram favorecidas. Para confirmar tais hipóteses seria necessário analisar os ácidos graxos presentes no glicerol bruto.

Diversos trabalhos têm sido realizados visando à produção fermentativa de ácido propiônico a partir do glicerol. Zhang e Yang (2009) estudaram a produção de ácido propiônico através da *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4875 em biorreator de leito fibroso (FBB) utilizando glicerol puro e bruto como fonte de carbono. O sistema

foi mantido em 32 °C e pH entre 6,5 e 7,0. Neste trabalho, o reator FBB foi inicialmente operado em bateladas repetidas com o intuito de incrementar a densidade celular no reator. Depois disso, o reator foi operado em batelada alimentada para aumentar gradualmente a concentração de ácido propiônico produzida na fermentação do glicerol.

Os rendimentos médios de produtos a partir do glicerol em batelada alimentada foram 0,56 g/g de ácido propiônico, 0,061 g/g de ácido succínico e 0,025 g/g de ácido acético. Ao término da fermentação em batelada alimentada, o caldo de fermentação no reator foi removido e substituído por meio fresco. Várias bateladas foram repetidas com a cultura adaptada. Com o intuito de avaliar o efeito da cultura adaptada no desempenho do FBB, a fermentação em batelada realizada antes e depois do período de batelada alimentada foi comparada. Portanto, comparado com a cultura original, a cultura adaptada produziu mais ácido propiônico (23 g L<sup>-1</sup> vs. 19 g L<sup>-1</sup>) num menor tempo (100 h vs. 160 h) a partir da mesma concentração de glicerol (40 g L<sup>-1</sup>). Conseqüentemente, a cultura adaptada gerou maior rendimento de ácido propiônico (0,59 g/g vs. 0,52g/g) e também produziu mais ácido acético e ácido succínico.

Himmi et al. (2000) avaliaram produção de ácido propiônico em batelada a partir da fermentação de glicerol (20 g L<sup>-1</sup>) ou glicose (20 g L<sup>-1</sup>) utilizando *Propionibacterium acidipropionici* e *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*. A temperatura e o pH do sistema foram controlados em 30 °C e 7, respectivamente. Em todas as situações adotadas, os produtos finais obtidos foram semelhantes e o ácido propiônico foi o produto majoritário, seguido do ácido acético como subproduto. *P. acidipropionici* apresentou maior eficiência de conversão de substrato e produção volumétrica de ácido propiônico de 0.42 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. O rendimento de ácido propiônico atingido foi de 0.79 mol mol<sup>-1</sup>.

Zhu et al. (2010) avaliaram a produção de ácido propiônico através da fermentação do glicerol (20, 50, 70 e 80 g L<sup>-1</sup>) utilizando *Propionibacterium acidipropionici* em batelada alimentada. O rendimento máximo de ácido propiônico obtido foi de 0,56 g/g. A máxima concentração de ácido propiônico alcançada para concentração inicial de glicerol de 20 g L<sup>-1</sup>, foi de 15,72 g L<sup>-1</sup> após 120 h. As concentrações de ácido succínico e ácido acético foram 2,31 e 1,20 g L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Bósio (2014) obteve baixos rendimentos de ácido propiônico sendo que, no TDH de 14, 12 e 10 h, o rendimento alcançado foi de 0,01 mol/mol. O maior rendimento constatado foi no TDH de 4 h, atingindo o valor de 0,22 mol/mol. Esses

rendimentos podem ser justificados pela formação de outros produtos, como o 1,3-propanodiol, etanol e H<sub>2</sub>, que foram os principais produtos obtidos na pesquisa de Bósio.

Zhang et al. (2014) avaliaram os efeitos do dióxido de carbono na produção em batelada de ácido propiônico e no crescimento celular. Com base em análises metabólicas, CO<sub>2</sub> (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) é requerido no Ciclo Wood-Werkman (ou ciclo dos ácidos dicarboxílicos), que determina a síntese de ácido propiônico. Neste trabalho, os pesquisadores estudaram o crescimento celular, a formação de ácido carboxílico e a atividade enzimática através da fermentação de glicose e glicerol em condições de enriquecimento de CO<sub>2</sub> e condições limitantes deste. Os autores utilizaram *Propionibacterium acidipropionici* a 32 °C e pH controlado em 7,0.

Os resultados mostraram que a suplementação de CO<sub>2</sub> teve repercussões importantes na formação de ácidos orgânicos. Na presença de CO<sub>2</sub> exógeno, mais ácido propiônico e ácido succínico foram produzidos. No entanto, ácido acético não foi formado a partir do glicerol nas duas condições de CO<sub>2</sub> adotados (enriquecimento e limitante). A produção de propionato e succinato aumentaram significativamente, 100% e 200 %, respectivamente quando CO<sub>2</sub> foi adicionado no meio de cultura. Os rendimentos de ácido propiônico, ácido acético e ácido succínico (com CO<sub>2</sub>) foram: 0,7 g/g, 0,0 g/g e 0,076 g/g, respectivamente. A produtividade de ácido propiônico na mesma condição foi de 0,12 g /L.h. Na ausência de CO<sub>2</sub>, os rendimentos foram: 0,77 g/g (ácido propiônico), 0,0 g/g (ácido acético) e 0,042 g/g (ácido succínico). A produtividade de ácido propiônico na ausência de CO<sub>2</sub> foi de 0,07 g /L.h.

Dentre os trabalhos citados, observa-se que o rendimento máximo de ácido propiônico obtido foi de 0,844 mol mol<sup>-1</sup> na pesquisa de Barbirato et al. (1997) que avaliaram a produção de ácido propiônico utilizando *Propionibacterium acidipropionici*, *Propionibacterium acnes* e *Clostridium propionicum*. Tal resultado apresenta-se abaixo dos valores obtidos no trabalho em questão.

Apesar das divergências de dados de rendimento de ácido propiônico com os dados apresentados na literatura, a pesquisa apresentou-se favorável a produção de ácido propiônico. Os resultados e as condições de operações propostas podem contribuir para futuras pesquisas que visam à produção biológica de ácido propiônico a partir do glicerol.



#### 5.4.2.2 Rendimento de 1,3-propanodiol

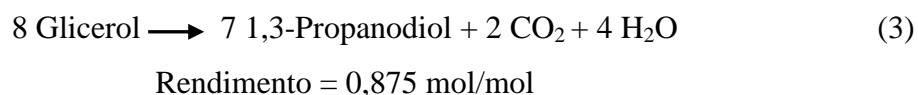
Os rendimentos de 1,3-propanodiol para todas as fases de operação do reator são apresentados na Tabela 5.12:

Tabela 5-11: **Rendimento de 1,3-propanodiol em função do TDH.**

Fase	TDH	HY (mol de 1,3-PD/mol glicerol)
I	8	0,82
II	6	0,68
III	4	0,67
IV	2	0,16
V	1	0,08
VI	0,5	ND

1,3-PD: 1,3-propanodiol; ND: não detectado.

De acordo com Gonen et al. (2013) e Tong e Cameron (1992), o rendimento teórico máximo de 1,3-propanodiol calculado a partir da fermentação anaeróbia de glicerol é  $0,875 \text{ mol mol}^{-1}$ . E, retomando a reação apresentada na revisão de literatura deste trabalho, tem-se:



De acordo com os dados apresentados na Tabela 5.12, pode-se observar elevados rendimentos de 1,3-propanodiol nas três primeiras fases de operação, que representam os TDH de 8, 6 e 4 h. Nota-se também que o rendimento máximo atingido em todas as fases do experimento foi no TDH de 8 h, com  $0,82 \text{ mol mol}^{-1}$ . Esse resultado encontra-se próximo do valor teórico. Outro aspecto relevante observado é que o rendimento de 1,3-propanodiol decrete ao passo que o TDH é diminuído. Tal fato pode ser justificado devido a relação do TDH com o direcionamento de rotas metabólicas.

Um dos fatores que, possivelmente, podem ocasionar a diminuição do rendimento de 1,3-propanodiol, é a diminuição do TDH. Além desse fenômeno ser observado no presente trabalho, Gonen et al. (2013) obtiveram resultados semelhantes.

Os autores pesquisaram a produção de 1,3-propanodiol utilizando glicerol bruto ( $45 \text{ g L}^{-1}$ ) em reator de leito fixo com células imobilizadas com pH entre 6 e 6,5 e temperatura de  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Os resultados obtidos foram de 0,77, 0,66 e  $0,55 \text{ mol mol}^{-1}$  para os TDH de 8, 6 e 4 h, respectivamente.

Gonen et al. (2012) avaliaram a produção de 1,3-propanodiol em reator de leito fixo utilizando diferentes meios suportes de imobilização da biomassa. A concentração de glicerol utilizada foi de  $45 \text{ g L}^{-1}$  e temperatura de  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Os rendimentos de 1,3-propanodiol obtidos para o reator preenchido com espuma de poliuretano (PUF) foram: 0,53 (TDH de 8h), 0,49 (TDH de 6 h), 0,40 (TDH de 4 h), 0,15 (TDH de 2 h), 0,15 (TDH de 1 h) e  $0,06 \text{ g/g}$  (TDH de 0,5 h). Comportamento semelhante de decréscimo do rendimento em função do TDH também foi observado para os outros reatores preenchidos, individualmente, com esferas de vidro (CB) e pedra-pomes (PS).

Portanto, a partir dos dados apresentados na Tabela 5.12, observa-se que o presente trabalho é promissor para a produção de 1,3-propanodiol já que rendimentos elevados foram atingidos. Outro aspecto importante é que poucos trabalhos são encontrados na literatura que utilizam culturas mistas de microrganismos em modo contínuo de operação.

Selembo et al. (2009) avaliaram a produção fermentativa de hidrogênio e 1,3-propanodiol utilizando cultura mista de microrganismos e glicerol bruto como fonte de carbono. Os autores obtiveram um rendimento de 1,3-propanodiol por mol de glicerol consumido de  $0,69 \text{ mol.mol}^{-1}$ . Já Gallardo et al.(2014) produziram 1,3-propanodiol a partir de glicerol residual em reator granular de leito expandido obtendo um rendimento de 1,3-propanodiol de  $0,59 \text{ mol.mol}^{-1}$ .

Gonen et al.(2013), como mencionado anteriormente, pesquisaram a produção de 1,3-propanodiol a partir da fermentação do glicerol em reator de leito fixo utilizando cultura pura de microrganismos e diferentes materiais suportes. Utilizando esferas de vidro no TDH de 8 h, os autores obtiveram rendimento de  $0,65 \text{ mol mol}^{-1}$  enquanto que, para o mesmo TDH, alcançaram um rendimento de  $0,77 \text{ mol mol}^{-1}$  para o reator preenchido com anéis de raschig.

Dietz e Zeng (2014) avaliaram a produção de 1,3-propanodiol a partir do glicerol bruto e cultura mista de microrganismos. Os autores operaram em batelada e batelada alimentada, obtendo rendimentos de 1,3-propanodiol entre 0,56 e  $0,76 \text{ mol de 1,3 propanodiol mol de glicerol}^{-1}$ .

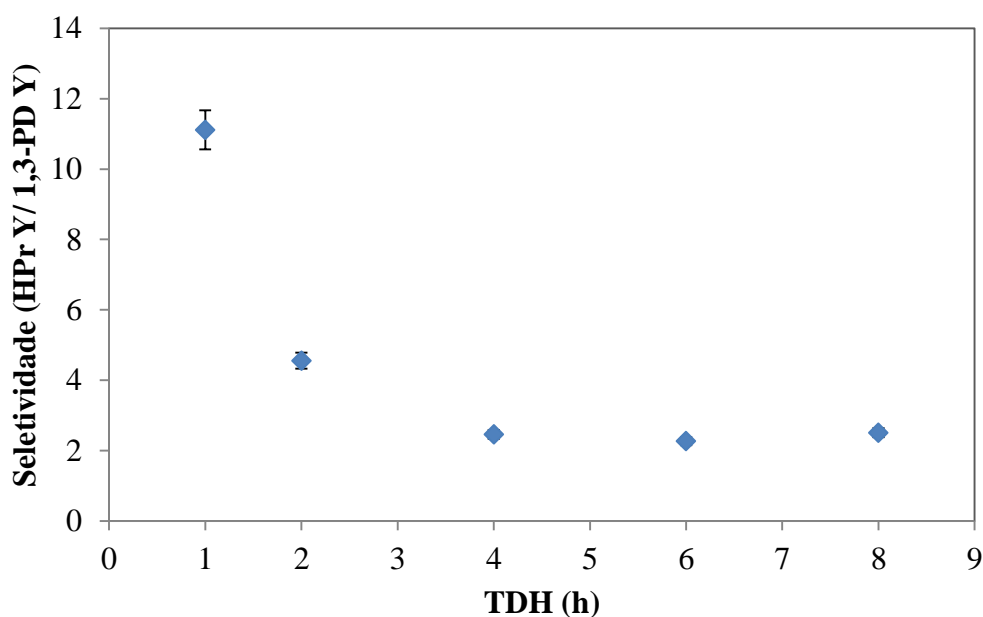
Bósio (2014) obteve rendimentos de 1,3-propanodiol entre 0,38 e 0,42 mol mol<sup>-1</sup> entre os TDH de 14 e 2 h. No TDH de 2 h, o rendimento de 1,3-propanodiol foi de 0,6 mol mol<sup>-1</sup>, seguido de 0,66 mol mol<sup>-1</sup> no TDH de 1h.

Dessa forma, diante dos trabalhos expostos, nota-se que o estudo em questão encontra-se condizente com a literatura já que rendimentos aproximados ou superiores foram atingidos.

#### 5.4.2.3 Seletividade

A Figura 5.7 mostra a relação entre o rendimento de ácido propiônico (HPrY) e o rendimento de 1,3-propanodiol (1,3-PDY) em função do TDH.

Figura 5-7: Efeito do TDH na seletividade (HPrY/1,3-PDY) no RALF

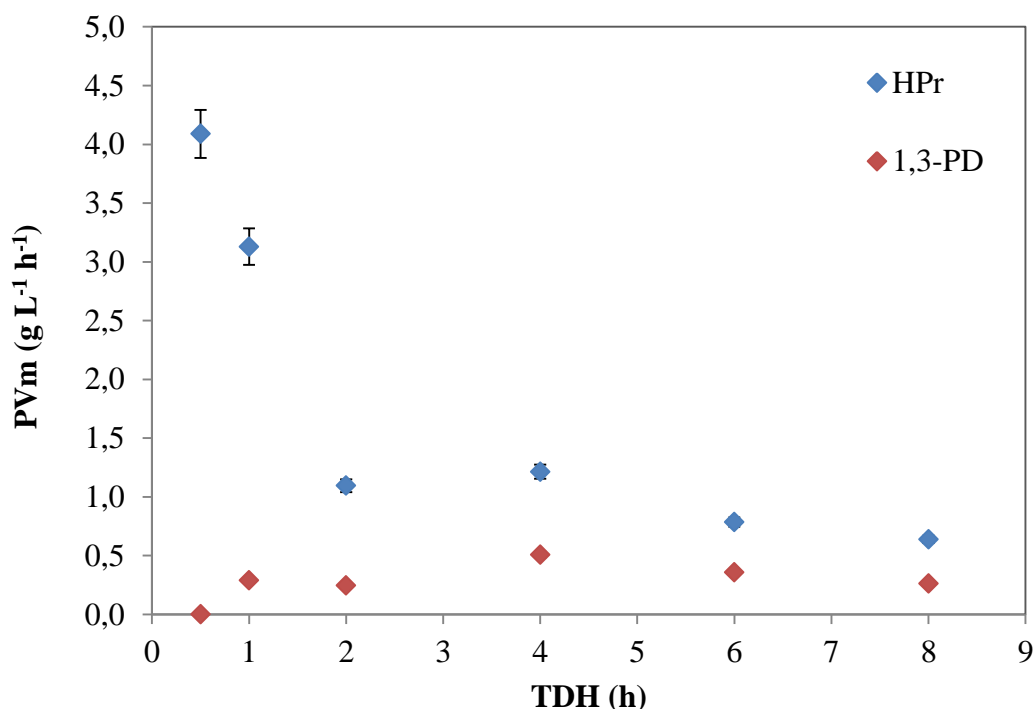


O gráfico de seletividade em função do TDH mostra que o rendimento de ácido propiônico foi superior ao rendimento de 1,3-propanodiol em todos os TDH apresentados. É possível notar também um perfil constante de valores nos TDH de 8, 6 e 4 h em torno de 2,5. Entre os TDH de 4 e 2 h, houve um aumento de 2,5 para 4,6, atingindo, posteriormente, 11,1 no TDH de 1 h. A ausência de dados de seletividade para o TDH de 0,5 h, deve-se ao fato de não ter ocorrido produção de 1,3-propanodiol na referida fase.

### 5.4.3 Produção volumétrica de ácido propiônico e 1,3-propanodiol

A produção volumétrica dos principais metabólitos gerados nesta pesquisa (1,3-propanodiol e ácido propiônico) é apresentada na Figura 5.8, a seguir.

**Figura 5-8:** Produção volumétrica de HPr e 1,3-PD em função do TDH



De acordo com a figura de produção volumétrica de metabólitos (PVM) exposto, pode-se observar que a produção volumétrica de ácido propiônico apresenta um perfil crescente em função da diminuição do TDH. Nota-se também, que entre os TDH de 8 e 2 h, houve um aumento relativamente pequeno (entre 0,64 e 1,10 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) ao se comparar com o aumento ocorrido entre os TDH de 2 e 0,5 h (entre 1,10 e 4,09 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>). Tratando-se da produção volumétrica de 1,3-propanodiol, observa-se que a mesma permaneceu estável (entre 0,26 e 0,51 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) durante todas as fases de operação do reator, exceto no TDH de 0,5 h, no qual não houve produção deste metabólito. Os dados de produção volumétrica estão melhor explicitados na Tabela 5.13, a seguir.

Tabela 5-12: **Produção volumétrica de HPr e 1,3-PD em função do TDH**

FASE	TDH	Produção volumétrica (g/L h)	
		1,3-PD	HPr
I	8	0,26	0,64
II	6	0,36	0,79
III	4	0,51	1,21
IV	2	0,25	1,10
V	1	0,29	3,13
VI	0,5	0	4,09

Trabalhos na literatura que visam à produção de 1,3-propanodiol a partir do glicerol mostram que ocorre um aumento da produção volumétrica ao passo que o TDH é diminuído. Esse fenômeno foi observado na pesquisa de Gonen et al. (2012) que estudaram o efeito de diferentes materiais suportes na imobilização da biomassa (*K. pneumoniae*) para a produção de 1,3-propanodiol a partir do glicerol bruto (45 g L<sup>-1</sup>). Os autores utilizaram reator de leito fixo no processo e mantiveram o pH entre 6 e 7. O TDH foi variado entre 16 e 0,5 h e a temperatura foi mantida em 37 °C. Entre os TDH de 16 e 1 h (1 e 8 g/ L h, respectivamente), houve aumento da produção volumétrica de 1,3-propanodiol. E, semelhante ao presente trabalho, houve uma diminuição no TDH de 0,5 h (5,5 g/ L h).

Barbirato et al. (2007) utilizaram glicerol (20 g L<sup>-1</sup>) para a produção de ácido propiônico utilizando três cepas de bactérias (*Propionibacterium acidipropionici*, *Propionibacterium acnes* e *Clostridium propionicum*). Os resultados alcançados foram de 42 g L<sup>-1</sup> e 0,36 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> de concentração e produtividade de ácido propiônico, respectivamente.

Gonen et al. (2013), com condições operacionais semelhantes ao trabalho de Gonen et al. (2012), constataram que a produção volumétrica de 1,3-propanodiol aumentou em função da diminuição do TDH. A produtividade máxima alcançada no experimento foi no TDH de 2 h com 6,4 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Ressalta-se que o maior diferencial entre os trabalhos de Gonen et al. (2012) e (2013) foram os materiais suporte empregados e microrganismos utilizados.

Tratando-se de trabalhos que buscam a produção de ácido propiônico a partir do glicerol, pode-se citar a pesquisa realizada por Zhang e Yang (2009) que, utilizando

reator de leito fibroso em batelada alimentada tendo glicerol ( $120 - 40 \text{ g L}^{-1}$ ) como fonte de carbono, alcançaram  $0,25 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  de produtividade. Os autores observaram também que a produção volumétrica utilizando glicerol puro foi maior do que ao utilizar glicerol bruto. Eles afirmaram que a diferença deve-se a elevadas concentrações de sais, principalmente cloreto de sódio, ou outras substâncias químicas tóxicas para as células. A elevada salinidade do meio bruto com glicerol seria um dos fatores que podem ocasionar a inibição do crescimento celular e da formação de produtos.

Zhu et al. (2010) operando em batelada e batelada alimentada pesquisaram a produção de ácido propiônico utilizando cultura pura a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . Os autores avaliaram principalmente a influência da concentração de glicerol (20, 50, 70 e  $80 \text{ g L}^{-1}$ ) na produção e no rendimento de ácido propiônico. A máxima produção volumétrica de ácido propiônico alcançada foi de  $0,20 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  após 220 h de fermentação. Em bateladas, a produção de ácido propiônico aumentou e a taxa de crescimento celular específico diminuiu com o aumento da concentração de glicerol. A partir dos resultados obtidos, os autores afirmaram que baixas concentrações de glicerol são favoráveis ao crescimento celular.

Dishida et al. (2015) pesquisaram a produção de ácido propiônico a partir de glicerol bruto utilizando *Propionibacterium acidipropionici* com temperatura fixa em  $32 \text{ }^\circ\text{C}$ . O foco do estudo foi o impacto das concentrações das fontes de carbono e nitrogênio. Os autores constataram que bateladas com variadas razão C/N (pH 6,5), revelaram que a taxa de produção de ácido propiônico é significativamente influenciada pela concentração de extrato de levedura. Em batelada cíclica (CBF) com glicerol e extrato de levedura com concentrações de 60 e  $20 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente, a produção volumétrica de ácido propiônico foi de  $0,42 \text{ g / L h}$  e o rendimento foi de  $0,74 \text{ mol mol}^{-1}$ . Em batelada sequencial (SBF) diferentes relações glicerol/extrato de levedura foram utilizadas, sendo elas 60:20, 90:30, 120:40 e 150: 50. As respectivas produções volumétricas de ácido propiônico alcançadas foram: 1.47, 1.63, 1.13 e  $0,30 \text{ g / L h}$ . Usando a relação C/N ótima para a produção de ácido propiônico em batelada cíclica, a produtividade atingida foi de  $0,53 \text{ g / L h}$ . Além disso, fermentações em batelada sequencial com reciclo resultaram em taxa de produção acima de  $1 \text{ g / L h}$  com concentração inicial de glicerol de  $120 \text{ g L}^{-1}$ , e a máxima de  $1,63 \text{ g / L h}$  a partir de  $90 \text{ g L}^{-1}$  de glicerol.

Sendo assim, diante dos trabalhos apresentados, acredita-se que as divergências nos resultados deve-se a diferença de condições operacionais como tipo de reator,

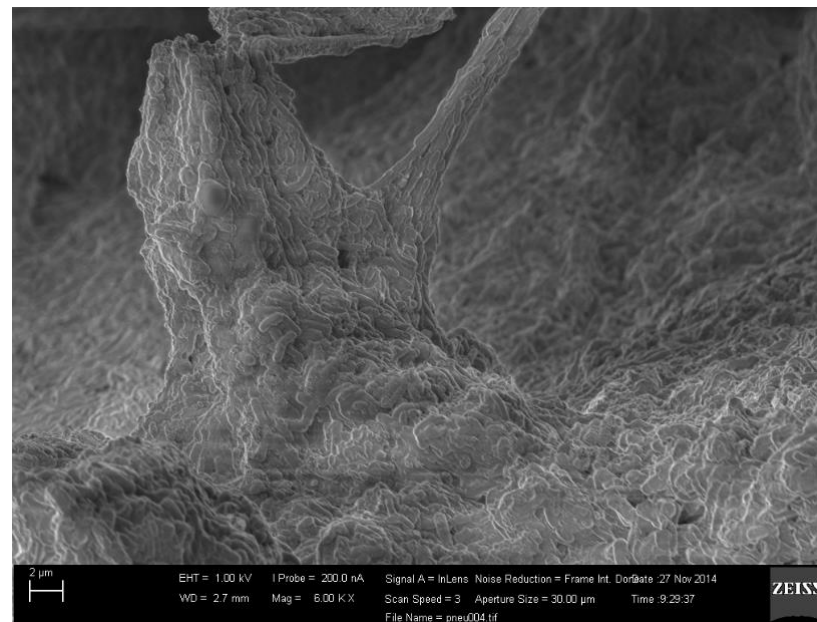
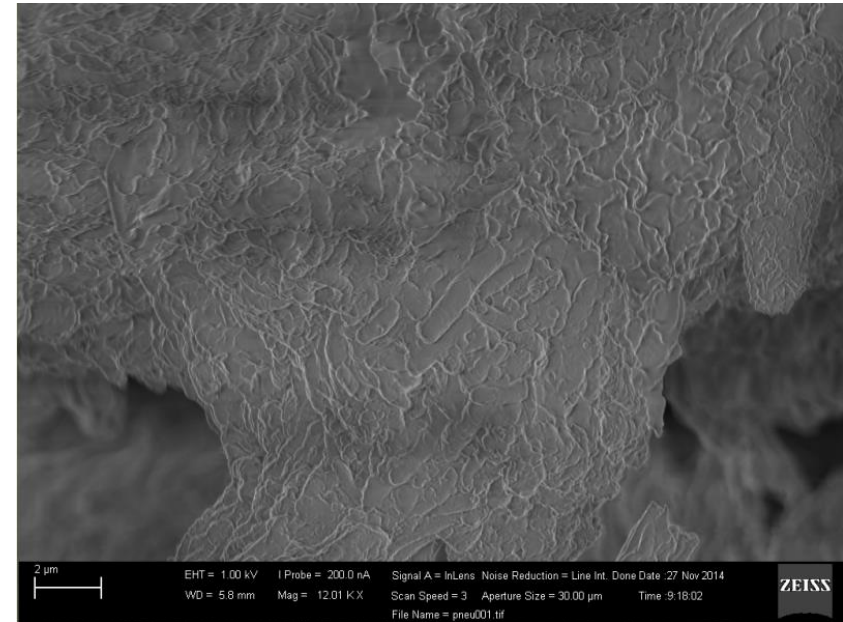
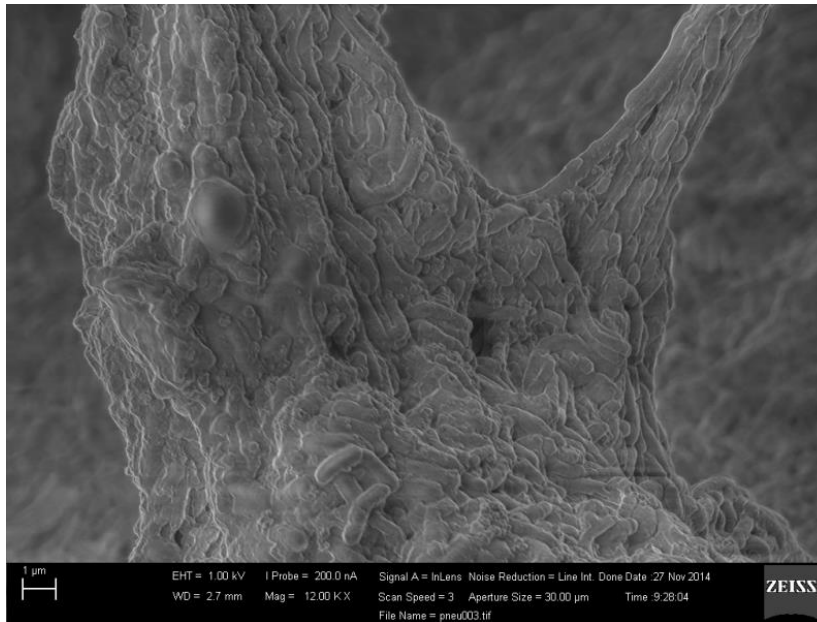
inóculo, nutrientes e concentração de glicerol, que podem ter favorecido a produção volumétrica de ácido propiônico.

### 5.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As imagens obtidas a partir das microscopias apresentadas mostram a morfologia da comunidade microbiana aderida às partículas de pneu triturado presente no interior do reator anaeróbio de leito fluidizado estudado nesta pesquisa. As partículas foram coletadas do reator na VI fase de operação, que representa o TDH de 0,5 h.

O intuito principal desta análise é verificar a adesão dos microrganismos na partícula e supor a presença de microrganismos específicos em função de sua forma estrutural. Entretanto, para saber precisamente a especificação dos microrganismos é necessária a análise de biologia molecular. Na Figura 5.9 a seguir, pode-se notar a presença de microrganismos semelhantes a bacilos, que são morfologias similares à *Clostridium* e *Klebsiella*, que são gêneros considerados produtores de hidrogênio e 1,3-propanodiol, respectivamente.

Figura 5-9: Microscopia eletrônica de varredura dos microrganismos aderidos às partículas de pneu no TDH de 0,5 h





## 5.6 Balanço de DQO

O balanço de DQO foi realizado através dos dados de DQO teórica dos metabólitos solúveis presentes no efluente, do glicerol remanescente e dos sólidos suspensos voláteis (SSV). A diferença entre a DQO teórica total e a DQO medida no reator são apresentadas na Tabela 5.14.

Tabela 5-13: **Balanço de DQO do RALF**

TDH (h)	DQO (mg L <sup>-1</sup> )											Dif %	
	EtOH	HAc	1,3-PD	HPr	HBu	HBu (Iso)	HVa	Glicerol	Efluente	SSV	DQO teórica		DQO medida
8	77,2	110,2	2157,8	5101,5	149,2	91,7	0	786,6	523,2	8997,3	8578,1	-419,2	-4,9
6	29,7	124,1	2142,8	4716,8	81,3	22,2	0	540,4	482,0	8139,3	7455,7	-683,7	-9,2
4	13,8	72,5	2030,0	4856,4	84,0	19,3	0	833,5	982,8	8892,3	7627,3	-1265,0	-16,6
2	79,2	99,9	494,5	2190,3	0	0	27,4	1082,6	605,7	4579,6	7603,8	3024,2	39,8
1	56,9	79,6	289,6	3129,7	0	0	0	879,0	684,0	5118,7	8015,8	2897,1	36,1
0,5	15,6	7,3	0	2044,4	17,0	19,7	0	3698,6	1180,5	6983,2	9593,2	2610,0	27,2

A partir do balanço de carbono realizado, pode-se notar que a DQO teórica total apresentou-se maior do que a DQO medida nos TDH de 8, 6 e 4 h, entretanto a diferença percentual entre elas apresenta-se relativamente baixa, podendo supor que tal diferença deve-se a erros experimentais. Tratando-se das fases referentes aos TDH de 2, 1 e 0,5 h, a DQO teórica apresentou-se maior do que a DQO medida. Este fato pode ser atribuído à presença de outros metabólitos presentes no efluente que não foram quantificados, portanto, não contabilizados neste balanço.

Reungsang et al. (2013b) avaliaram a produção simultânea de hidrogênio e etanol em batelada a partir de glicerol bruto (37 g L<sup>-1</sup>) utilizando *Enterobacter aerogenes* KKU-S1. A temperatura foi mantida em 37 °C e o pH inicial foi ajustado para 8. Os principais metabólitos detectados foram etanol, 1,3-propanodiol, 1-butanol, ácido acético e ácido propiônico. O balanço de DQO oscilou entre 0.8% para 10.8% de erro, o que indica que as medidas de metabólitos solúveis produzidos foram precisas.

## 6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos nas fases operadas do RALF utilizado para produzir ácido propiônico, 1,3-propanodiol, H<sub>2</sub> a partir da fermentação do glicerol por cultura mista de microrganismos, pôde-se concluir:

1. Houve a predominância de ácido propiônico em todas as fases analisadas, seguido de 1,3-propanodiol. A porcentagem molar e a concentração máxima atingida de ácido propiônico foram de 69,1 % (TDH de 4 h) e 5,1 g L<sup>-1</sup> (TDH 8 h), respectivamente. Para 1,3-propanodiol, a porcentagem molar e a concentração máxima atingida foram de 29,4 % (TDH de 6 h) e 2,14 g L<sup>-1</sup> (TDH 6 h), respectivamente.
2. A eficiência de conversão de substrato atingiu valores elevados, obtendo a maior conversão (89,83 %) no TDH de 6 h e o valor mínimo de 33,3 no TDH de 0,5 h.
3. O máximo conteúdo de H<sub>2</sub> atingido foi de 81,21 ± 13,5% (TDH de 0,5 h). Durante toda a etapa experimental não houve produção volumétrica de hidrogênio, exceto no início das fases IV, V e V, com duração aproximada de 1 semana. A produção volumétrica máxima atingida foi no TDH de 1 h (13,18 mL L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>).
4. O máximo rendimento e produtividade de ácido propiônico e 1,3-propanodiol foram: 2,1 mol/mol (TDH de 8 h) e 4,09 g/L h (TDH de 0,5 h) para ácido propiônico e 0,82 mol/mol (TDH de 8 h) e 0,51 g/L h (TDH de 4 h) para 1,3-propanodiol.
5. O pneu apresentou-se como um eficiente meio suporte de imobilização da biomassa já que durante toda a etapa experimental, elevados rendimentos de metabólitos foram atingidos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, M.L. *Filtração de Gases em Filtros de Tecido: Deposição e Remoção da Camada de Pó Formada*. São Carlos. Tese (Doutorado). Universidade Federal de São Carlos, 1995.

AINALA, S.K; ASHOK, S; KO, Y; PARK, S. Glycerol assimilation and production of 1,3-propanediol by *Citrobacter amalonaticus* Y19. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 97 p. 5001–5011, 2013.

AMORIM, E.L. *Efeito da concentração de glicose e da alcalinidade da produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidizado*. São Carlos. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, 2009.

AMORIM, E.L.; BARROS, A.R.; DAMIANOVIC, M.H.R.Z.; SILVA, E.L. Anaerobic fluidized bed reactor with expanded clay as support for hydrogen production through dark fermentation of glucose. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.34 p.783-790, 2009.

ANP – Agência Nacional do Petróleo, 2012. Disponível em: [www.anp.gov.br/?id=470](http://www.anp.gov.br/?id=470). Acessado em: 20 Setembro 2013.

AQUINO, S.F.; CHERNICHARO, C.A.L. Acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGVs) em reatores anaeróbios sob estresse: causas e estratégias de controle. *Engenharia Sanitária Ambiental*, vol. 10, n° 2, p. 152-161, 2005.

ARRUDA, P. V. de; RODRIGUES, R. de C. L. B.; FELIPE, M. das G. de A. Glicerol : um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. *Revista Analytica*, n.26, p. 56–62, 2007.

BARBIRATO, F.; GRIVET, J.P; SOUCAILLE, P; BORIES. A. 3-Hydroxypropionaldehyde, an Inhibitory Metabolite of Glycerol Fermentation to 1,3-Propanediol by Enterobacterial Species. *Applied and environmental microbiology*. p. v.63 n°4 p. 1448–1451, 1996.

BARBIRATO, F; CHEDAILLE, D; BORIES, A. Propionic acid fermentation from glycerol: comparison with conventional substrates. *Applied Microbiol Biotechnology*. v. 47, p.441- 446, 1997.

BARROS, A.R. *Influência de diferentes materiais suporte na produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidizado*. São Carlos. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de São Carlos, 2009.

BARTACEK, J; ZABRANSJA, J; LENS, P.N. Developments and constraints in fermentative hydrogen production. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, v.1 p.201-214, 2007.

BEATRIZ, A; ARAÚJO, Y.J.K; LIMA, D.P. Glicerol: um breve histórico e aplicação em sínteses estereosseletivas. *Química. Nova*, v. 34, no. 2, p. 306-319, 2011.

BERNAL, M.; TINOCO, L. K.; TORRES, L.; MALAGÓN-ROMERO, D. and MONTROYA, D. Evaluating Colombian *Clostridium* spp. strains' hydrogen production using glycerol as substrate. *Electronic Journal of Biotechnology*, vol. 16, no. 2, 2013.

BIEBL, H. Fermentation of glycerol by *Clostridium pasteurianum*-batch and continuous culture studies. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, v.27 p.18-26, 2001.

BIEBL, H.; MARTEN, S.; HIPPE, H.; DECKWER, W.D. Glycerol conversion to 1,3-propanediol by newly isolated clostridia. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.36, n5, p.592-597, 1992.

BIEBL, H; MENZEL, K; ZENG, A.P; DECKWER, W.D. Microbial production of 1,3-Propanediol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 52 p. 289-297, 1999.

BIODIESELBR – Referência Mundial sobre o biodiesel, 2009. Disponível em: <http://www.biodieselbr.com/biodiesel/brasil/biodiesel-brasil.htm>. Acessado em 09 Setembro 2013.

BOENIGK, R; BOWIEN, S; GOTTSCHALK, G. Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol in continuous cultures of *Citrobacter freundii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 38 p. 453-457, 1993.

BÓRIO, M. *Produção de hidrogênio e metabólitos em reator anaeróbio de leito fluidizado e em reator de leito granular expandido a partir de glicerol*. São Carlos Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de São Carlos, 2104.

CHENG, K\_K; ZHANG, J-A; DE-HUA LIU B, YAN SUN, HONG-JUAN LIU, MING-DE YANG, JING-MING XU. Pilot-scale production of 1,3-propanediol using *Klebsiella pneumoniae*. *Process Biochemistry* v. 42 p. 740–744, 2007.

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

CHOOKAEW, T.A; O-THONG, S.B; PRASERTSAN, P. Fermentative production of hydrogen and soluble metabolites from crude glycerol of biodiesel plant by the newly isolated thermotolerant *Klebsiella pneumoniae* TR17. *International Journal of hydrogen energy* v.37 p. 1331-13322, 2012.

CORAL, J; KARP, S.G; VANDENBERGHE, L.P.S; PARADA, J.L; PANDEY, A; SOCCOL, C.R. Batch Fermentation Model of Propionic Acid Production by *Propionibacterium acidipropionici* in Different Carbon Sources. *Applied Microbiol Biotechnology*. v. 151, p.333–341, 2008.

COSTA, J.B. *Produção biotecnológica de hidrogênio, etanol e outros produtos a partir do glicerol da reação de formação do biodiesel*. (Dissertação de Mestrado). Porto alegre: UFRGS, 2010.

COSTA, P.R; ROSSI, L.F; ZAGONEL, G.F; RAMOS, L.P. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. *Química nova* v.23 n°4, 2000.

DA SILVA, G.P. *Bioconversão do glicerol em 1,3-propanediol pela bactéria klebsiella pneumoniae* GLC29. Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2010.

- DA SILVA, G.P; CONTIERO, J; ÁVILA NETO, P.M; LIMA, C.J.B. 1,3-Propanediol: Produção, Aplicações e potencial biotecnológico. *Química Nova*, v.37. n° 3 p.527-534, 2014.
- DA SILVA, G.P; MACK, M; CONTIERO, J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advances*. v. 27 p. 30–39, 2009.
- DABROCK, B; BAHL, H; GOTTSCHALK, G. Parameters Affecting Solvent Production by *Clostridium pasteurianum*. *Applied and environmental microbiology*, p. 1233-1239, 1992.
- DE SÁ, L.R.V. *Produção biológica de hidrogênio por bactérias fermentativas utilizando diferentes carboidratos ou glicerina como substrato*. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2011.
- DE SÁ, L.R.V. *Produção biológica de hidrogênio por bactérias fermentativas utilizando diferentes carboidratos ou glicerina como substrato*(Dissertação de mestrado). Rio de Janeiro: UFRJ, 2011.
- DEL NERY, V. *Utilização de lodo anaeróbio imobilizado em gel no estudo da partida de reatores de fluxo ascendente com manta de lodo*. São Carlos. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 1987.
- DIETZ, D; ZENG, A-P. Efficient production of 1,3-propanediol from fermentation of crude glycerol with mixed cultures in a simple medium. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 37 p. 225–233, 2014.
- DILLIS, S.S.; APPERSON, A; SCHMIDT, M.R.; SAIER, M.H. Carbohydrate transport in bacteria. *Microbiological Reviews*, v.44 p. 385-418, 1980.
- 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.
- DISHISHA, T; IBRAHIM, M.H.A; CAVERO, V.H; ALVAREZ, M.T; HATTI-KAUL. Improved propionic acid production from glycerol: Combining cyclic batch- and sequential batch fermentations with optimal nutrient composition. *Bioresource Technology* v.176, p. 80–87, 2015.
- DROZDZYNSKA, A; PAWLICKA, J; KUBIAK, P; KOSMIDER, A; PRANKE, D; OLEJNIK-SCHMIDT, A; CZACZYK, K. Conversion of glycerol to 1,3-Propanediol by *Citrobacter freundii* and *Hafnia alvei* – newly isolated strains from the Enterobacteriaceae. *New Biotechnology*. v. 31. n° 5, 2014.
- FERRARI, R.A.; OLIVEIRA, V.S.; SCABIO, A. Biodiesel de Soja – Taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico - química e consumo em gerador de energia. *Química Nova*, v. 28 p. 19-23, 2005.
- FERREIRA, J.D.S. *Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidizado a partir de glicerol bruto sob condições termofílicas*. São Carlos. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de São Carlos, 2014.

- GALLARDO, R; FARIA, C; RODRIGUES, L.R; PEREIRA, M.A; ALVES, M.M. Anaerobic granular sludge as a biocatalyst for 1,3-propanediol production from glycerol in continuous bioreactors. *Bioresource Technology* v. 155 p. 28–33, 2014.
- GONÇALVES, B. R. L.; PEREZ, L.; ÂNGELO, A. C. D. Glicerol: Uma Inovadora fonte de Energia Proveniente da Produção de Biodiesel. INTERNATIONAL WORKSHOP ADVANCES IN CLEANER PRODUCTION. *Anais...* p.1–6, 2009.
- GONEN C; GUNGORMUSLER, M; AZBAR, N. Comparative Evaluation of Pumice Stone as an Alternative Immobilization Material for 1,3-Propanediol Production from Waste Glycerol by Immobilized *Klebsiella pneumoniae*. *Appl Biochem Biotechnol* v.168 p. 2136–2147, 2012.
- GONEN C; GUNGORMUSLER, M; AZBAR, N. Continuous production of 1,3-propanediol using waste glycerol with *clostridium beijerinckii* NRRL B-593 immobilized on glass beads and glass rushing rings. *Chemical and Biochemical Engineering*. v. 27 (2) 227–234, 2013.
- GONEN C; GUNGORMUSLER, M; OZDEMIR, G; AZBAR, N 1,3-Propanediol production potential of *Clostridium saccharobutylicum* NRRL B-643. *New Biotechnology* v.27 (6), 2010.
- HARADA, P.K. Produção de ácido propiônico por fermentação submersa utilizando glicerol e melão de cana como fontes de carbono. Curitiba. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Paraná, 2012.
- HE, H; GONG, C.S; TSAO, G.T. Production of 1,3-Propanediol by *Klebsiella pneumoniae*, *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v. 98 p. 687-698, 2002.
- HIMMI E. H; BORIES, A; BOUSSAID, A; HASSANI, L. Propionic acid fermentation of glycerol and glucose by *Propionibacterium acidipropionici* and *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*. *Applied Microbiol Biotechnology*. v.53 p. 435-440, 2000.
- HIMMI, E.H; BORIES, A; BARBIRATO, F. Nutrient requirements for glycerol conversion to 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*. *Bioresource Technology*, v.67, p. 123-128, 1999.
- HOMANN, T; TAG, C; BIEBL, H. WOLF-DIETER DECKWER; BERNHARD SCHINK. Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol by *Klebsiella* and *Citrobacter* strains. *Applied and microbiology biotechnology*, v. 33(2) p. 121-126, 1990.
- HONG, A; CHENG, K-K; PENG, F; ZHOU, S; SUN, Y; LIU, C-M; LIU, D-H. Strain isolation and optimization of process parameters for bioconversion of glycerol to lactic acid. *Journal Chemical Technological Biotechnology*, v.84 p. 1576-1581, 2009.
- HONG, E; YOON, S; KIM, J; KIM, E; KIM, D; RHIE, S; RYU, Y-W. Isolation of microorganisms able to produce 1,3-propanediol and optimization of medium constituents for *Klebsiella pneumoniae* AJ4. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 36 p.835–843, 2013.
- ITO, T; NAKASHIMADA, Y; SENBA, K; MATSUI, T; NISHIO, N. Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. *Journal of bioscience and bioengineering*. v.100 (3), p. 260–265, 2005.

- KAUR, G.; SRIVASTAVA, A.K.; CHAND.S. Advances in biotechnological production of 1,3-propanediol. *Biochemical Engineering Journal*, v. 64, p. 106–118, 2012.
- KHANNA, S; SHUKLA, A.K; GOYAL, A; MOHOLKAR, V.S. Alcoholic Biofuels Production from Biodiesel Derived Glycerol by *Clostridium pasteurianum* Whole Cells Immobilized on Silica. *Waste and Biomass Valorization*, v.5, p. 789-798, 2014.
- KIVISTO, A.; SANTALA, V.; KARP, M. Closing the 1,3-propanediol route enhances hydrogen production from glycerol by *Halanaerobium saccharolyticum* subsp. *Saccharolyticum*. *International journal of hydrogen energy*, v. 36, p.7074-7080, 2011.
- LIU, B; CHRISTIANSEN, K; PARNAS, R; BAIKUN, Z.X. Optimizing the production of hydrogen and 1,3- propanediol in anaerobic fermentation of biodiesel glycerol. *International Journal of hydrogen energy* v.38, p. 3196-3205, 2013.
- LO, Y-C. Dark fermentative hydrogen production with crude glycerol from biodiesel industry using indigenous hydrogen-producing bacteria. *International journal of hydrogen energy*, v.38 p. 15815-15822, 2013.
- LO, Y-C; CHEN, J-X; HUANG, C-Y; YUAN,Y-J; CHANG, J-S. Dark fermentative hydrogen production with crude glycerol from biodiesel industry using indigenous hydrogen-producing bacteria *International Journal of hydrogen energy* v.38 p. 15815-315822, 2013.
- MOHAN, S.V.; BABU, V.L.; SARMA, P.N. Anaerobic biohydrogen production from dairy wastewater treatment in sequencing batch reactor (AnSBR): Effect of organic loading rate. *Enzyme and Microbial Technology*, v.41 p. 506-515, 2007.
- MOON, C; LEE, C.H; SANG, B-I; UM, Y. Optimization of medium compositions favoring butanol and 1,3-propanediol production from glycerol by *Clostridium pasteurianum*. *Bioresource Technology*, v.102, p.10561–10568, 2011.
- MOTA, C.J; DA SILVA, C. X; GONÇALVES, V. L. C. Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. *Química Nova* v.32 (3), 2009.
- NAKASHIMADA, Y.; RACHMAN, M.A.; KAKIZONO, T.; NISHIO, N. Hydrogen production of *Enterobacter aerogenes* altered by extracellular and intracellular redox states. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.27, p.1399-1405, 2002.
- NATH, K; KUMAR, A; DAS, D. Hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* strain O.U.001 using spent media of *Enterobacter cloacae* strain DM11. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.68, p.533-541, 2005.
- 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*, 36: 5836-5842, 2011.
- OH, B-R; HONG, W-K; HEO, S-Y; LUO, L.H; KONDO, A; SEO, J-W; KIM, C.H. The production of 1,3-propanediol from mixtures of glycerol and glucose by a *Klebsiella pneumoniae* mutant deficient in carbon catabolite repression. *Bioresource Technology*, v.130, p.719–724, 2013.

OH, B-R; SEO, J-W; CHOI, M-H; KIM, C-H. Optimization of Culture Conditions for 1,3-Propanediol Production from Crude Glycerol by *Klebsiella pneumoniae* Using Responde Surface Methodology. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. v. 13 p. 666-670, 2008.

PESTANA, M.; GANGHIS, D. Apostila de tratamento de efluentes. CEFET/BA. 2009

PFLUGL, S; MARX, H; MATTANOVICH, D; SAUER, M. 1,3-Propanediol production from glycerol with *Lactobacillus diolivorans*. *Bioresource Technology* v.119 p. 133-140, 2012.

RAMOS, L. P.; In: *Anais do Congresso Brasileiro de Soja*; Centro Nacional de Pesquisa de Soja; Empresa Nacional de Pesquisa Agropecuária; Londrina, PR, 17 a 20 de maio, 1999; p. 233.

REIS, C.M. *Efeito da velocidade ascensional e do tempo de detenção hidráulica na produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidizado*. São Carlos. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de São Carlos, 2010.

REIS, C.M; Silva, E.L. Effect of upflow velocity and hydraulic retention time in anaerobic fluidized-bed reactors used for hydrogen production. *Chemical Engineering Journal*, v. 172 p. 28-36, 2011.

REUNGSANG, A.; SITTIJUNDA, S.; O-THONG, S. Bio-hydrogen production from glycerol by immobilized *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 on heat-treated UASB granules as affected by organic loading rate. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.38, n.17, 6970-6979, 2013a.

REUNGSANG, A; SITTIJUNDA, S; ANGELIDAKI, I. Simultaneous production of hydrogen and ethanol from waste glycerol by *Enterobacter aerogenes* KKU-S1. *International Journal of hydrogen energy* v.38 p. 1813-1825, 2013b.

RIVALDI, J.D.; SARROUH, B.F.; FIORILO, R.; DA SILVA, S.S. Glicerol do Biodiesel - Estratégias biotecnológicas para o aproveitamento do glicerol gerado da produção de biodiesel. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, v. 37 p44-50, 2008.

RODRIGUEZ, M.A.A. *Biotransformação do glicerol – subproduto da produção de biodiesel*. Maringá. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Maringá, 2010.

ROSSI, D.M. *Produção Biotecnológica de Hidrogênio, 1,3-Propanodiol e etanol utilizando glicerol residual proveniente da síntese de biodiesel*. Porto Alegre. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2012.

SAKAI, S.; YAGISHITA, T. Microbial production of hydrogen and ethanol from glycerol-containing wastes discharged from a biodiesel fuel production plant in a bioelectrochemical reactor with thionine. *Biotechnol Bioeng journal*, v. 98(2), p.340-8, 2007.

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



SATTAYASAMITSATHIT, S; METHACANON, P; PRASERTAN, P. Enhance 1,3-propanediol production from crude glycerol in batch and fed-batch fermentation with two-phase pH-controlled strategy. *Electronic Journal of Biotechnology*. v. 14(6), 2011.

SATTAYASAMITSATHIT, S; PRASERTSAN, P; METHACANON, P. Statistical optimization for simultaneous production of 1,3-propanediol and 2,3-butanediol using crude glycerol by newly bacterial isolate. *Process Biochemistry* v.46, p. 608–614, 2011

SCARAMUZZO, M. *Consumo de biodiesel cresce no país. 2001*. Disponível em: <http://www.biodieselbr.com/noticias/em-foco/consumo-biodiesel-cresce-pais-270111.htm>. Acesso em: 08/10/2013.

SELEMBO, PRISCILLA A; PEREZ, JOE M.; LLOYD, WALLIS A; LOGAN, BRUCE E. Enhanced hydrogen and 1,3-propanediol production from glycerol by fermentation using mixed cultures. *Biotechnology and Bioengineering*. v. 104 (6), 2009.

SHIDA, G.M. *Produção de hidrogênio e ácidos orgânicos por fermentação acidogênica em reator anaeróbio de leito fluidizado*. São Carlos. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, 2008.

SILVEIRA, R.F. *Produção de etanol por leveduras em biorreatores com células livres e imobilizadas utilizando soro de queijo*. Porto Alegre. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

SITTIJUNDA, S; REUNGSANG, A. Media optimization for biohydrogen production from waste glycerol by anaerobic thermophilic mixed cultures. *International journal of hydrogen energy*, v. 37, p. 15473-15482, 2012.

SURATAGO, T; NOOTONG, K. Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* in an anaerobic moving bed bioreactor. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, v. 31(2), p. 245–253, 2012.

TEMUDO, M. F; MUYZER, G; KLEEREBEZEM, R; VAN LOOSDRECHT; MARCK C. M. Diversity of microbial communities in open mixed culture fermentations: impact of the pH and carbon source. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.80, p. 1121-1130, 2008.

TONG, I.T; LIAO, H.H; CAMERON, D.C. 1,3-propanediol production by *Escherichia coli* expressing genes from the *Klebsiella pneumoniae* dha regulon. *Applied and environmental microbiology*, v.57, p. 3541-3546,1991.

VIANA, M.B. *Produção de biogás a partir de glicerol oriundo de biodiesel*. São Carlos. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, 2011.

WALKER, M.; ZHANG, Y.; HEAVEN, S.; BANKS, C. Potential errors in the quantitative evaluation of biogas production in anaerobic digestion processes. *Bioresource Technology* v. 100(24), p. 6339-6346, 2009.

WANG, Z.; YANG, S.T. Propionic acid production in glycerol/glucose co-fermentation by *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*. *Bioresource Technology*, v. 137, p. 116-123, 2013.

YAZDANI, S.S.; GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 18 p.213-219, 2007.

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

ZENG, A.P.; BIEBL, H. Bulk chemicals from biotechnology: the case of 1,3-propanediol production and the new trends. *Advances in Biochemical Engineering*, v. 74, p. 239–259, 2002.

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

ZHANG, G-L; MA, B-B; XU, X-L; LI, C; WANG, L. Fast conversion of glycerol to 1,3-propanediol by new strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Biochemical Engineering Journal*, v. 37 p. 256-260, 2007.

ZHENG, Z.M.;HU, Q.L.; HAO, J.; XU,F.; GUO, N.N.; SUN,Y.; LIU, D.H. Statistical optimization of culture conditions for 1,3-propanediol by *klebsiella pneumoniae* AC 15 via central composite design. *Bioresource*

ZHU, Y; LI, J; TAN, M; LIU, L; JIANG, L; SUN, J; LEE, P; DU, G; CHEN, J. Optimization and scale-up of propionic acid production by propionic acid-tolerant *Propionibacterium acidipropionici* with glycerol as the carbon source. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 8902–8906, 2010.