

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

Produção de Hidrogênio em Reator Anaeróbico de Leito
Fluidizado a partir de glicerol bruto sob condições termofílicas

Janaína dos Santos Ferreira

São Carlos

2014

Produção de Hidrogênio em Reator Anaeróbio de Leito
Fluidizado a partir de glicerol bruto sob condições termofílicas

Janaína dos Santos Ferreira

Dissertação apresentada ao
Programa de 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

2014

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

F383ph Ferreira, Janaína dos Santos.
Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito
fluidizado a partir de glicerol bruto sob condições
termofílicas / Janaína dos Santos Ferreira. -- São Carlos :
UFSCar, 2014.
107 f.

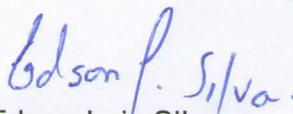
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2014.

1. Engenharia química. 2. Reator anaeróbio de leito
fluidizado. 3. Produção de hidrogênio. 4. Etanol. 5. Glicerol.
6. Biodiesel. I. Título.

CDD: 660 (20^a)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE **JANAÍNA DOS SANTOS FERREIRA** APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 25 DE MARÇO DE 2014.

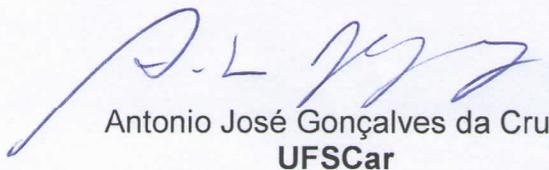
BANCA EXAMINADORA:



Edson Luiz Silva
Orientador, UFSCar



Simone Damasceno Gomes
UNIOESTE



Antonio José Gonçalves da Cruz
UFSCar

Aos que me ensinaram a
amar respeitar: meus pais
Maria e Rubens.

“Que ninguém se engane, só se consegue a simplicidade através de muito trabalho.”

Clarice Lispector

AGRADECIMENTOS

À DEUS por me iluminar nessa importante etapa da minha vida e sempre me mostrar o melhor caminho a seguir.

À minha família, principalmente, minha mãe (Maria Nacilda Oliveira dos Santos Ferreira), meu pai (Rubens dos Santos Ferreira) e meu irmão (Rafael dos Santos Ferreira), pois foram eles que sempre me incentivaram e me apoiaram. AMO VOCÊS!

Ao meu noivo e futuro marido, Paulo Henrique de Souza Gines, pela paciência, orientação, compreensão nas horas mais difíceis. AMO VOCÊ!

Ao Prof. Dr. Edson Luiz Silva, pela confiança em meu trabalho, pela ORIENTAÇÃO, e pelo respeito e afinidade que sempre tivemos um com o outro. MUITO OBRIGADO POR TUDO!

À minha “irmã” Morgana Bosio, um exemplo de competência e determinação. Conhecemos-nos no dia da matrícula do mestrado e a partir deste dia construímos uma linda e sincera amizade.

As colegas de laboratório: Mariana Carosia, Carolina Zampol Lazaro, Paula Rubia Ferreira Rosa, Cristiane Marques dos Reis, Lívia Ottaviano e Samantha Santos, tanto pelos ensinamentos durante o trabalho quanto pelos momentos de descontração.

“Aos técnicos Oscar Silva e Adilson nossos verdadeiros” ENGENHEIROS” pela montagem e manutenção dos reatores, entre outras coisinhas.

Ao Departamento de Engenharia Química da UFSCar pelo apoio técnico em geral e pela oportunidade.

À Maria Angela Adorno (Janja) pela paciência nos ensinamentos para com o cromatógrafo nos quais foram realizadas as análises de ácidos.

Aos professores: Marcelo Zaiat e Sandra Maintinguer pelas sugestões no exame de Qulificação.

Ao Técnico Amadeus do Departamento de Engenharia Química da UFScar pelas análises de 1,3-propanodiol e etanol.

Ao grupo do Laboratório de Processos Biológicos do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC-USP, pela paciência e ajuda com as análises.

À CAPES e FAPESP, pelo apoio financeiro e pela manutenção e investimento no Laboratório de Controle Ambiental II do Departamento de Engenharia Química da UFScar.

À todos funcionários da limpeza que alegravam os dias de trabalho sempre que possível.

Aos amigos novos e de longa data que me acompanharam durante todo meu trabalho e os quais respeito e considero muito: Jorge Augusto Burak, Camila Cumani Pavezzi, Letícia Pedroso de Brito, Juliana Foltin, Lara Minéia Fernandes, Gabriel Moya e Lais Borges Reis.

A todos que me acompanharam durante essa minha conquista porém não foram lembrados nesse agradecimento.

SUMÁRIO

LISTAS DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABELAS	X
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	XI
RESUMO	XII
ABSTRACT	XIII
1.INTRODUÇÃO.....	14
2.OBJETIVOS.....	17
2.1. OBJETIVO GERAL.....	17
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3.REVISÃO BIBLIOGRAFICA	18
3.1. BIOENERGIA E BIOCOMBUSTÍVEL NO MUNDO E NO BRASIL.....	18
3.2.1. PARÂMETROS QUE INFLUENCIAM NA PRODUÇÃO DE H ₂	22
3.2.1.1. pH	23
3.2.1.2. TDH.....	25
3.2.1.3. Substrato	26
3.2.1.4. Temperatura.....	27
3.3. GLICEROL COMO SUBSTRATO PARA PRODUÇÃO DE H ₂	28
3.3.3. PRODUÇÃO BIOLÓGICA DE HIDROGÊNIO E METABÓLITOS A PARTIR DE GLICEROL	32
3.3.4. FERMENTAÇÃO DO GLICEROL: ROTAS METABÓLICAS	37
3.3.4.1. FERMENTAÇÃO POR DIFERENTES MICRORGANISMOS	37
3.3.4.2. Rendimento Teórico de H ₂ na fermentação do Glicerol.....	40
3.4. RENDIMENTO DE H ₂ , ETANOL E 1,3-PROPANODIOL A PARTIR DO GLICEROL.....	42
3.5. REATOR ANAERÓBIO DE LEITO FLUIDIZADO (RALF).....	47
3.6. PRODUÇÃO DE H ₂ SOB CONDIÇÕES TERMOFÍLICAS	49
3.6.1. Avaliação de Diferentes Substratos	49
3.6.2. Glicerol como Substrato	50
3.7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
4.MATERIAIS E MÉTODOS.....	56
4.1. REATOR ANAERÓBIO DE LEITO FLUIDIZADO (RALF).....	57
4.1. MATERIAL SUPORTE	58
4.2. SUBSTRATO	59
4.3. Lodo.....	62
4.4. Operação do Reator anaeróbio de leito fluidizado	63
4.5. MÉTODOS ANALÍTICOS	64
4.5.1. Volume de gás produzido	64
4.5.2. Composição de Biogás	65

4.5.3. Determinação do Consumo de Glicerol.....	65
4.5.4. Demais Análises Físico-químicas.....	65
4.5.5. Determinação de ácidos orgânicos voláteis.....	66
4.5.6. Determinação de 1,3-propanodiol e Etanol.....	66
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
5.1. EFICIÊNCIA NA CONVERSÃO DE GLICEROL.....	69
5.2. COMPORTAMENTO E EFEITO DO PH NA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO	71
5.3. REMOÇÃO DE DQO	75
5.4. GLICEROL BRUTO COMO SUBSTRATOS: PRINCIPAIS METABÓLITOS	77
5.5. PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO	82
5.5.1. Quantidade de H ₂ no Biogás	82
5.5.2. Rendimento de H ₂ em função do substrato	84
5.5.3. Produção Volumétrica de Hidrogênio	88
5.6. RENDIMENTO DOS PRINCIPAIS METABÓLITOS PRODUZIDOS	93
5.7. BALANÇO DE CARBONO.....	93
6. CONCLUSÕES	96
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97

LISTAS DE FIGURAS

Figura 3.1: Participação das fontes de energias consumidas no mundo. Fonte: Adaptada de KUMAR et al. (2010).	18
Figura 3.2: Participações, em porcentagens, de fontes de energia na oferta total de energia primária global em 2008. Fonte: KUMAR et al. (2010); IPCC (2012).	19
Figura 3.3: Resumo das principais fontes de biomassa, processos de conversão, e produtos finais associados a biorrefinaria. Fonte: SRIRANGAN et al. (2012).	20
Figura 3.4: Desenvolvimento do mercado mundial de biodiesel. Fonte: OECD e FAO Secretaria.....	28
Figura 3.5: Esquema de produção de biodiesel a partir da transesterificação de óleo vegetal (MOTA et al., 2009).....	29
Figura 3.6: Utilização da glicerina pura no setor industrial Fonte: Adaptada de MOTA et al. (2009).	31
Figura 3.7: Vias Bioquímicas da fermentação de glicerol (BIEBL et al., 1999).....	38
Figura 3.8: Produtos finais da fermentação de glicerol por diferentes microrganismos (Da SILVA et al., 2009).	40
Figura 4.1: Fluxograma geral do experimento realizado.	56
Figura 4.2: Esquema ilustrativo da instalação do reator anaeróbio de leito fluidizado.....	57
Figura 4.3: Reator anaeróbio de leito fluidificado termofílico.....	57
Figura 4.4: Argila expandida para utilização como suporte para aderência das populações microbianas.	58
Figura 4.5: Fluxograma da produção de Biodiesel.....	60
Figura 4.6: Reator UASB termofílico utilizado no tratamento de vinhaça na Usina São Martinho, Pradópolis, SP.	63
Figura 5.1: Concentração e conversão médias de glicerol em função do TDH.	69
Figura 5.2 Comportamento do pH afluente e efluente e respectivos desvios-padrão para glicerol bruto em função do TDH.	72
Figura 5.3: Rendimento de H ₂ em função do pH e TDH.	74
Figura 5.4: Conversão de substrato e quantidade de H ₂ no biogás em função do pH e TDH.	74
Figura 5.5: Eficiência na remoção de DQO para glicerol bruto em função do TDH.	76
Figura 5.6: Porcentagens do total de Metabólitos produzidos na fermentação de glicerol bruto em função do TDH.	77
Figura 5.7: Relação entre o rendimento de H ₂ e porcentagens molar de Etanol e 1,3-Propanodiol.	79
Figura 5.8: Relação entre rendimento de H ₂ e porcentagem de Etanol e Ácido Propiônico.....	80
Figura 5.9: Comportamento da porcentagem de H ₂ no biogás em função do TDH.....	83
Figura 5.10: Comportamento do rendimento de H ₂ em função do TDH.	85
Figura 5.11: Rendimento de H ₂ e porcentagem de Etanol, Ácido butírico e Ácido acético em função do TDH.....	86
Figura 5.12: Comportamento da Produção volumétrica de H ₂ em função do TDH para glicerol bruto.	89
Figura 5.13: Conteúdo de H ₂ no biogás e PVH em função do TDH aplicado.	92

Figura 5.14: Conteúdo de H ₂ no biogás e HY em função do TDH aplicado.....	92
Figura 5.15: Rendimento dos principais metabólitos formados e de H ₂ durante a fermentação de glicerol para produção de H ₂	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Reservas globais e disponibilidade das principais fontes de energia fósseis.	19
Tabela 3.2: Benefícios potenciais e limitações tecnológicas dos biocombustíveis.....	21
Tabela 3.3: Diferentes valores de pH na produção de H ₂ reportados na literatura.....	24
Tabela 3.4: Principais Metabólitos reportados na literatura.....	34
Tabela 3.5: Rendimento de H ₂ , Etanol e 1,3-propanodiol dos principais trabalhos reportados na literatura a partir de glicerol e tipo de reator.	45
Tabela 3. 6: Faixas de temperaturas para produção de hidrogênio a partir de glicerol bruto e glicerina pura.....	52
Tabela 4.1: Características do meio suporte para imobilização da Biomassa.	59
Tabela 4.2: Características do glicerol utilizado nos experimentos.	61
Tabela 4.3: Composição da água residuária sintética a ser utilizada	62
Tabela 4.4: Condições operacionais impostas ao RALF termofílico para a produção de H ₂ a partir de glicerol bruto.....	64
Tabela 4.5: Análises de monitoramento do reator.....	66
Tabela 5.1: Valores Médios e seus respectivos desvios-padrão em função do TDH aplicado. ..	70
Tabela 5. 2: Valores médios de pH afluente e pH efluente para glicerol bruto.....	71
Tabela 5.3: Valores médios da eficiência na remoção de DQO para glicerol bruto.	75
Tabela 5.4: Balanço de Carbono em função da DQO _t e DQO _m	95
Tabela 5.5: Concentrações médias (mg.L ⁻¹) obtidas dos principais metabólitos produzidos em função do TDH em RALF para produção biológica de hidrogênio.	78
Tabela 5.7: Valores médios e desvios-padrão da porcentagem de H ₂ no biogás em função do TDH para glicerol.	82
Tabela 5.8: Valores médios de rendimento de H ₂ em função do TDH.	85
Tabela 5.9: Valores médios de produtividade volumétrica em função do TDH para glicerol bruto.	88
Tabela 5.10: Comparação entre o trabalho atual e os reportados na literatura da produtividade volumétrica de H ₂ a partir de glicerol bruto em reatores contínuos com diferentes tipos de inóculos e TDH.	91

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

DQO	Demanda Química de Oxigênio
EtOH	Etanol
HAc	Ácido Acético
HBu	Ácido Butírico
1,3-PD	1,3-propanodiol
HPr	Ácido Propiônico
RALF	Reator Anaeróbico de Leito Fixo
TDH	Tempo de Detenção Hidráulica
UASB	Reator Anaeróbico de Fluxo Ascendente e Manta de Lodo
CSTR	Reator Contínuo de Tanque Agitado
SMP	Soma dos Metabólitos Produzidos
PVH	Produção Volumétrica de Hidrogênio
HY	Rendimento de Hidrogênio
SSV	Sólidos Suspensos Voláteis
LCA	Laboratório de Controle Ambiental
LPB	Laboratório de Processos Biológicos

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar a influência do tempo de detenção hidráulica (TDH) sobre a produção de hidrogênio, utilizando glicerol bruto como substrato em reator anaeróbio de leito fluidizado (RALF). O reator possuía um volume de 1979 cm³, no qual se variou o TDH em oito fases: Fase I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII com os respectivos TDH de 14, 12, 10,8, 6, 4, 2, e 1 hora. A temperatura foi controlada à 55 °C, fixando a concentração no valor de 5 g.L⁻¹ de DQO. O inóculo utilizado foi proveniente de lodo granulado do reator termofílico anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB) para o tratamento de vinhaça, localizado na Usina São Martinho, Pradópolis-SP. Os resultados mostraram que o rendimento de hidrogênio (HY) permaneceu constante entre os TDH de 14h à 2h (1,2 e 1,4 mol H₂.mol glicerol⁻¹) e no TDH de 1h o rendimento foi maior (3 mol H₂.mol glicerol⁻¹). Já a produção volumétrica de H₂, sob a pressão de 1 atm e temperatura de 55 °C, teve aumento com a diminuição do TDH, sendo seu valor máximo de 1508,7 mL.h⁻¹.L⁻¹ no menor TDH aplicado (1h). O biogás teve como principais compostos CO₂ e H₂. A composição de H₂ no biogás variou com a diminuição do TDH de 14 para 2h (Fase I a VII) nas sete primeiras fases (14 a 2 h) atingindo um valor médio percentual entre 50 e 60 %. Na última fase, cujo TDH foi de 1h, o percentual de H₂ biogás atingiu o valor máximo de 70%. Os principais metabólitos obtidos durante as sete primeiras fases de operação dos reatores foram: ácido acético (4,5 a 18%), ácido butírico (4,3 a 21%), etanol (14 a 29%) e 1,3-propanodiol (34 a 50%). Já para o TDH de 1h nota-se a presença de ácido propiônico (56%), ácido acético (11,5%) e 1,3-propanodiol (30%).

Palavra-Chave: RALF, produção biológica de hidrogênio, Etanol, 1,3-propanodiol, glicerol, biodiesel

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the influence of the hydraulic retention time (HRT) on hydrogen production using crude glycerol as a substrate in an anaerobic fluidized bed reactor (AFBR). The reactor had a volume of 1979 cm³, which was varied HDT in eight stages: Stage I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII with HDT of 14, 12, 10,8, 6, 4, 2 and 1 hour. The temperature was controlled at 55 °C, fixing the substrate concentration in the amount of 5 gL⁻¹. The inoculum used was granular sludge from the thermophilic anaerobic reactor and upflow sludge blanket (UASB) for the treatment of vinasse, located at Usina São Martinho, Pradópolis - SP. The results showed that the yield of hydrogen (HY) remained constant between the HDT of 2h to 14h (1.2 H₂.mol glycerol and 1.4 mol⁻¹) HRT of 1h and the yield was higher (3 moles H₂ . glycerol mol⁻¹). The volumetric H₂ production was increased with decreasing HRT, with its maximum value of 1508.7 mL.h⁻¹.L⁻¹ in lower applied TDH (1h). The biogas produced was composed of CO₂ and H₂. The composition varied with the decrease in HRT from 14 to 2h (Step I-VII) in the first seven stages (14 to 2 h), reaching a mean rate between 50 and 60%. In the last phase, which HRT was 1h, the percentage of H₂ biogas reached the maximum value of 70%. The major metabolites obtained during the first seven stages of operation of the reactor were: Acetic acid (4.5 to 18%), butyric acid (4.3 to 21%), ethanol (14 to 29%) and 1,3-propanediol (34 to 50%). As for 1h note the HDT of the presence of propionic acid (56%), acetic acid (11.5%) and 1,3-propanediol (30%).

Keywords: anaerobic fluidized bed reactor, 1,3-propanediol biological production of hydrogen, ethanol, glycerol, biodiesel

1. INTRODUÇÃO

Fontes de energia renovável demonstram um grande potencial para mitigar os problemas dos gases do efeito estufa a partir da queima de combustíveis fósseis. Mundialmente, situações como o aumento nos preços dos combustíveis fósseis, o esgotamento da disponibilidade de fontes não renováveis e a poluição (TIWARI e PANDEY, 2012), tornam necessária a mudança de paradigma frente às preocupações ambientais e socioeconômicas (DOVI et al., 2009; SRIRANGAN et al., 2012).

O hidrogênio vem sendo considerado uma fonte energética promissora para o futuro, pois além de ser considerado um combustível limpo tem um alto valor energético (122 kJ/g) (LAY et al., 1999). Em 2025 estima-se que a contribuição do hidrogênio para o mercado global de energia chegará a ser de 8 a 10%, e que em 2040 haverá veículos movidos a hidrogênio em todos os estados americanos.

Dentre às formas de produção de hidrogênio, a de origem biológica surge como boa alternativa em virtude do custo financeiro e energético. Há três processos biológicos principais para a produção de hidrogênio: biofotólise direta e indireta, fotofermentação e fermentação acidogênica (NATH e DAS 2004).

Atualmente, os dois principais biocombustíveis líquidos utilizados no Brasil são: o etanol e o biodiesel, sendo que o consumo deste último vem crescendo demasiadamente (PEREIRA et al., 2012). Entre janeiro de 2008 e janeiro de 2010 a adição do biodiesel ao diesel passou de 2% para 5% (PEREIRA et al., 2012). Essa adição de 5% de biodiesel ao diesel estava prevista para iniciar em janeiro de 2013. Todavia, a aplicação dessa lei ocorreu devido à aceitação desse biocombustível no mercado. Entretanto, a cadeia produtiva do biodiesel gera alguns resíduos, entre os principais, podemos citar: o glicerol (PEREIRA et al., 2012). Inúmeros estudos tem

relatado possíveis utilizações do glicerol bruto. Entre estes se destacam a produção de diferentes produtos químicos, produção de hidrogênio, aditivos para combustíveis automotivos, etanol, metanol, co-digestão, co-gaseificação, entre outros (LEONETI et al., 2012).

Como citado, o glicerol pode ser utilizado para a produção de hidrogênio. A escolha do substrato é fator importante para a produção de biogás. No presente trabalho, utilizou-se de glicerol bruto (resíduo proveniente da produção de biodiesel), que se justifica por ser um resíduo bastante abundante, com perspectiva de aumento de oferta, pois a adição de biodiesel ao diesel vem crescendo cada vez mais.

A temperatura é, sem dúvida, um fator bastante significativo na produção fermentativa de hidrogênio. Apesar da maioria dos trabalhos reportados na literatura serem sob condições mesofílicas (25 a 40 °C), os estudos em condições termofílicas (40 a 65 °C) demonstraram maiores rendimentos de H₂ (LEE; LIN; CHANG, 2006, WANG; WAN, 2008, LUO et al., 2010). Alguns motivos que justificam a afirmação anterior são: a menor solubilidade dos gases como o hidrogênio em altas temperaturas segundo a lei de Henry; as reações bioquímicas envolvidas na formação de hidrogênio são menos afetadas pela pressão parcial de H₂; as velocidades das reações químicas e enzimáticas são maiores em condições termofílicas (NISSILÄ et al., 2011).

A configuração do reator é outro fator primordial na produção fermentativa de hidrogênio em biorreatores. Vários tipos de reatores já foram estudados na produção biológica de hidrogênio, entretanto o reator anaeróbio de leito fluidizado tem apresentado os melhores resultados (ZHANG et al., (2007); ZHANG et al., (2008); SHIDA, (2008); AMORIM, (2009); BARROS et al., (2010); BARROS e SILVA, (2012). Esse tipo de reator, possui inúmeras vantagens em relação as outras

configurações, entre elas: boas características de mistura e alta velocidade de agitação na fase líquida favorecendo o desprendimento do biogás.

Dessa forma, devido ao aumento constante na demanda por biodiesel, uma maneira sustentável na utilização de glicerol bruto seria utilizá-lo como substrato na fermentação para produção de H_2 entre outros metabólitos. Apesar de vários trabalhos utilizando este substrato para produção biológica de H_2 , poucos desses são sob condições termofílicas e em reatores contínuos. Sendo assim o presente trabalho avaliou a produção biológica de H_2 sob condições termofílicas ($55^\circ C$) no RALF variando-se o TDH de 14 a 1h.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Este trabalho teve como principal objetivo, avaliar a produção de H₂ tendo glicerol bruto como substrato, sob condições termofílicas, em reator anaeróbio de leito fluidizado (RALF).

2.2. Objetivos Específicos

Os objetivos específicos desse trabalho foram os seguintes:

- Determinação do melhor tempo de detenção hidráulica (TDH) entre os estudados (14h a 1h) para produção de hidrogênio.
- Quantificar e qualificar os principais metabólitos produzidos (álcoois e ácidos voláteis), relacionando os mesmos, com a produção de hidrogênio em função do TDH.

3. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

3.1. Bioenergia e Biocombustível no Mundo e no Brasil

A busca por mitigar os impactos ambientais, em particular os de efeito global, é, talvez, um dos maiores desafios no setor energético. As fontes de energia renováveis, como a energia eólica, solar, térmica e a de biocombustíveis estão mostrando crescimento e se tornando cada vez mais viáveis economicamente (TOKLU, 2013).

Ainda nos dias de hoje o homem utiliza, em sua maioria, energia não renovável como fonte energética. Esse valor chega a 79% do total das formas de energias no mundo (Figura 3.1).

O Brasil possui um enorme potencial para fontes naturais de energias renováveis abundantes, como a energia eólica, solar, energia hidráulica, etanol e biodiesel. Essas fontes fornecem 47,2% da oferta interna de energia primária no país, promovendo a sua consolidação e expansão através de políticas públicas específicas (PEREIRA et al., 2012).

Uma decisão importante para o governo bem como para as indústrias e as empresas é definir se é ou não possível estabelecer sistemas de energia renovável em um determinado lugar, e ainda qual das fontes ou a combinação das mesmas seria a melhor escolha (BANOS et al., 2011).

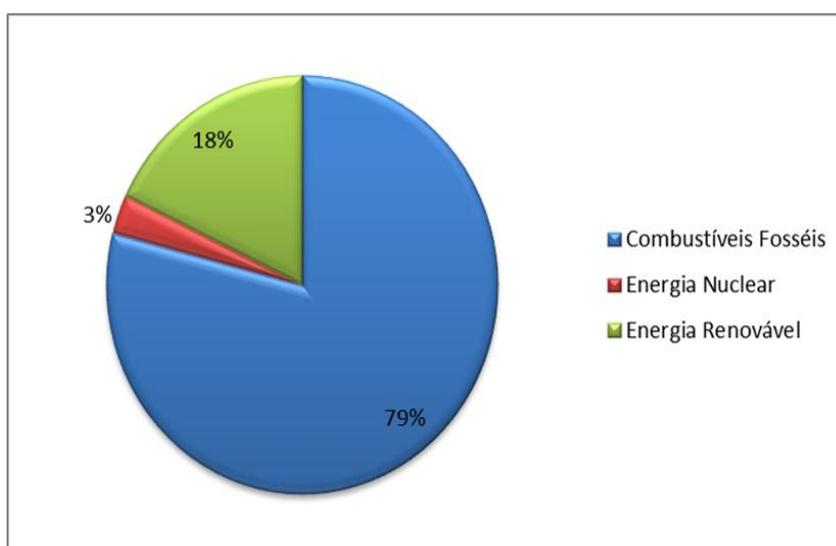


Figura 3. 1: Participação das fontes de energias consumidas no mundo. Fonte: Adaptada de KUMAR et al. (2010).

Segundo a agência nacional de Petróleo (ANP), contando dos dias de hoje, as reservas de combustíveis fósseis estarão esgotadas em no máximo 100 anos, como está representada na Tabela 3.1 (PEREIRA et al., 2012).

Tabela 3.1: Reservas globais e disponibilidade das principais fontes de energia fósseis.

Item	Petróleo	Gás Natural	Carvão
Reservas totais (ano 2008)	1408 bilhões de barris	185 trilhões m3	826 bilhões ton
Produção (2008)	29,9 bilhões de barris	3,1 trilhões m3	628 bilhões ton
Reserva disponível (anos)	47 anos	60 anos	131 anos

Fonte: BP Statistical review of world energy (2000).

Dentre as possibilidades de fontes alternativas energéticas, a bioenergia é uma das mais promissoras, representando 10% de cerca de 13% de fontes de energia na oferta total de energia primária global (Figura 3.2).

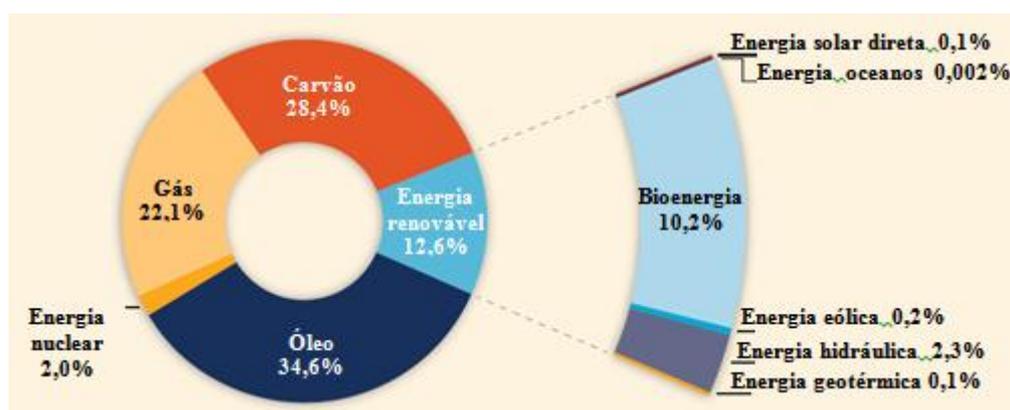


Figura 3. 2: Participações, em porcentagens, de fontes de energia na oferta total de energia primária global em 2008. Fonte: KUMAR et al. (2010); IPCC (2012).

A bioenergia está disponível a partir de materiais derivados de fontes biológicas. Dessa forma, a biomassa, ou seja, a matéria-prima para este tipo de energia renovável provém de material biológico, ou mesmo de resíduos biológicos. A biomassa poderá ser

convertida a gases como metano ou hidrogênio, e a biocombustíveis como o etanol ou biodiesel (BANOS et al., 2011). Neste sentido, a biomassa tem o potencial de proporcionar uma considerável porção da demanda energética mundial (WATKINSON et al., 2012).

A energia renovável é uma ótima aliada na luta contra o crescente esgotamento dos recursos fósseis e os impactos ambientais (CHEN et al., 2010).

Os biocombustíveis são considerados uma opção extremamente válida para reduzir os danos das emissões de gases de efeito estufa, aumentando a diversidade e a segurança de abastecimento de energia, bem como o desenvolvimento agroindustrial. A redução de gases de efeito estufa, devido à produção de biocombustíveis por meio da retirada de carbono durante o crescimento da planta, é uma das principais razões para a substituição de combustíveis fósseis por biocombustíveis (SCARLAT e DALLEMAND, 2011).

O mercado internacional de bioenergia está crescendo rapidamente, muito além do que esperava em alguns anos atrás, em especial o bioetanol e o biodiesel (JUNGINGER et al., 2008). Assim, a biomassa poderá ser diretamente utilizada para a obtenção de energia, ou servir como matéria-prima a ser convertida a vários combustíveis líquidos ou gasosos para aplicações práticas (Figura 3.3).



Figura 3. 3: Resumo das principais fontes de biomassa, processos de conversão, e produtos finais associados a biorrefinaria. Fonte: SRIRANGAN et al. (2012).

Segundo LAGO et al. (2012), existem três razões principais pelas quais os biocombustíveis têm sido adotados: a redução das emissões de gases em relação aos combustíveis fósseis, a redução da dependência do mesmo e o desenvolvimento de uma atividade nova e atrativa para o setor agrícola.

Além disso, a utilização de combustíveis a partir de biomassa poderá atenuar questões atuais de segurança energética e da balança comercial, promovendo desenvolvimento socioeconômico para áreas agrícolas de países em desenvolvimento (Tabela 3.2) (SRIRANGAN et al., 2012).

Tabela 3.2: Benefícios potenciais e limitações tecnológicas dos biocombustíveis.

Benefícios em potencial	Limitações tecnológicas
<u>Ganhos ao meio ambiente</u>	<u>Ameaças ambientais</u>
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Menor dependência de combustíveis fósseis prejudiciais ao meio ambiente ▪ Níveis reduzidos de emissões GEE ▪ Redução emissões químicas tóxicas ▪ A utilização de materiais residuais, reduzindo a necessidade de aterros 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Utilização de área de proteção ambiental para a produção de biomassa ▪ Esgotamento de reservas aquíferas locais ▪ Alta demanda de fertilizantes, herbicidas, pesticidas ocasionando um aumento na poluição do ar e solo
<u>Benefícios econômicos</u>	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Recursos de biomassa renovável subutilizados ▪ Constância e confiabilidade ▪ Amplo acesso energético ▪ Estabilidade de preço ▪ Geração de empregos e desenvolvimento em áreas agrícolas ▪ Oportunidade de exportação de biomassa e da tecnologia de bioenergia ▪ Fontes com menores custos 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Culturas geneticamente modificadas ▪ Redução na biodiversidade do solo devido à poluição e/ou cultivo de espécies favorecidas ▪ Aumento nas emissões de partículas de carbono devido a queima de madeira
	<u>Tecnologias associadas</u>
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Custo da tecnologia de produção e manutenção ▪ Pré-tratamento da biomassa ▪ Produção enzimática ▪ Armazenamento e coleta de matéria-prima

Fonte: SRIRANGAN et al. (2012)

Existem diversas matérias-primas que são utilizadas na produção de biocombustíveis, pois, além de ser uma fonte de energia renovável, sustentável,

biodegradável e não alterarem o ciclo de carbono no meio ambiente, elas também contribuem para o desenvolvimento das agroindústrias, e pouco modificam o funcionamento de motores, quando processadas e utilizadas como combustível (YUSUF et al., 2011). Além do Brasil, países como: Estados Unidos, Alemanha, Itália e Austrália também já são usuários de biocombustíveis, como bioetanol e biodiesel (YUSUF et al., 2011).

3.2. Produção Biológica de Hidrogênio

Devido a sua eficiência, sustentabilidade e por ser considerado um combustível limpo, o hidrogênio, intermediário do processo de digestão anaeróbia, tem ganhado atenção nas últimas décadas (UENO et al., 1995 e LO et al., 2011).

A produção biológica de H_2 é considerada uma das formas mais ecologicamente correta de produção energética. Além disso, a produção de H_2 pode ser realizada por qualquer microrganismo anaeróbio fotossintético ou fermentativo. O processo de fermentação de hidrogênio é vantajoso em três aspectos em relação ao processo fototrófico: é mais simples tecnicamente, a taxa de produção de H_2 é maior e tem uma maior facilidade na conversão de águas residuárias e outros resíduos em geral (SARATALE et al., 2008; CHENG et al., 2011 e NANDI e SENGUPTA, 1998). Em suma, a produção fermentativa sem a presença de luz do hidrogênio tende a ser a mais sustentável e viável. Além disso, o hidrogênio tem 2,8 vezes maior energia que o conteúdo de combustíveis composto por hidrocarbonetos (LEE et al., 2006 e LO et al., 2011).

3.2.1. Parâmetros que Influenciam na Produção de H_2

Alguns parâmetros como: pH, tempo de detenção hidráulica (TDH), substrato e temperatura, são bastante significativos na produção de hidrogênio por meio da fermentação acidogênica em reatores biológicos.

Os parâmetros citados acima serão pormenorizados nos tópicos subsequentes.

3.2.1.1. pH

O pH é um fator muito importante na produção de hidrogênio. Ele exerce influência nas atividades das bactérias produtoras de hidrogênio e na fermentação, pois é responsável pela influência nas atividades das bactérias produtoras de hidrogênio e também na fermentação. Já foram realizados inúmeros estudos a fim de encontrar uma faixa ótima de operação para o pH. A maioria das metanogênicas atuam no pH ótimo de 6 a 7, e sua atividade tende a diminuir em pHs menores que 6, enquanto que as bactérias acidogênicas passam a atuar diminuindo o pH do meio (BITTPM, 2005). Estudos realizados por FANG et al. (2002) mostraram que a produção máxima de hidrogênio ocorria sob um pH de 5,5. Notou-se que o aumento do pH provocava uma diminuição no rendimento da produção, por conta da atividade das metanogênicas hidrogenotróficas. Por último, estudos comprovaram que a um pH de 4,5 foi observada a produção de ácidos voláteis, para valores menores que 4,5 há produção de butanol e inibição da produção de hidrogênio.

Segundo VLASSIS et al., (2012) em reator batelada, tendo glicerol bruto e glicerina pura para produção de H₂, utilizando lodo metanogênico mesófilico (cultura mista), seguido de tratamento térmico para inibição das metanogênicas, foi favorecida em pHs ácidos. Os estudos foram realizados para faixas de pH entre 8 e 4 sendo o

melhor rendimento encontrado para o pH de 6,5, sob uma concentração de 8,3 g DQO.L⁻¹.

Na produção de hidrogênio tendo glicerol bruto e glicerina pura como substratos, há uma ampla variação nos valores de pH adotado. Essa variação acontece, principalmente, por se tratar de diferentes tipos de inóculos (Tabela 3.3).

Tabela 3.3: Diferentes valores de pH na produção de H₂ reportados na literatura.

Tipo de Reator	Substrato	Inóculo	pH	Referência
Contínuo de leito fixo	Glicerina pura	Cultura Pura	6,8	ITO et al., (2005)
Contínuo de leito fixo	Glicerol bruto	Cultura Pura		
Batelada	Glicerina pura	Cultura Pura	7,8	ITO et al.,(2005)
Batelada	Glicerol bruto	Cultura Pura		
Batelada	Glicerol bruto	Cultura Pura	8	REUNGSANG et al., (2012)
Batelada	Glicerol bruto	Cultura Pura	6,5	MANGAYIL et al.,(2012)
Batelada	Glicerol bruto	Cultura Pura	7,5	NGO e SAND (2011)
Batelada	Glicerol bruto	Cultura Mista	6	SEIFERT (2009)
Batelada	Glicerol bruto	Cultura Mista	6,2	SELEMBO et al., (2009)
Batelada	Glicerina pura	Cultura Mista	6,2	SELEMBO et al., (2009)
Batelada	Glicerina pura	Cultura Mista	5,5	DE SÁ et al., (2013)
Batelada	Glicerol bruto	Cultura Mista	5,5	SITTIJUNDA e
Batelada	Glicerina pura	Cultura Mista	5,5	REUNGSANG (2012)
Batelada	Glicerol bruto	Cultura Pura	7,5	NGO et al., (2011)
Batelada	Glicerol bruto	Cultura Mista	6,5	AKUTSU et al., (2009)
Batelada	Glicerol bruto	Cultura Mista	8	KUMAR et al., (2012)
Batelada	Glicerol bruto	Cultura Pura	8	CHOOKAEW et al.,(2012)

Tabela 3.4: Diferentes valores de pH na produção de H₂ reportados na literatura. (Continuação).

Tipo de De Reator	Substrato	Inóculo	pH	Referência
Batelada	Glicerol bruto	Cultura Pura	de 5 a 8,6	MARKOV et al., (2011)
Batelada	Glicerina pura	Cultura Pura	7	LO et al., (2013)
CSTR	Glicerina pura	Cultura Pura	7,5	
CSTR	Glicerol bruto	Cultura pura	7,5	
UASB	Glicerol bruto	Cultura Pura	5	REUNGSANG
UASB	Glicerina pura	Cultura Pura	5	et al. (2013)

3.2.1.2. TDH

Muitos são os reatores utilizados na produção biológica de hidrogênio. Resumidamente os principais reatores existentes na produção de hidrogênio são o de crescimento microbiano disperso ou suspenso nos quais englobam os reatores de agitação contínua (CHEN e LI, 2003; ZHANG et al., 2006) e o reator de manta de lodo (CHANG e LIN, 2004); ou ainda, podem ser de crescimento aderido como o reator de leito fixo (CHANG et al., 2002) e reator de leito fluidizado (WU et al., 2003; ZHANG et al., 2007; WU et al., 2007; SHIDA, 2008).

Estudos do TDH realizados em reatores contínuos tendo glicose como substrato, revelam que variando o TDH de 1 em 1 hora, entre 13h e 2h, há um aumento na produção de hidrogênio de 4,9 para 26,9 L.dia⁻¹.L⁻¹ até o valor de 3h, a partir do qual ocorre redução dessa produção (CHEN e LI, 2003).

REIS e SILVA (2011) avaliaram a produção de hidrogênio em reator de leito fluidificado (4192 cm³ de volume útil) com argila expandida como material suporte. Neste estudo, foram adotadas duas velocidades ascensionais 1,24 cm s⁻¹ e 1,88 cm s⁻¹

com variação decrescente de TDH (8 a 1 hora) sendo essa variação de 1 em 1 hora. A taxa de produção máxima de hidrogênio foi obtida em TDH de 1 hora ($2,21 \text{ L.h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$), enquanto que o melhor rendimento foi obtido em TDH de 2 horas ($2,55 \text{ mol de H}_2 \cdot \text{mol de glicose}^{-1}$).

A produção biológica de hidrogênio a partir de glicerol, ainda não foi estudada em reator anaeróbico de leito fluidizado (RALF), porém há estudos com RALF tendo glicose como substrato (ZHANG et al., 2007; WU et al., 2007; SHIDA, 2008). O reator contínuo de leito fluidizado é um dos mais indicado para uso em grande escala. Descobertas de bons materiais suportes também favorecerem o uso desse reator, pois por trabalhar em modo contínuo, uma dificuldade encontrada era a retenção da biomassa no reator.

3.2.1.3. Substrato

Várias fontes de carbono já foram estudadas para produção biológica de hidrogênio, sendo elas: Águas residuárias de indústria de celulose LEVIN et al., (2006); resíduos de indústrias de alimento (VAN GINKEL et al., 2005); águas residuárias sintéticas: xilose (LIN e CHENG, 2006), amido (WANG e CHANG, 2008), glicose (MOHAN et al., 2007; ZHANG et al., 2007), sacarose (LEE et al., 2003; CHANG e LIN, 2004); esgoto sanitário (MOHAN et al., 2008) e soro de queijo (ROSA et al., 2014). Atualmente uma nova fonte de carbono, o glicerol, vem sendo estudada como substrato na produção de hidrogênio.

O glicerol puro contém 19 MJ.Kg^{-1} , já o glicerol bruto $25,30 \text{ MJ.Kg}^{-1}$, essa elevada energia presente no glicerol bruto mostra seu potencial como substrato para a produção de hidrogênio. Além disso, ao contrário da maioria dos compostos celulósicos, materiais residuais dificilmente necessitam de pré-tratamento. Substratos

como o soro de leite e melão, tornam-se menos abundante devido a amplas aplicações em processos industriais de fermentação. Outros substratos como resíduos alimentícios em geral, por possuírem muitos materiais sólidos necessitam de moagem e outros tipos de pré-tratamento para sua utilização na fermentação. Sendo assim pode-se dizer que o glicerol é um substrato promissor na produção biológica de hidrogênio (SAURABH et al., 2012).

3.2.1.4. Temperatura

A temperatura é um dos parâmetros mais importantes que influenciam nas atividades das bactérias produtores de hidrogênio por via fermentativa. WANG (2008) demonstrou que em um intervalo apropriado o aumento da temperatura pode favorecer o rendimento de hidrogênio pelos microrganismos. Porém em níveis além de determinada faixa apropriada faz com que esse rendimento diminua.

O aumento da atividade dos microrganismos produtores de H₂, acidogênicos, pode ser atingido com a elevação da temperatura empregada, como foi observado por alguns autores (HUANG et al., 2004; MU et al., 2006). Entretanto, é preciso ter cuidados com esta prática, já que cada microrganismo tem sua temperatura ótima de atuação, assim como os consórcios microbianos (NGUYEN et al., 2008).

Embora a utilização de faixas mesofílicas de temperatura para a conversão de substratos ricos em carboidratos tenha predominado em inúmeros estudos, sistemas termofílicos operados normalmente sob temperaturas de 55 a 60 °C apresentam altas taxas de produção e rendimento de hidrogênio. Além disso, direcionam à rota do acetato, a qual favorece a formação de H₂, em maior extensão quando comparados aos sistemas mesófilos (HAWKES et al., 2007). Esses fatores são principalmente atribuídos

ao maior favorecimento termodinâmico, aumentando as taxas de reações químicas e biológicas, à dominância da via metabólica do acetato contrariamente a do etanol e do lactato e a maior tolerância à pressão parcial do hidrogênio (VAN GROENESTIJN et al., 2002; KOTSOPOULOS et al., 2006; O-THONG et al., 2009).

3.3. Glicerol como Substrato para produção de H₂

3.3.1. Biodiesel

Em função das preocupações ambientais e da real diminuição nas reservas de combustíveis fósseis, o biodiesel tem sido, cada vez mais, um substituto para o óleo diesel (JITRWUNG e YARGEAU., 2011).

O biodiesel apresenta um enorme crescimento no mundo, sua produção quadruplicou entre 2005 e 2010, com previsão de aumento significativo até 2020 (Figura 3.4).

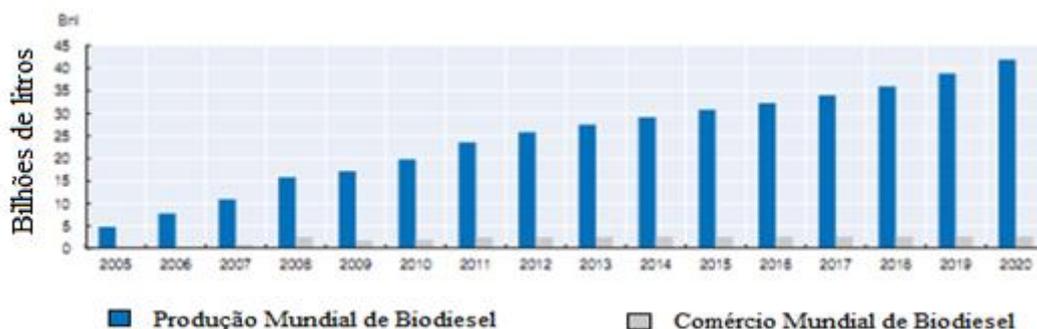


Figura 3. 4: Desenvolvimento do mercado mundial de biodiesel. Fonte: OECD e FAO Secretaria.

Entre 2005 e 2011 houve um crescimento significativo na produção de biodiesel, passando de 736 m³ para 2.530.000 m³ (PADULA et al., 2012).

Na produção de biodiesel, cada mol de óleo reage com 3 mols de álcool(metanol/etanol) produzindo 3 mols de biodiesel e 1 mol de glicerol (Figura 3.5 e Equação 1). Ou seja, a produção de glicerol é bastante significativa nessa reação, além disso, possui um alto poder energético.

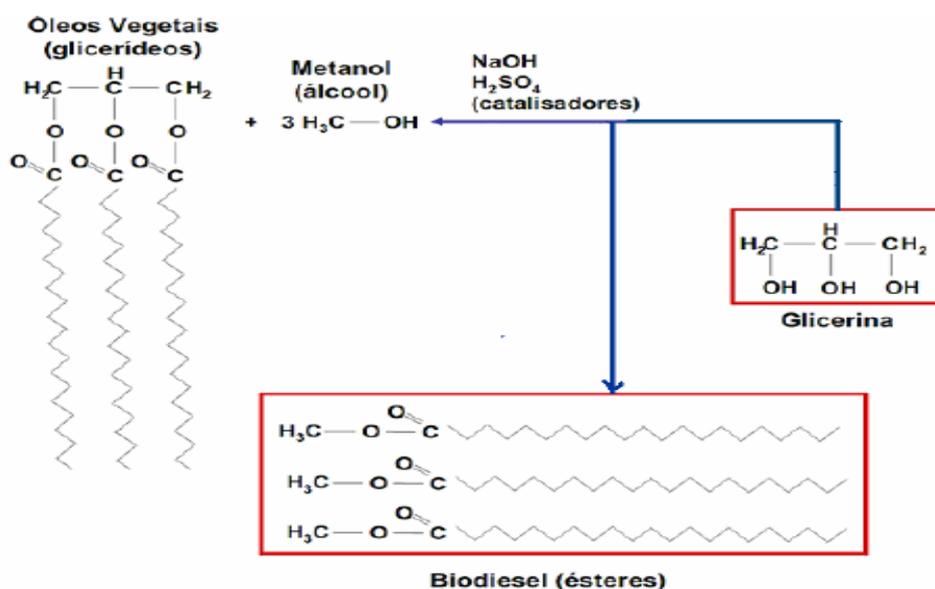
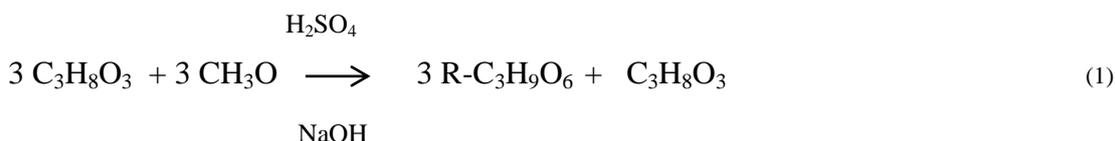


Figura 3. 5: Esquema de produção de biodiesel a partir da transesterificação de óleo vegetal (MOTA et al., 2009).

3.3.2. Glicerol

Como já foi comentado no texto acima, na produção de biodiesel tem-se como subproduto o glicerol bruto, aproximadamente, para cada 100 litros de biodiesel produzidos, 10 litros são de glicerol bruto (CAVALHEIRO et. al., 2009).

Conhecido como 1,2,3-propanotriol, o glicerol foi descoberto por Carl W. Scheele em 1779 durante a separação de uma mistura aquecida de PbO preparada com óleo de oliva.(MOTA et al., 2009). O glicerol está presente de diversas formas na natureza tanto nos vegetais (soja, mamona, babaçu, girassol, palma, algodão, coco, dendê, pinhão manso) quanto nos animais em formas combinadas de glicerina com ácidos graxos (LAGES et al., 1997). Com a aceleração na produção de biodiesel devido ao aumento da demanda nos últimos anos, houve um acúmulo de glicerol, provocando uma queda significativa na rentabilidade das indústrias de biodiesel (YAZDANI e GONZALEZ, 2007). O uso de glicerol bruto é bastante limitado devido a presença de impurezas, tais como: metanol, sais e os ácidos graxos. Outro empecilho do glicerol bruto é o alto custo para sua purificação, que acaba sendo inviável para usinas de pequeno e médio porte. Assim, o investimento em ciência e tecnologia para transformar o glicerol bruto em um co-produto de alto valor, é de muita importância para sustentabilidade a longo prazo de indústrias de biodiesel.

Devido a tamanha disponibilidade do glicerol em função do aumento na demanda por biodiesel, esse subproduto passa a ter uma drástica diminuição no seu valor de mercado. Sendo assim tem-se havido um aumento no interesse por pesquisas que possam encontrar uma forma de agregar valor ao glicerol bruto (JITRWUNG e YARGAU., 2011).

Além da purificação do glicerol,

Uma forma alternativa da utilização do glicerol, este também é usado como substrato em processos de fermentação industrial na obtenção de metabólitos tais como: hidrogênio, 1,3-propanodiol e etanol, por exemplo, (SILVA et al., 2009 e PAPANIKOLAOU et al., 2002).

Muitos estudos estão sendo desenvolvidos para adquirir-se um produto de alto valor agregado nos subprodutos do glicerol bruto. Uma das alternativas mais promissoras seria a conversão biológica de glicerol bruto em produtos bioquímicos de alto valor agregado (NITAYAYARDHANA e KHANAL, 2011). Estudos já foram realizados com glicerol bruto como única fonte de carbono para culturas microbianas (SILVA et al, 2009;. TANG et al, 2012).

O glicerol bruto terá suas características físicas, químicas e nutricionais definidas dependendo do tipo de ácido graxo e do tipo de catálise empregada na produção de biodiesel. Além disso, glicerol bruto contém elementos nutricionais, como, fósforo, enxofre, magnésio, cálcio, nitrogênio e sódio, os quais ajudam na utilização

como substrato na produção biológica de hidrogênio (XIU et al., 2007). O Glicerol é considerável uma fonte de carbono altamente assimilável por bactérias e leveduras sob condições aeróbias e anaeróbias para obtenção de energia metabólica (DILLIS et al., 1980).

A glicerina purificada, apesar de ter um alto custo, é muito utilizada em indústrias alimentícias, cosméticas, farmacêuticas, entre outras. Além de suas características físicas e químicas, o fato da glicerina pura ser inofensiva, esta apresenta diferentes aplicações (Figura 3.6).

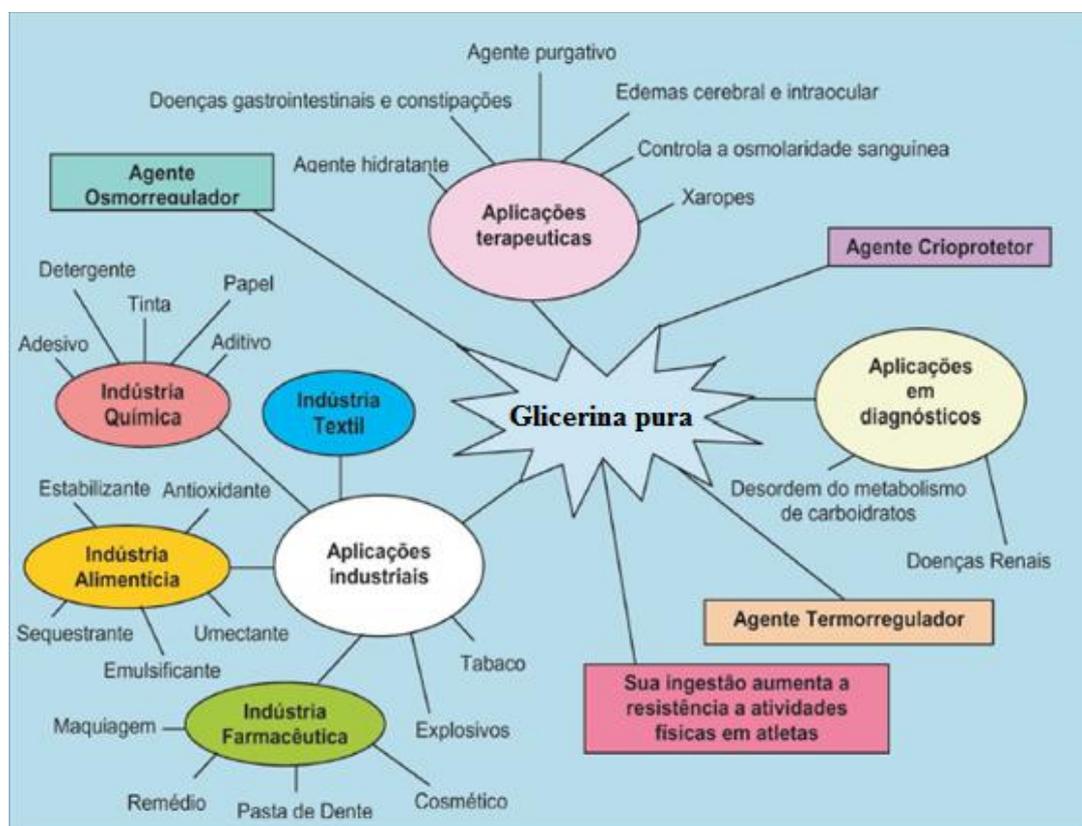


Figura 3. 6: Utilização da glicerina pura no setor industrial Fonte: Adaptada de MOTA et al. (2009).

3.3.3. Produção Biológica de Hidrogênio e Metabólitos a partir de Glicerol

A utilização de glicerol bruto, resíduo da produção de biodiesel, para produção de energia limpa, como por exemplo: o hidrogênio, tornou-se um processo, cada vez mais, atrativo e sustentável. Entretanto a conversão de hidrogênio a partir do glicerol tem sido bem menos estudada em comparação com a produção de biohidrogênio a partir de outros substratos. (LEVIN et. al., 2010).

Normalmente a fermentação do glicerol tem como objetivo a formação de 1,3-propanodiol, produto utilizado na produção de poliésteres. (PETITDEMANGE et al., 1995).

TEMUDO et al. (2008) num reator contínuo agitado, a uma temperatura de 30 °C, a partir de cultura mista, estudaram a fermentação do glicerol sob pH alcalino. Os metabólitos predominantes, tendo a via etanólica como rota fermentativa, foram identificadas etanol e 1,3- propanodiol. Entretanto, para que podemos encontrar a rota fermentativa dominante, é preciso que as condições impostas estejam bem definidas

De SÁ et al. (2013) na fermentação tendo glicerol como substrato, notou-se a presença de 1,3-propanodiol, ácido acético e ácido butírico como principais metabólitos. Estudos tem confirmado que microrganismos do gênero *Clostridium* são capazes, simultaneamente, de produzir 1,3-propanodiol e outros subprodutos a partir da fermentação do glicerol (AKUTSU et al., 2009).

Outro fator importante na fermentação de glicerol foi em relação à concentração do substrato utilizado. Sendo este utilizado em altas concentrações favorece a formação de 1,3 propanodiol, já em baixas concentrações de glicerol o etanol era favorecido. Ou seja, o etanol tem condições limitantes na sua produção a partir do glicerol. Por fim a geração de 1,3-propanodiol está associada com a produção de acetato ou butirato e não com etanol, sendo assim a produção de 1,3-propanodiol inibe a formação de etanol (TEMUDO et al., 2008).

Dois produtos principais são resultantes da fermentação de glicerol por enterobactérias: 1,3- propanodiol e acetato. Outros subprodutos como: lactato, formato, succinato e etanol, também podem ser produzidos dependendo das condições de cultura. (AMARAL et al., 2009). Segundo BARBIRATO et al., (1998) a fermentação de glicerol a partir de *Clostridium* tem como principal produto 1,3- propanodiol e como subprodutos H₂ e CO₂.

O glicerol pode também ser utilizado como fonte de carbono pela *propionibacterium* para a produção de ácido propiônico (BORIES et al., 2004) e pela *Anaerobiospirillum* para produzir o ácido succínico (LEE et al., 2011). O produto de interesse pode ser obtido por um processo que altera condições. Por exemplo, o butanol foi encontrado como sendo o produto principal da fermentação de glicerol por *Clostridium pasteurianum* sob certas condições de cultura (BIEBL, 2002). Em outro relatório, etanol e ácido fórmico foram os dois principais produtos da fermentação de glicerol por *Klebsiella planticola*, cepa isolada do rúmen de veados, (JARVIS et al., 1997).

Na literatura poucos são os trabalhos com reatores contínuos para produção biológica de hidrogênio. Entre os mais antigos temos como referência ITO et al., (2005).

ITO et al., (2005) produziram hidrogênio e etanol e como principais metabólitos: 1,3 propanodiol; Ácido Acético; Ácido Lático e Ácido Fórmico.

Nos trabalhos mais recentes como de LO et al. (2013) e REUNGSANG et al. (2013), com reatores CSTR e UASB respectivamente, além dos metabólitos obtidos por ITO e colaboradores, também obtiveram: Ácido Butírico; Ácido propiônico e Butanol.

Tanto em reatores contínuos como em bateladas, a produção de hidrogênio a partir de glicerol bruto nos leva a crer que a maioria dos metabólitos citados acima faz parte da maioria das rotas metabólicas estudadas para o glicerol.

Na Tabela 3.4, estão os principais trabalhos reportados na literatura, tanto com glicerol bruto, quanto para glicerina pura, e seus principais metabólitos produzidos.

Tabela 3. 5: Principais Metabólitos reportados na literatura.

Tipo de Reator	Substrato	Inóculo	Principais Metabólitos	Referência
Contínuo de leito fixo	Glicerol Puro	<i>Enterobacter aerogenes HU-101</i>	1,3- Propanodiol; Ácido Lático;	ITO <i>et al.</i> ,(2005)
Batelada	Glicerol Bruto		Ácido Acético; Ácido Fórmico e Etanol	ITO <i>et al.</i> ,(2005)
Batelada	Glicerina Pura			ITO <i>et al.</i> ,(2005)
Batelada	Glicerol Bruto	<i>E. aerogenes (ATCC 35029)</i> <i>E. aerogenes (ATCC 35030)</i> <i>E. aerogenes (ATCC 35031)</i>	Ácido Lático; Ácido Acético Etanol e Metanol	JITRWUNGe YARGEAU (2011)
Batelada	Glicerol Bruto	<i>E. aerogenes KKU-S1</i>	1,3-Propanodiol; Ácido Acético Ácido Propanóico; propanol; Ácido Butírico	REUNGSANGet al., (2012)
Batelada	Glicerol Bruto	<i>Clostridium</i>	Ácido Acético; Ácido Butírico;	MANGAYIL et al., (2012)

Tabela 3.4: Principais Metabólitos reportados na literatura (**Continuação**).

Tipo de Reator	Substrato	Inóculo	Principais	Referência
Batelada	Glicerol Bruto	<i>Cultura Mista</i>	Ácido Acético; Ácido Fórmico; Etanol	SELEMBO et al., (2009)
			1,3-Propanodiol e Butanol	SELEMBO et al., (2009)
	Glicerina Pura	<i>Cultura Mista</i>	Ácido Acético; Ácido Fórmico; Etanol	
			1,3-Propanodiol e Butanol	
Batelada	Glicerina Pura	<i>Cultura Mista</i>	1,3-Propanodiol; Ácido Acético	DE SÁ et al.,(2013)
			e Ácido Butírico	
Batelada	Glicerina Pura	<i>Cultura Mista</i>	1,3-Propanodiol; Ácido Acético	SITIJUNDA et al.,(2012)
			Etanol; Ácido Fórmico; Ácido láctico	SITIJUNDA et al.,(2012)
			Ácido Butírico e Ácido Acético	SITIJUNDA et al.,(2012)
Batelada	Glicerol Bruto	<i>Cultura Mista</i>	1,3-Propanodiol; Ácido Acético	

Tabela 3.4: Principais Metabólitos reportados na literatura (**Continuação**).

Tipo de Reator	Substrato	Inóculo	Principais	Referência
Batelada	Glicerol Bruto	Cultura Mista	Ácido Butírico e Ácido Acético 1,3-Propanodiol; Ácido Acético e Ácido Butírico	VIASSIS et al., (2012)
CSTR	Glicerol Bruto	<i>Clostridium pasteurianum</i> CH6	2,3- Butanodiol 1,3-Propanodiol; Ácido Acético; Ácido Láctico; Ácido Butírico e Butanol	LO et al., (2013)
CSTR	Glicerina Pura	<i>Clostridium pasteurianum</i> CH5	1,3-Propanodiol; Ácido Acético; Ácido Láctico; Ácido Butírico e Butanol	
UASB	Glicerol Bruto	<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	1,3-Propanodiol; Ácido Láctico; Ácido Fórmico; Ácido Propiônico e Ácido Butírico	REUGSANG et al., (2013)

3.3.4. Fermentação do Glicerol: Rotas Metabólicas

3.3.4.1. Fermentação por Diferentes Microrganismos

Inúmeros são os microrganismos capazes de converter glicerol em 1,3-propanodiol, tais como: *Klebsiella pneumonias*, *Bacillus wlchi*, *Lactobacillus spp.*, *Enterobacter spp.* e *Clostridium spp.* Um grupo de microrganismos anaeróbios tendo glicerol como única fonte de carbono também recebe destaque: *Clostridiumbutyricum* (COLIN et al., 2000), *Clostridium pasteurianum* (BIEBL et al., 1992), *Clostridium dióis*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridiumbutylicum*, *Perfingens Clostridium*, (HAO et al., 2008), *Enterobacter agglomerans* (BARBIRATO et al., 1998), *Enterobacter aerogenes* (DA SILVA et al., 2009), *pneumonia Klebsiella* (BIEBL et al., 1998), *Klebsiella oxytoca* (HOMANN et al., 1990), *Klebsiella aerogenes*, *Citrobacter freundii* (MALINOWSKI, 1999), *Reuterii Lactobacillus*, *Lactobacillus buchnerii*, *Collinoides Lactobacillus*, *Pelobacter carbinolicus*, *Rautella planticola* (SAXENA et al., 2009) e *Bacillus welchii* (DA SILVA et al., 2009).

Além do 1,3-propanodiol, outros metabólitos também podem ser obtidos na fermentação do glicerol: dihidroxicetona, ácido succínico, ácido cítrico, ácido docosahexanóico, ácido propiônico, hidrogênio e etanol (DANIEL et al., 1999; KÓSMIDER et al., 2009).

Segundo LIU et al., (2013) a produção de 1,3-propanodiol provém de uma via redutiva na fermentação anaeróbia do glicerol. Entretanto, a produção de H₂, bem como outros metabólitos (etanol, ácido acético, ácido butírico) compete com a produção de 1,3-propanodiol por vias oxidativas.

Na conversão de glicerol à apenas 1,3-propanodiol (Figura 3.7), primeiramente o glicerol é desidrogenado para dihidroxicetona, que então pode ser convertido (após a fosforilação) à piruvato. Essa etapa é catalisada pela enzima glicerol desidrogenase NAD^+ . Em consequente essa enzima é dependente de vitamina B12 (coenzima) composta por três polipéptidos. É ela que catalisa a conversão mediada por radicais livres de glicerol em 3-hidroxi propionaldeído (NAKUMARA et al., 2003). Resumindo, a conversão de glicerol via redutiva, consiste na desidratação mediada à vitamina B12 de 3-hidroxi propionaldeído e uma redução de aldeído a 1,3-propanodiol (BIEBL et al., 1999; KATRLÍK et al., 2007).

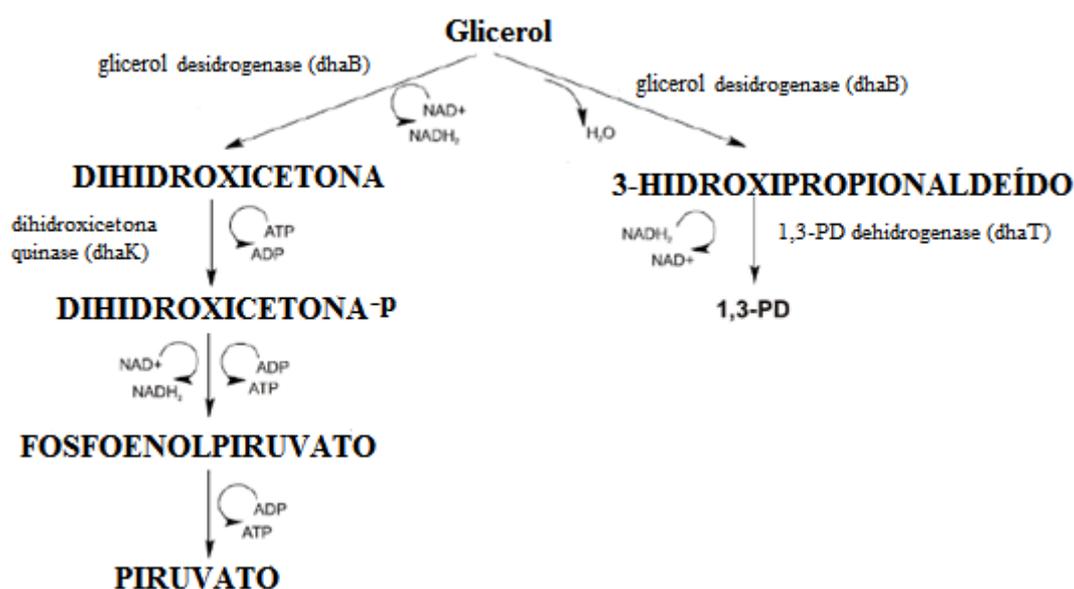


Figura 3. 7: Vias Bioquímicas da fermentação de glicerol (BIEBL et al., 1999).

Entretanto o Piruvato formado durante a conversão de glicerol (via oxidativa) pode ser utilizado de diversas maneiras e por diversos microrganismos, e consequentemente ser responsável pela formação de inúmeros metabólitos (Figura 3.8). *Eterobacteriaceae*, por exemplo, é clivada a acetil-CoA. Esta pode ser também

condensada a α – acetolactato e conseqüentemente convertida a acetoina e 2,3-butanodiol.

Apesar da formação de vários outros produtos, a fermentação de glicerol a partir de *Eterobacteriaceae* favorece a acumulação de dois produtos principais, 1,3-PD e ácido acético. Além disso, em função das condições de cultura, são gerados também produtos secundários em significativa quantidade, tais como: lactato, ácido fórmico, ácido succínico e etanol (DABROCK et al., 1992; BiIEBL., 1999). No caso da produção de 1,3-PD por *Lactobacillus brevis*, ácido acético, etanol e ácido láctico são também obtidos como subprodutos (WILE e VORLOP., 2008). A fermentação de *Clostridium butyricum*, além de 1,3-PD também é responsável pela produção de ácido butírico e ácido acético.

C. pasteurianum é, também, responsável pela produção de diversos produtos a partir da fermentação de glicerol, tais como 1,3 - DP, n- butanol, etanol, ácido acético, ácido butílico, e ácido láctico (HOMANN., 1990; BARBIRATO et al , 1998; BIEBL , 2001; DA SILVA et al ., 2009).

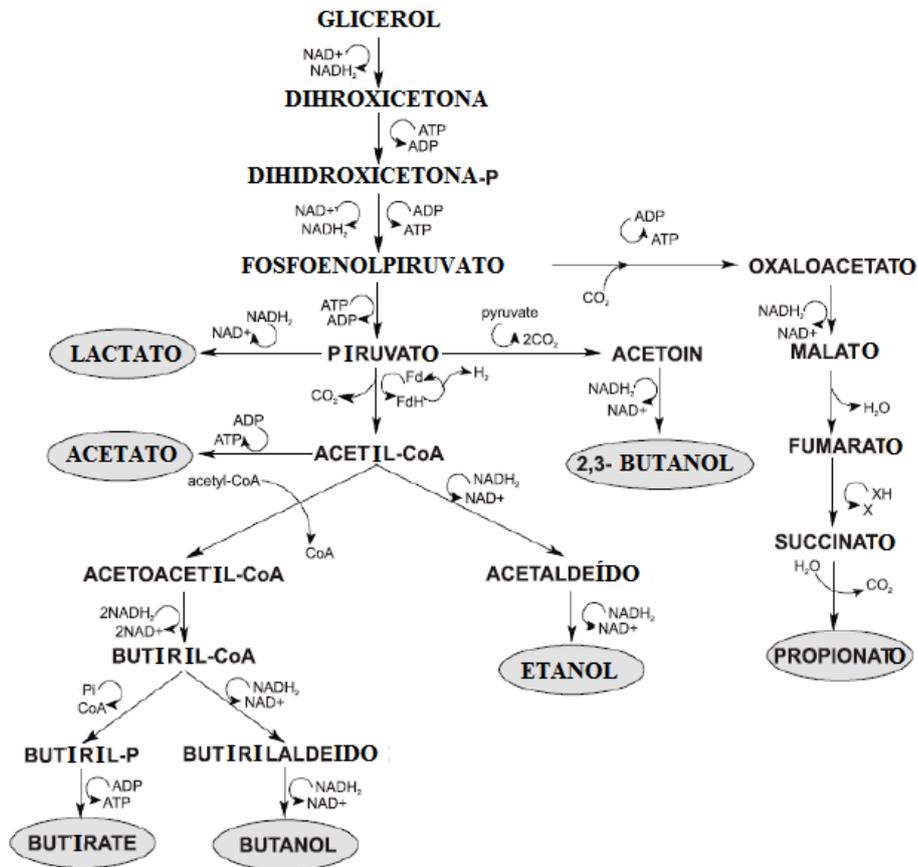


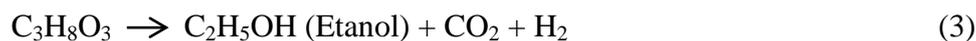
Figura 3. 8: Produtos finais da fermentação de glicerol por diferentes microrganismos (Da SILVA et al., 2009).

3.3.4.2. Rendimento Teórico de H₂ na fermentação do Glicerol

O máximo teórico de 3 moles de H₂ por mol de glicerol é atingido quando, apenas acetato é o produto final da fermentação via oxidativa (Equação 2) (JUANITA et al., 2009). Do mesmo modo, o rendimento de 1,3-PD (via reductiva) é máximo quando verificar-se apenas acetato como produto final na via oxidativa da fermentação de glicerol (ABBAD et al., 1995; DECKWER et al., 1995 e ZHENG et al., 1995).

Apenas 2 ou 1 mol de H₂ é produzido quando ácido butílico e etanol são gerados, respectivamente (Equações 4 e 5). Além disso, quando há pequenas

quantidades de dióxido e ácido acético, a quantidade de H₂ pode ser ainda menor (JUANITA et al., 2009).



Fonte: SARMA et al., (2012).

Algumas outras equações de produtos que podem ser formados na fermentação a partir de glicerol segundo ZENG. (1999) são expressas a seguir:

Formação de Lactato



Formação de Succinato



Formação de 1,3-Propanodiol



Fonte: ZENG. (1995).

3.4. Rendimento de H₂, Etanol e 1,3-Propanodiol a partir do Glicerol.

A conversão de hidrogênio a partir do glicerol tem se tornado muito interessante, pois, trata-se de um resíduo proveniente de um biocombustível além de ser muito abundante nos dias de hoje e possui produtos de alto valor no mercado como subprodutos: Etanol e 1,3-propanodiol (LEVIN et al., 2010).

Na literatura poucos são os trabalhos com reatores contínuos para produção biológica de hidrogênio a partir de glicerol, sendo a maioria em batelada, e ainda menor, são os trabalhos sob condições termofílicas. Entre os mais antigos temos como referência ITO et al., (2005) que obteve H₂ e Etanol entre outros subprodutos na fermentação do glicerol.

ITO et al., (2005) na produção de hidrogênio e etanol a uma temperatura de 37 °C, com cultura pura obtiveram uma produção volumétrica de 245 mL.h⁻¹.L⁻¹ e 123 mL.h⁻¹.L⁻¹ em reator contínuo para TDH de 10h, e rendimento de (1,05 e 0,71 mol H₂.mol glicerol⁻¹) em ensaios bateladas, para glicerina pura e glicerol bruto respectivamente. Tanto no reator contínuo quanto nos ensaios em batelada a concentração foi de 10 g.L⁻¹. Além de H₂, foram expressos também o rendimento de Etanol e 1,3-propanodiol (0,85 mol etOH.mol.glicerol⁻¹ e 0,16 mol PD.mol glicerol⁻¹).

KIVISTO et al., (2011) em ensaios bateladas com cultura pura (*H. saccharolyticum subsp. Saccharolyticum*) obtiveram maior rendimento de H₂, na ausência de vitamina B12 (2,16 mol H₂.mol glicerol⁻¹), Nessa condição ausência de vitamina (B12) inibe a produção de 1,3-PD e conseqüentemente favorece a produção de H₂. O rendimento obtido por KIVISTO é, praticamente, o dobro que aqueles obtidos por DURIN et al., (2009) e ITO et al., (2005), (0,86-1,02 mol H₂.mol glicerol⁻¹) através de

Escherichia coli ou por MURARKA et al., (2008) ($1,05 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol glicerol}^{-1}$) com *Enterobacter aerogenes*. Na presença de vitamina B12 o rendimento de 1,3-propanodiol foi de $0,22 \text{ mol PD} \cdot \text{mol glicerol}^{-1}$.

MARU et al., (2012), em ensaios bateladas utilizando microrganismos hipertermofílicos (*Thermotoga marítima* e *Thermotoga neapolitana*) à uma temperatura de $80 \text{ }^\circ\text{C}$ obtiveram valores de rendimento de H_2 próximos do teórico na fermentação de glicerol bruto e glicerina pura ($2,75$ e $2,65 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol glicerol consumido}^{-1}$). Nesse trabalho também se notou que 90% de outros produtos da fermentação, concentraram-se em ácido acético, o que justifica o alto valor de rendimento atingido, já que o teórico é de 3 mol H_2 por mol de glicerol via acetato.

Nos trabalhos de LO et al., (2013) e REUNGSANG et al., (2013), com reatores CSTR e UASB as produtividades volumétricas e TDH foram $166 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ e $156 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$, 12h e 24h respectivamente. Ambos os trabalhos foram realizados com glicerol bruto como substrato em concentração de $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ sob condições mesofílicas e tendo cultura pura como inóculo. Apesar da produção de outros produtos apenas os rendimentos de H_2 foram expressos em ambos os trabalhos ($0,77$ e $0,32 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol glicerol}^{-1}$), respectivamente.

KIVISTO et al., 2013 também com ensaios em bateladas utilizando halofílicas (*H. saccharolyticum subsp. Saccharolyticum*) seguido de um meio não estéril, utilizando glicerol bruto e água de torneira, obtiveram os maiores rendimentos tanto de H_2 quanto de 1,3-propanodiol que já foram relatados na literatura ($3 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol glicerol}^{-1}$ e $0,66 \text{ mol PD} \cdot \text{mol glicerol}^{-1}$) respectivamente. Sendo assim o rendimento obtido atinge o valor teórico para o H_2 . Até o momento o máximo rendimento encontrado na literatura era de $2,73 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol glicerol}^{-1}$, segundo NGO et al., (2011). Dessa forma cogita-se que alguma impureza contida no glicerol bruto pode, também, ter

sido utilizada como substrato na fermentação, contribuindo então para o alcance do rendimento teórico de H_2 . Vale ressaltar que a máxima produção de H_2 ocorre, coincidentemente quando há máxima produção de acetato e mínima produção de 1,3-propanodiol.

LIU et al., (2013) ao estudarem a produção simultânea de H_2 e 1,3-propanodiol a partir do glicerol, sob condições mesofílicas e cultura pura, obtiveram o melhor rendimento de ($0,75 \text{ mol } H_2 \cdot \text{mol glicerol}^{-1}$ e $0,65 \text{ mol PD} \cdot \text{mol glicerol}^{-1}$) para um concentração de $7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de substrato.

Segundo MARU et al., (2013), a produção de H_2 via etanol foi próximo do teórico que é de 1 mol H_2 por mol de glicerol ($0,95 \text{ mol } H_2 \cdot \text{mol glicerol}^{-1}$), através de cultura pura (*Enterobacter spH2*), já para o etanol esse rendimento foi de $0,65 \text{ mol etOH} \cdot \text{mol glicerol}^{-1}$. Entretanto, quando ocorreu a mistura de 3 tipos de microrganismo (cultura mista), houve produção de outros metabólitos, tais como: 1,3-PD e etanol, e conseqüentemente, uma diminuição no rendimento de H_2 de $0,95$ para $0,76 \text{ mol } H_2 \cdot \text{mol glicerol}^{-1}$, sendo mantido o rendimento de etanol.

Como exemplificado nesse trabalho no tópico 3.3.4 “Fermentação do Glicerol: Rotas Metabólicas”, o valor máximo de rendimento teórico de H_2 via Etanol é de $1 \text{ mol } H_2 \cdot \text{mol glicerol}^{-1}$. No entanto, por via acetato esse rendimento teórico pode alcançar até $3 \text{ mol } H_2 \cdot \text{mol glicerol}^{-1}$. Já para Etanol e 1,3-propanodiol o rendimento máximo teórico é de 1 mol. Além dessas vias fermentativas, também sabe-se que na produção de 1,3-propanodiol ocorre o consumo de H_2 por via oxidativa e que o rendimento desse metabólito pode ser máximo ao encontrar-se apenas acetato na via oxidativa. Diversos trabalhos na literatura científica reportaram uma larga faixa no rendimento de H_2 ($0,25$ à $3 \text{ mol } H_2 \cdot \text{mol glicerol}^{-1}$). Sendo assim, os valores apresentados na Tabela 3.5

demonstram o potencial na produção de H₂ a partir desse resíduo. Alguns valores de rendimento para Etanol e 1,3-propanodiol a partir do glicerol também foram relatados.

Tabela 3. 5: Rendimento de H₂, Etanol e 1,3-propanodiol dos principais trabalhos reportados na literatura a partir de glicerol e tipo de reator.

Tipo de Reator	Substrato	HY		Referências
		(Etanol e 1,3-PD) (mol etOH.mol glicerol ⁻¹ / mol H ₂ .mol glicerol ⁻¹)	(mol H ₂ .mol glicerol ⁻¹)	
Batelada	Glicerol bruto	–	0,41	SEIFERT, K. et al., (2009)
Batelada	Glicerol bruto	–	0,85	JITRWUNG e YARGEAU (2011)
Batelada	Glicerol bruto	–	2,73	TIEN, A. et al., (2011)
Batelada	Glicerol bruto	– / 0,22	2,16	KIVISTO et al., (2011)
Batelada	Glicerol Bruto	–	1,3	TIEN N. e SIM J., (2012)
Batelada	Glicerol Bruto	– /–	2,75	MARU et al.. (2012)
Batelada	Glicerol bruto	– /–	0,96	VARRONE, C. et al. (2012)

Tabela 3.5: Rendimento de H₂, Etanol e 1,3-propanodiol dos principais trabalhos reportados na literatura a partir de glicerol e tipo de reator (**Continuação**).

Tipo de Reator	Substrato	HY		Referências
		HY (Etanol e 1,3-PD) (mol etOH.mol glicerol ⁻¹ / mol H ₂ .mol glicerol ⁻¹)	HY (mol H ₂ .mol glicerol ⁻¹)	
Contínuo de leito fixo	Glicerina pura	0,85/0,16	–	ITO et al., (2005)
	Glicerol bruto		–	
Batelada	Glicerina pura	–	1,05	ITO et al., (2005)
	Glicerol bruto	–	0,71	
UASB	Glicerol bruto	–	0,32	REUNGSANG et al., (2013)
Batelada	Glicerol bruto	-/ 0,66	3,00	KIVISTO et al., (2013)
CSTR	Glicerina pura	–/–	0,5	LO et al., (2013)
	Glicerol bruto		0,77	
Batelada	Glicerol bruto	0,65/–	0,75	LIU et al., (2013)
Batelada	Glicerol bruto	0,65/–	0,95	MARU et al., (2013)

3.5. Reator Anaeróbio de Leito Fluidizado (RALF)

A procura por tratamento anaeróbio vem crescendo, principalmente por se tratar de um processo de baixo custo comparado a outros no tratamento de águas residuárias. Devido a essa realidade, cada vez mais, tem aumentado a procura por sistemas de alta taxa, os quais têm como principais características: alta retenção de biomassa e eficiente operação em baixos TDH. Sendo assim atinge-se o objetivo de uma elevada retenção de sólidos mesmo que em altas cargas hidráulicas.

Os reatores anaeróbios de alta taxa são classificados em função do tipo de crescimento da biomassa no sistema. Sendo assim se dividem em dois grandes grupos: crescimento microbiano disperso e crescimento microbiano aderido (CHERNICHARO, 1997). O reator anaeróbio de leito fluidizado está inserido no grupo de altas taxas com crescimento bacteriano aderido.

Inúmeros reatores anaeróbios de alta taxa têm sido estudados para a produção de hidrogênio. Basicamente eles se dividem em reator de crescimento microbiano disperso ou suspenso nos quais se englobam os reatores de agitação contínua (CHEN e LI, 2003; ZHANG et al., 2006) e o reator de manta de lodo (CHANG e LIN, 2004); ou ainda, podem ser de crescimento aderido como o reator de leito fixo (CHANG et al., 2002) e reator de leito fluidizado (WU et al., 2003; ZHANG et al., 2007; WU et al., 2012; SHIDA, 2008).

AMORIM et. al., (2009) ao trabalharem com RALF em condições mesofílicas, utilizando argila expandida como meio suporte e glicose como substrato, obtiveram um ótimo rendimento de hidrogênio em baixo TDH. O melhor rendimento de seu trabalho foi em TDH de 2h, no qual se obteve 2,49 mol de H₂.mol de glicose⁻¹.

Operando dois RALF em condições mesofílicas, BARROS et.al. (2010), compararam o rendimento na produção de hidrogênio para diferentes materiais suportes (poliestireno e cinasita), tendo glicose como substrato. Em ambos os reatores variou-se o TDH de 8h à 2h, obtendo-se maior rendimento na produção de hidrogênio para o reator com cinasita como meio suporte. O melhor rendimento obtido, foi no TDH de 2h, sendo este de 2,59 mol H₂.mol glicose⁻¹.

BARROS et.al., (2011), obtiveram rendimento de $2,25 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$ glicose utilizando RALF em condições mesofílicas para um TDH de 2h. Esse trabalho também teve como objetivo a comparação entre dois meios suportes (pneu triturado e polietileno tereftalato (pet). O melhor rendimento obtido foi para pneu triturado.

REIS e SILVA., (2011), estudaram em dois RALF duas diferentes velocidades de fluidização, $1,24 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ e $1,88 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$. A velocidade de $1,24 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ corresponde à velocidade mínima de fluidização, e foi nessa condição que se obteve o melhor rendimento na produção de hidrogênio, $2,55 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol glicose}^{-1}$, para TDH de 2h em condição mesofílica.

Com o objetivo de produzir etanol e hidrogênio em RALF, BARROS e SILVA. (2012), utilizando 3 diferentes materiais suportes (poliestireno -R1, pneu triturado - R2 e polietileno tereftalato (PET) - R3), obtiveram bons rendimentos na produção de H_2 e etanol nos reatores com pneu triturado e polietileno tereftalato, como materiais suportes, respectivamente. O rendimento para R2 foi de $2,11 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$ glicose e a concentração de etanol para R3 foi $1941,78 \text{ mg L}^{-1}$.

MUÑOZ-PAÉZ et al., (2012) utilizando sacarose como substrato também em RALF compararam a produção de H_2 em dois reatores com diferentes temperaturas (temperatura ambiente e $35 \text{ }^\circ\text{C}$) e concentrações de substrato ($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ e $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$). Ambos os reatores foram operados num TDH de 1 dia. A melhor produção de H_2 foi obtida na temperatura ambiente e na maior concentração.

SHIDA et al., (2012) variaram a taxa de carregamento orgânico (TCO) entre (19 e $140 \text{ kg DQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$) verificando-se a produção de H_2 em dois reatores RALF, sendo o primeiro sem controle de pH (R1) e o segundo com (R2). Cultura mista foi utilizado, como inóculo e glicose como substrato. Os rendimentos obtidos foram de $2,45$ e $1,9 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol glicerol}^{-1}$.

Recentemente o estudo de ROSA et al. (2014) com águas residuárias reais em reator anaeróbio de leito fluidizado demonstraram o potencial na produção de H_2 sem o uso de glicose, tendo como inóculo uma cultura mista. Nesse trabalho foi comparada a produção de H_2 tendo apenas glicose como substrato, a mistura de glicose com soro de queijo e apenas soro de queijo. O TDH utilizado foi de 6h e a concentração de substrato de $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. O melhor rendimento obtido foi quando se utilizou apenas soro de queijo como substrato ($1,9 \text{ mmol H}_2 \cdot \text{g DQO}^{-1}$).

3.6. Produção de H₂ sob condições Termofílicas

3.6.1. Avaliação de Diferentes Substratos

A produção anaeróbia de hidrogênio sob condições termofílicas tem se mostrado mais eficiente em relação a condições mesofílicas (ZEIDAN e VAN., 2010).

Microrganismos são aptos à produção de hidrogênio entre temperaturas de 15 a 85 °C (KANAI et al., 2005). A fermentação pode ocorrer a temperaturas mesofílicas, entre 25 e 40 °C, termofílicas entre 40 e 65 °C e em condições hipertermofílicas, com temperaturas acima de 80 °C.

Estudos em pequenas escalas revelaram que cerca de 73% dos estudos foram realizados com culturas mesofílica (LI e FANG, 2007). Para temperaturas termofílicas também já foram realizados estudos como foi o caso de O-THONG et al., (2009) que trabalhavam com temperaturas termofílicas na faixa de 60 °C. Diversos substratos já foram investigados para a obtenção de melhores produções fermentativas de hidrogênio sob condições termofílicas.

KOUTROULI et al. (2009) em reator contínuo de tanque agitado (CSTR), avaliaram a produção de H₂ a partir de óleo de oliva, com diluição de 1:4, e TDH aplicado entre 7,5 e 30 h. Os resultados obtidos demonstram que a taxa de produção termofílica, de 320 mol H₂.tonelada⁻¹ de óleo, foi 1,5 vezes maior quando comparada às condições mesofílicas.

LUO et al., (2010), utilizando reator CSTR e água residuária da mandioca como substrato para produção de H₂, obtiveram maiores rendimentos em temperaturas termofílicas que em condições mesofílicas, 69,6 mL H₂.gVS⁻¹ e 14 mL H₂. gVS⁻¹ respectivamente. O objetivo do trabalho foi analisar a eficácia do pré-tratamento térmico do lodo para condições mesofílicas e compará-la com as condições termofílicas, na qual, não houve o pré-tratamento do inóculo.

PEINTNER et al., (2010), trabalharam com dois reatores para produção de hidrogênio, um reator de leito percolado e outro de leito fluidizado. O substrato utilizado para ambos os reatores foi glicose e *Caldicellulosiruptor owensensis* como inóculo. Nas duas configurações obteve-se sucesso, sendo maior a taxa de produção volumétrica e o rendimento no reator de leito percolado de 3 mol H₂. mol⁻¹ glicose e 0,2

$L.L^{-1}.h^{-1}$, e $0,25 L.L^{-1}.h^{-1}$ para reator de leito fluidizado, esses valores comprovam a possível utilização destas configurações para produção de H_2 em temperaturas termofílicas.

Utilizando reator CSTR, KIM e KIM (2012), trabalharam com várias fontes de carbono na temperatura termofílica de $60\text{ }^\circ\text{C}$, utilizando cultura mista e adotando TDH de 12h, foram observados mais de 90% de remoção da matéria orgânica em quase todos os substratos exceto celobiose. O rendimento na produção de hidrogênio se mostrou estável e teve seu maior rendimento, $3,17\text{ mol }H_2.\text{mol hexose}^{-1}$, utilizando sacarose como substrato.

GADOW et al., (2012) comprovaram maiores rendimentos na produção de hidrogênio para temperaturas termofílicas em comparação com mesofílicas a partir de celulose como substrato. Utilizando reator (CSTR), sob concentração de $5g.L^{-1}$ e TDH de 10 dias sem pré-tratamento da celulose, alcançaram valores de $0,6\text{ mmol.g celulose}^{-1}$ e de $15,2\text{ mmol.g celulose}^{-1}$ a 37 e $55\text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente. Esses resultados demonstram que a temperatura favorecia a produção de H_2 a partir de celulose.

OBAZU et al., (2012) em reator anaeróbio de leito fluidizado apresentaram que por meio de recirculação termofílica houve uma produção volumétrica de energia líquida positiva, com eficiência energética de 49,3%. Houve a ocorrência simultânea de elevadas produtividades volumétricas, de $231,3\text{ mmol }H_2.L^{-1}.h^{-1}$ e elevado rendimento, de $3,55\text{ mol }H_2.\text{mol glicose}^{-1}$, por meio da elevação de temperatura para $70\text{ }^\circ\text{C}$.

3.6.2. Glicerol como Substrato

O glicerol, subproduto do biodiesel, vem tornando-se um substrato promissor na produção de biohidrogênio. Contudo poucos trabalhos tem usado esse substrato, sendo a maioria deles em reatores bateladas e sob condições mesofílicas.

NGO et al., (2011) em temperatura hipertermofílica com reatores bateladas e cultura pura, obtiveram bons rendimentos na produção de hidrogênio. Eles obtiveram $2,73$ e $1,98\text{ mol }H_2.\text{mol}^{-1}\text{ glicerol consumido}$, tendo glicerina pura e glicerol bruto como substratos, respectivamente.

SITTIJUNDA e REUNGSANG (2012) com reatores em batelada, utilizando um lodo termofílico, com uma cultura mista e anaeróbia de microorganismo obtiveram um

rendimento $0,67 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$ de glicerol bruto e $0,99 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$ de glicerina pura, alguns nutrientes também foram utilizados. *Thermoanaerobacterium* sp foi a bactéria presente na fermentação.

MARU et al., (2012), em ensaios bateladas utilizando microrganismos hipertermofílicos (*Thermotoga marítima* e *Thermotoga neapolitana*) à uma temperatura de $80 \text{ }^\circ\text{C}$ obtiveram valores de rendimento de H_2 próximos do teórico na fermentação de glicerol ($2,75$ e $2,65 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol glicerol consumido}^{-1}$). Nesse trabalho também se notou que entre os subprodutos da fermentação, 90% foi ácido acético, o que justifica o alto valor de rendimento atingido, já que o teórico é de 3 mol H_2 por mol de glicerol via acetato.

No trabalho de MARU et al., (2013) sob condições hipertermofílicas em ensaios bateladas, com cultura pura (*T. marítima* DSM 3109), também foi obtido alto rendimento ($2,84 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol glicerol consumido}^{-1}$). Nesse trabalho também se observou a baixa diversidade de produtos formados na fermentação, o que favorece o maior rendimento de H_2 , que são superiores comparados para trabalhos com microrganismos mesofílicos.

Em geral, a produção de H_2 , sob temperaturas elevadas é termodinamicamente mais favorável (VERHAART et al., 2010) . Além disso, algumas vantagens como: uma viscosidade mais baixa, melhor mistura, menor risco de contaminação, taxas mais elevadas de reação e sem necessidade de refrigeração do reator, são reconhecidas sob condições termo e hipertermofílicas na produção de H_2 (WIEGEL et al., 1985).

Apesar da maioria dos trabalhos reportados na literatura serem mesofílicos, tem aumentado muito a produção de hidrogênio sob condições termofílicas e hipertermofílicas (Tabela 3.6).

Tabela 3. 6: Faixas de temperaturas para produção de hidrogênio a partir de glicerol bruto e glicerina pura.

Tipo de Reator	Substrato	Temperatura °C	Inóculo	HY (mol H ₂ .mol glicerol ⁻¹)	Referência
Contínuo de leito fixo	Glicerina pura	37	Cultura Pura	–	ITO et al.(2005)
Contínuo de leito fixo	Glicerol bruto		Cultura Pura	–	
Batelada	Glicerina pura	37	Cultura Pura	1,05	ITO et al.(2005)
Batelada	Glicerol bruto		Cultura Pura	1,12	
Batelada	Glicerol bruto	30	Cultura Pura	0,3	REUNGSANG et al. (2012)
Batelada	Glicerol bruto	80	Cultura Pura	2,75	MARU et al. (2012)
Batelada	Glicerol bruto	80	Cultura Pura	2,65	
Batelada	Glicerol bruto	80	Cultura Pura	2,85	MARU et al. (2013)
Batelada	Glicerol bruto	37	Cultura Pura	3,00	KIVISTO et al. (2013)

Tabela 3.6: Faixas de temperaturas para produção de hidrogênio a partir de glicerol bruto e glicerina pura (**Continuação**).

Tipo de Reator	Substrato	Temperatura °C	Inóculo	HY (mol H ₂ .mol glicerol ⁻¹)	Referência
Batelada	Glicerol bruto	40	Cultura Pura	1,1	MANGYIL et al.(2012)
Batelada	Glicerol bruto	75	Cutura Pura	2,73	NGO e SIM (2011)
Batelada	Glicerina pura	75	Cutura Pura	1,98	
Batelada	Glicerol bruto	37	Cultura Mista	0,41	SEIFERT (2009)
Batelada	Glicerol bruto	30	Cultura Mista	0,31	SELEMBO et al. (2009)
Batelada	Glicerina pura	30	Cultura Mista	0,28	
Batelada	Glicerina pura	35	Cultura Mista	0,8	DE SÁ et al. (2013)
Batelada	Glicerol bruto	55	Cultura Mista	0,67	SITTIJUNDA e REUNGSANG (2012)
Batelada	Glicerina pura	55	Cultura Mista	0,99	
Batelada	Glicerol bruto	35	Cultura Mista	–	AKUTSU et al. (2009)
Batelada	Glicerol bruto	55	Cultura Mista	–	KUMAR et al. (2012)
Batelada	Glicerol bruto	40	Cultura Pura	0,25	CHOOKAEW et al. (2012)
Batelada	Glicerol bruto	80	Cultura Pura	0,89	MARKOV et al.(2011)
Batelada	Glicerina pura	30	Cultura Pura	–	LO et al. (2013)
CSTR	Glicerina pura	35	Cultura Pura	0,5	
CSTR	Glicerol bruto	35	Cultura pura	0,77	REUNGSANG et al.,(2013)
UASB	Glicerol bruto	30	Cultura Pura	–	
UASB	Glicerina pura	30	Cultura Pura	0,32	

Na Tabela 3.6, pode-se notar maiores rendimentos sob temperaturas hipertermofílicas e termofílicas em relação aos trabalhos sob temperaturas mesofílicas.

O rendimento variou entre 0,28 e 3 mol H₂ .mol glicerol⁻¹, notável que os maiores rendimentos foram atingidos utilizando-se cultura pura. Entretanto, como já lembrado nos textos anteriores, o rendimento máximo de H₂ varia muito dependendo da rota metabólica adotada.

3.7. Considerações Finais

Diante dos fatos, a produção de biodiesel tende a aumentar cada vez mais no decorrer dos anos. Sendo assim fica evidente que o glicerol será um problema cada vez maior para indústrias que produzem esse biocombustível.

A utilização de glicerol como substrato no tratamento anaeróbio, é sugerida como alternativa atrativa, pois além de proporcionar a adequação ambiental é também responsável pela recuperação de energia na forma de H₂ e Etanol, bem como outros subprodutos de alto valor comercial, como é o caso do 1,3-propanodiol.

Como foi relatada nessa revisão a produção anaeróbia de hidrogênio por diversos substratos (glicose, glucose, sacarose, xilose, celulose, etc) em reatores contínuos, já foi bastante estudada. Entretanto a produção desse biocombustível a partir do glicerol ainda é incipiente. A maioria dos estudos que envolvem produção de biohidrogênio entre outros substratos a partir do glicerol foi realizada em reatores bateladas.

As condições operacionais estudadas (material suporte, temperatura, TDH e pH) também visam esclarecer alguns fatores que influenciaram a produção de H₂ a partir de glicerol em reator contínuo. Sabe-se que do ponto de vista econômico e tecnológico a condição mesofílica é preferível comparada a termofílica. Contudo a literatura confirma que o rendimento de H₂ vem sendo maior sob condições termofílicas.

Apesar de inúmeros trabalhos com reatores contínuos na produção de biohidrogênio poucos o são tendo glicerol como substrato. O reator anaeróbio de leito fluidizado (RALF) também comprovou seu favorecimento na produção de H₂ para

diversos substratos, porém ainda não há estudos da produção de hidrogênio com glicerol para com esse tipo de reator.

Assim, neste trabalho é proposto o tratamento anaeróbio do glicerol a fim da produção de H_2 , entre outros metabólitos em RALF sob condições termofílicas. A variação do TDH foi estudada entre a faixa de 14 a 1h a fim de se encontrar a melhor condição para produção de H_2 , bem como de outros produtos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo será abordado o reator, os materiais utilizados e também o procedimento experimental utilizado para aquisição dos dados experimentais durante o trabalho.

Tanto a operação do reator quanto a maioria das análises físico-químicas foram realizadas no Laboratório de Controle Ambiental II (LCA II) localizado no Departamento de Engenharia Química (UFSCar). As análises de HPLC foram realizadas no Laboratório de Processos Biológicos (LPB) da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC). Análises de 1,3-propanodiol e o Etanol foram realizadas no Laboratório de Bioquímica também localizado na UFSCar.

A fim de atingir o objetivo especificado no item 2, a operação do reator foi efetuada em oito fases, as quais eram determinadas de acordo com a variação do TDH. O reator foi operado a uma concentração fixa do substrato em função da DQO, no valor de 5 g.L^{-1} sob temperatura de $55 \text{ }^\circ\text{C}$, variando-se o TDH de 14 à 1h, como forma de encontrar a melhor condição para a produção biológica de hidrogênio (Figura 4.1).

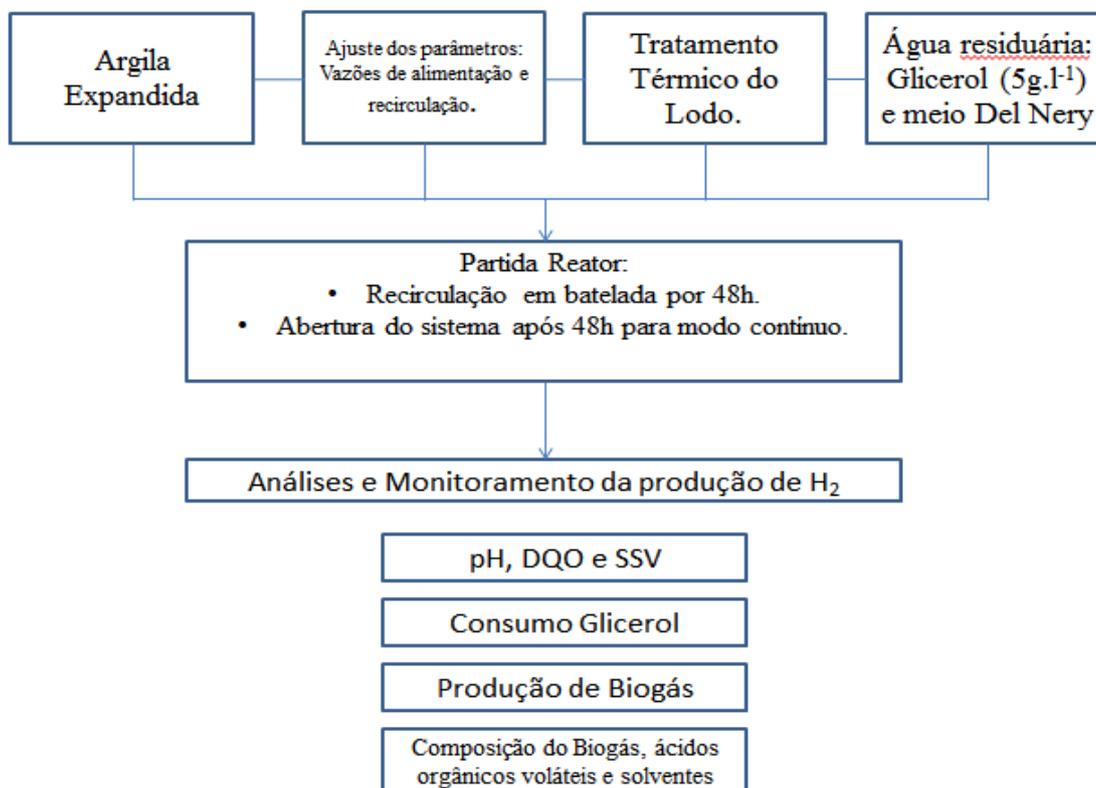


Figura 4.1: Fluxograma geral do experimento realizado.

4.1. Reator Anaeróbio de Leito Fluidizado (RALF)

Utilizou-se um reator anaeróbio de leito fluidizado construído em aço inox com 5 mm de espessura e as seguintes dimensões: altura de 150 cm e diâmetro interno de 4,1 cm, com volume total de 1979 cm³ (Figuras 4.2 e 4.3).

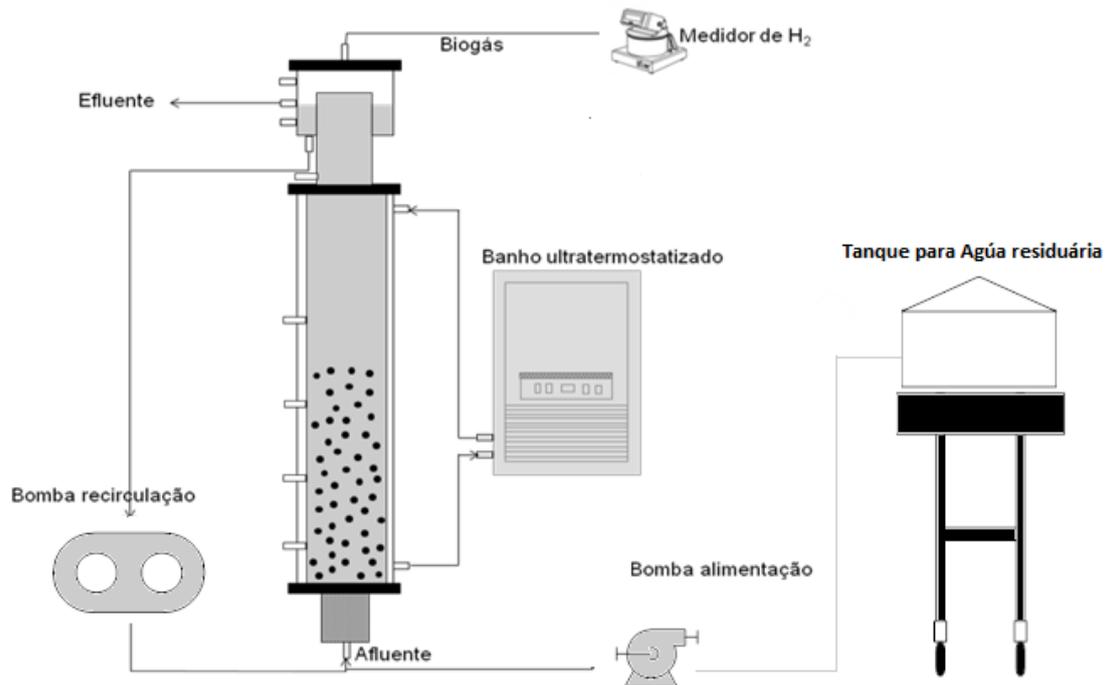


Figura 4.2: Esquema ilustrativo da instalação do reator anaeróbio de leito fluidizado



Figura 4.3: Reator anaeróbio de leito fluidificado termofílico

As condições fluidodinâmicas do reator, tais como velocidade de mínima fluidização e vazão de recirculação para a argila expandida, foram calculadas a partir de dados experimentais de velocidade superficial e perda de carga. De acordo com os cálculos fluidodinâmicos, foram adicionados 560 g de cinasita, correspondendo a 58 cm da altura do leito fixo (H_0) e 63 cm da altura do leito fluidizado (H_f).

A partir dos dados experimentais da velocidade mínima de fluidização (V_{mf}) foi possível calcular a vazão de recirculação necessária para que o reator atingisse as condições de fluidificação, ou seja, correspondente a 1,3 vez V_{mf} . O valor da velocidade de mínima fluidificação para a partícula de argila expandida foi de $1,24 \text{ cm s}^{-1}$. A próxima etapa foi o acionamento da bomba de recirculação, deixando o sistema permanecer em recirculação como se estivesse em batelada com uma vazão de recirculação de 172 L h^{-1} .

4.1. Material Suporte

Devido ao bom desempenho comparado a outros materiais testados pelo grupo, a argila expandida (cinasita) foi utilizada como material suporte na imobilização da biomassa no presente trabalho (Figura 4.4).



Figura 4. 4: Argila expandida para utilização como suporte para aderência das populações microbianas.

Características como fácil obtenção, material inerte, rugosidade e porosidade foram determinantes na escolha do material suporte (Tabela 4.1).

Tabela 4.1: Características do meio suporte para a imobilização da Biomassa.

Material Suporte	Dimensão (mm)	Densidade (g.cm ⁻³)	V mf (cm.s ⁻¹)
Argila Expandida	2,8-3,35	1,5	1,24

A argila expandida proveio de pedras para uso de jardinagem e passaram por um tratamento granulométrico para que as partículas ficassem na faixa granulométrica menor que 5,0 mm. Somente as partículas com densidade maior que a da água foram selecionadas para utilização como material suporte, sendo descartadas as partículas que flutuaram.

4.2. Substrato

4.2.1. Glicerol

O glicerol foi proveniente da indústria BioVerde Indústria e Comércio de Biocombustíveis S.A. , localizada na cidade de Taubaté-SP.

Um breve fluxograma da produção de biodiesel, bem como a produção de glicerol está apresentado na Figura 4.5.

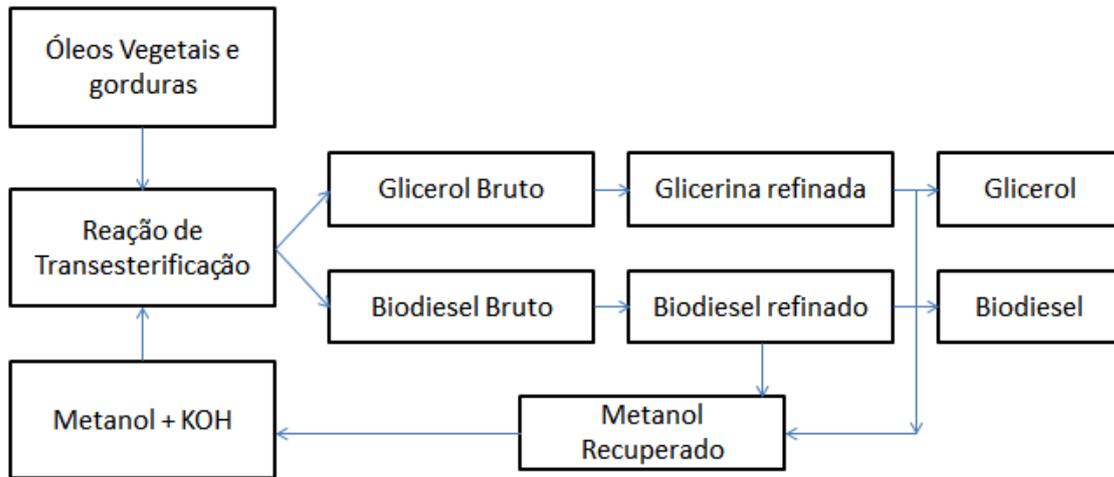


Figura 4.5: Fluxograma da produção de Biodiesel.

O glicerol utilizado nos experimentos foi coletado uma única vez. Logo após a coleta o efluente ficou armazenado num recipiente de aço (186 Kg), e mantido sob temperatura ambiente para que fossem preservadas as características físico-químicas do mesmo.

A caracterização do glicerol apresentou uma DQO de $1.000.000 \text{ mg.L}^{-1}$. As demais características estão apresentadas na Tabela (4.2) a seguir.

Tabela 4.2: Características do glicerol utilizado nos experimentos.

Parâmetros	Unidades Especificação	Valores
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
Valores Informativos		
Ponto de Fugor	°C	110
Fluidez	°C	Fluído à 40 °C
Densidade aparente (30 °C)	g.ml ⁻¹	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).

A alimentação do reator foi realizada diariamente, glicerol era submetido à um aquecimento entre 40 e 60 °C, a fim de promover uma melhor homogeneização com a água e o meio com adição de nutrientes (meio segundo Del Nery). Além disso, o pH do afluente era ajustado entre 6 e 7, de acordo com o valores do pH efluente (4 a 5,5), sendo ácido clorídrico 30% (HCl) utilizado.

4.2.2. Água Residuária

A alimentação do RALF foi com água residuária sintética adaptada de Del Nery (1987): substituindo a glicose como substrato principal por glicerol bruto (Tabela 4.3).

Tabela 4.3: Composição da água residuária sintética a ser utilizada

Composto	Concentração (mg L⁻¹)
Glicerol Bruto	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	21,7
Fosfato de sódio dibásico	33,4

Fonte: Del Nery (1987), adaptada.

4.3. Lodo

O lodo utilizado para inoculação do reator RALF termofílico foi proveniente de lodo granulado de reator termofílico anaeróbico de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB) para o tratamento de vinhaça, localizado na Usina São Martinho, Pradópolis-SP (Figura 4.6).



Figura 4. 6: Reator UASB termofílico utilizado no tratamento de vinhaça na Usina São Martinho, Pradópolis, SP.

A fim de eliminar os microrganismos metanogênicos foi utilizado pré-tratamento (Choque Térmico) do inóculo de acordo com Kim et al. (2006), no qual o lodo é aquecido sob constante agitação até atingir 90 °C e em seguida foi mantido nessa temperatura por 10 minutos, sendo por fim resfriado a 25 °C em banho de gelo.

4.4. Operação do Reator anaeróbio de leito fluidizado

A temperatura de operação foi mantida constante à $(55 \pm 1) ^\circ \text{C}$, controlada através de um banho termostaticado. Duas bombas foram necessárias para o reator no sistema, sendo uma para alimentação e outra para recirculação.

O reator foi preenchido com argila expandida, até a altura que garantisse a velocidade mínima de fluidização ($1,24 \text{ cm.s}^{-1}$).

A fim de garantir a temperatura no reator sob 55 °C a implantação de uma serpentina em formato de “U” no leito deste, junto ao uso da camisa de termostatização no interior das quais circula água proveniente de um banho ultratermostaticado a 60 °C, se fez necessário.

A inoculação do reator foi realizada com 10% de lodo em volume, ou seja, sendo preparados 10L de água residuária (glicerol bruto e meio Del Nery), 1L correspondia ao lodo termicamente tratado. Houve também um ajuste no pH, utilizando solução 30% de HCl, sendo assim o pH inicial ficou entre 5,6 e 5, a fim de eliminar a possibilidade de microrganismos metanogênicos. Após a inoculação seguida de 48h em modo batelada, o sistema finalmente foi aberto e o reator então operado em modo contínuo. Durante a operação em modo contínuo variou-se o TDH em oito fases, contabilizando 274 dias de operação (Tabela 4.4).

Tabela 4.4: Condições operacionais impostas ao RALF termofílico para a produção de H₂ a partir de glicerol bruto.

Fase	Tempo (dias)	TDH (h)	Glicerol (mg.L⁻¹)
1	65	14	5000
2	30	12	5000
3	20	10	5000
4	32	8	5000
5	30	6	5000
6	33	4	5000
7	21	2	5000
8	15	1	5000

4.5. Métodos Analíticos

4.5.1. Volume de gás produzido

Através do medidor de volume de gás (Milligas Counter da Ritter) foi possível a medição do volume de gás produzido no reator.

4.5.2. Composição de Biogás

A análise da composição do biogás gerado – hidrogênio (H₂) e dióxido carbono (CO₂) - foi realizada em cromatógrafo gasoso (Shimadzu GC-2010, japan), equipado com uma coluna capilar Carboxen 1010 PLOT (30 m x 0,53 mm) e detector de condutividade térmica (DCT). A temperatura do injetor, do detector foi mantida em 220°C e 230°C, respectivamente, e a rampa de aquecimento da coluna foi de 130°C a 135°C, a 46°C.min⁻¹. A vazão do gás de arraste (Argônio) utilizado foi de 5,66 mL.min⁻¹ e o volume de amostra injetado foi de 500 µL.

4.5.3. Determinação da Concentração de Glicerol

A quantidade consumida de glicerol foi determinada pelo método espectrofotométrico, segundo BONDIOLLI e BELLA., (2005).

4.5.4. Demais Análises Físico-químicas

As análises de pH, Demanda Química de Oxigênio (DQO) e Sólidos Suspensos Voláteis(SSV) foram realizadas baseadas no Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2005).

As análises físico-químicas foram realizadas periodicamente (Tabela 4.5).

Tabela 4.5: Análises de monitoramento do reator.

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

4.5.5. Determinação de ácidos orgânicos voláteis

As concentrações de ácidos (acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico, fórmico, láctico, succínico e capróico), foram medidas através de cromatografia líquida (HPLC SHIMADZU), equipado com uma bomba (LC-10 ADVP), um amostrador automático (HT SIL- 20 A), um forno de coluna (CTO- 20 A) à 43 °C, um detector de índice de refração (RID-10 A), um controlador de sistema (SCL-10AVP) e uma coluna de HPX- 87 H Aminex (300 mm, 7,8 mm Bio-Rad). Na fase móvel utilizou-se H₂SO₄ à 0,5 mL.min⁻¹.

4.5.6. Determinação de 1,3-propanodiol e Etanol

Etanol e 1,3-propanodiol foram identificados por um sistema cromatográfico (WATERS), equipado com 2 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= 0.6mL.min⁻¹
- Coluna Aminex HPX-87H
- Fase móvel H₂SO₄ 0,005M

Foram injetados 20 μ L 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.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são expressos os principais resultados dos parâmetros analisados durante a operação do reator. As principais informações são ilustradas através de figuras e tabelas, a fim de facilitar a interpretação dos dados. O trabalho foi efetuado em um reator anaeróbio de leito fluidizado termofílico, o qual foi realizado em oito etapas, denominadas de fases: I, II, III, IV,V, VI, VII e VIII, referentes respectivamente aos tempos de detenção hidráulica (TDH) de 14, 12, 10, 8, 6, 4, 2 e 1h. A concentração de substrato foi fixada em função da Demanda Química de Oxigênio (DQO), em 5g.L^{-1} . As fases de operação tiveram duração em média de 15 dias, com exceção das primeiras fases que tiveram duração entre 65 e 40 dias devido à instabilidade nos valores de alguns parâmetros, como: DQO, conversão de glicerol e rendimento de H_2 . Por se tratar de um resíduo complexo e nunca estudado pelo grupo, isso também justificou a maior duração das primeiras fases de operação no reator.

Ao todo foram 274 dias de operação do reator. O TDH era alterado à medida que o sistema atingisse estabilidade nos principais parâmetros. A variação do TDH foi efetuada sobre o sistema em função da vazão de entrada da água residuária.

Para a adaptação da biomassa e aderência ao material suporte, o experimento foi iniciado com a operação do reator em modo batelada durante 48h. Após este período, o sistema foi aberto em modo contínuo com TDH inicial de 14h. O TDH de 14h foi escolhido em função de valores semelhantes para reatores contínuos, tendo glicerol como substrato, já reportados na literatura (ITO et al., 2005; LO et al., 2013 e REUNGSANG et. al., 2013).

Foram expressos os valores médios de cada fase dos principais parâmetros avaliados em função do TDH.

5.1. Eficiência na conversão de Glicerol

Em resumo apesar de estável a produção de H₂ na maioria das fases, exceto no TDH de 1h no qual o rendimento se duplica, ocorreu consumo incompleto de substrato e certa oscilação na conversão de glicerol ao longo da variação do TDH (Figura 5.1 e Tabela 5.1). Primeiramente nota-se que houve um aumento na eficiência da conversão de substrato entre o TDH de 14h e 10h (36 para 55%), sendo que para o TDH de 10h se obteve a maior eficiência (55,4%). Em seguida, a partir do TDH de 8h, percebe-se que há um decaimento na eficiência da conversão de glicerol em aproximadamente 10%. Entre o TDH de 6 a 2h a eficiência fica ainda menor (36%), porém estável. Finalmente ao atingir-se o TDH de 1h a eficiência na conversão de substrato atinge seu menor valor (16%). Em suma pode-se dizer que não ocorreu certa estabilidade na conversão de substrato em função da variação de TDH, além disso, pode-se dizer que no TDH de 10h a eficiência atinge seu maior valor.

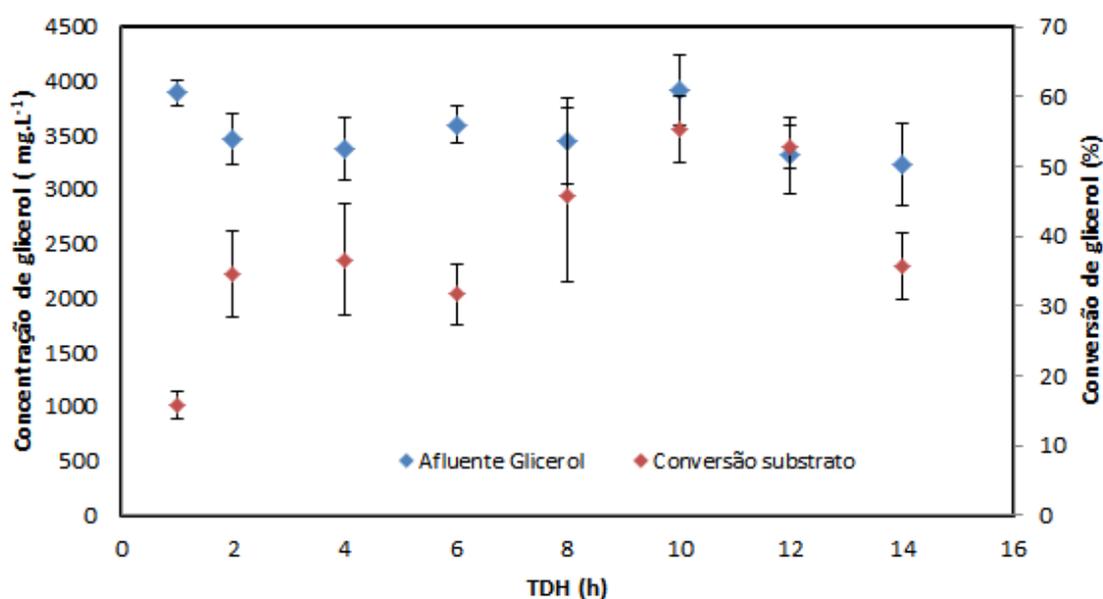


Figura 5. 1: Concentração e conversão médias de glicerol em função do TDH.

Tabela 5.1: Valores Médios e seus respectivos desvios-padrão em função do TDH aplicado.

TDH (h)	Glicerol Afluente (mg.L ⁻¹)	Glicerol Efluente (mg.L ⁻¹)	Conversão (%)	HY (mol H ₂ . Mol glicerol ⁻¹)	TDH Médio (h)
14	3230 ± 383	2480 ± 631	35,8 ± 4,8	1,2	13,86 ± 1,26
12	3314 ± 354	1989 ± 542	52,8 ± 3,2	1,2	11,79 ± 0,69
10	3914 ± 329	1858 ± 404	55,4 ± 4,8	1,4	9,92 ± 0,49
8	3449 ± 395	2135 ± 621	45,9 ± 12,6	1,4	8,05 ± 0,28
6	3599 ± 164	2497 ± 265	31,6 ± 4,3	1,4	5,86 ± 0,46
4	3367 ± 288	2211 ± 592	36,6 ± 7,9	1,4	4,20 ± 0,21
2	3464 ± 233	2205 ± 342	34,6 ± 6,1	1,4	2,00 ± 0,04
1	3890 ± 111	2378 ± 103	15,8 ± 2,0	3,0	0,94 ± 0,04

As análises de consumo do substrato foram realizadas diariamente pouco antes da troca da água residuária, isso, no entanto pode ser a causa pela concentração do afluente estar abaixo do que foi definido no projeto (5g.L⁻¹), pois pode ter ocorrido a degradação desse substrato no próprio recipiente durante a alimentação.

Poucos são os trabalhos reportados na literatura em reatores contínuos utilizando glicerol como substrato, além disso, a maioria deles são operados sob condições mesofílicas (30 à 37 °C). Apesar de reator batelada, utilizando glicerol bruto, SITIJUNDA e REUNGSANG (2012) em condições termofílicas (55 °C) com cultura mista sendo a concentração de substrato de 22 g.L⁻¹ e também NGO e SANG (2011) em reator hipertermofílico (75 °C) com cultura pura e concentração de substrato de 5 g.L⁻¹, obtiveram conversões de substratos entre 33 e 20%.

Já em reatores contínuos mesofílicos a conversão de glicerol passa dos 90% como no trabalho de LO et al., (2013) com conversão de 97% e REUNGSANG et al., (2013) que chega a atingir 100% de conversão. Porém não houve variação de TDH nesses trabalhos, pois ambos foram realizados no TDH fixo de 12 e 24h, respectivamente.

Entre os trabalhos com RALF, sendo a maioria sob condições mesofílicas, obtiveram conversões de substrato em torno de 90%, tendo glicose ou sacarose como fonte de carbono e com variação no TDH em média de 8 a 1h (AMORIM et al. 2009; WU et al. 2003; LIN et al. 2006 e SHIDA et al. 2009). Em contrapartida ZANG et al., (2007) e BARROS et al., (2010) ao trabalharem nas mesmas condições operacionais e o

com mesmo substrato em RALF, também verificaram uma diminuição na conversão de substrato (99 % para 72%) entre o TDH de 4 a 1h. PEINTNER et al., (2010) sob temperatura termofílica para produção de H₂ em reator de leito percolado e reator de leito fluidizado também notaram a conversão incompleta de glicose.

Dessa forma, uma hipótese seria, que uma menor eficiência na conversão de substrato é característica de biorreatores sob condições termofílicas. Além disso, pode-se dizer que uma significativa queda na conversão de substrato ocorre para TDH baixo (1h), devido à dificuldade de permanência dos microrganismo em uma alta taxa de carregamento orgânico (TCO). Fatores como a rota metabólica, tipo de reator, tipo de inóculo, entre outros também podem influenciar na conversão de substrato.

5.2. Comportamento e Efeito do pH na produção de Hidrogênio

Pode-se dizer que o pH do efluente manteve-se estável entre 4,4 e 5 em função do TDH (Tabela 5.2). Durante toda a operação foi realizado o controle do pH utilizando-se uma solução de Ácido Clorídrico 30% em função dos valores de pH efluente. Ou seja, media-se o pH efluente com auxílio do peagamêtro, caso o valor medido fosse superior a 5 era adicionado a solução de HCl 30% o qual direcionava o pH afluente para uma média entre 6 e 7.

Tabela 5. 2: Valores médios de pH afluente e pH efluente para glicerol bruto.

Fase	TDH	pH Afluente	pH Efluente
I	14	6,2 ± 0,9	4,6 ± 0,3
II	12	6 ± 0,2	4,5 ± 0,2
III	10	7,5 ± 0,5	4,4 ± 0,1
IV	8	6,9 ± 0,9	5,1 ± 0,6
V	6	6,3 ± 0,6	5,1 ± 0,3
VI	4	7,3 ± 0,5	4,9 ± 0,5
VII	2	7,9 ± 0,1	4,7 ± 0,2
VIII	1	7,6 ± 0,2	4,8 ± 0,2

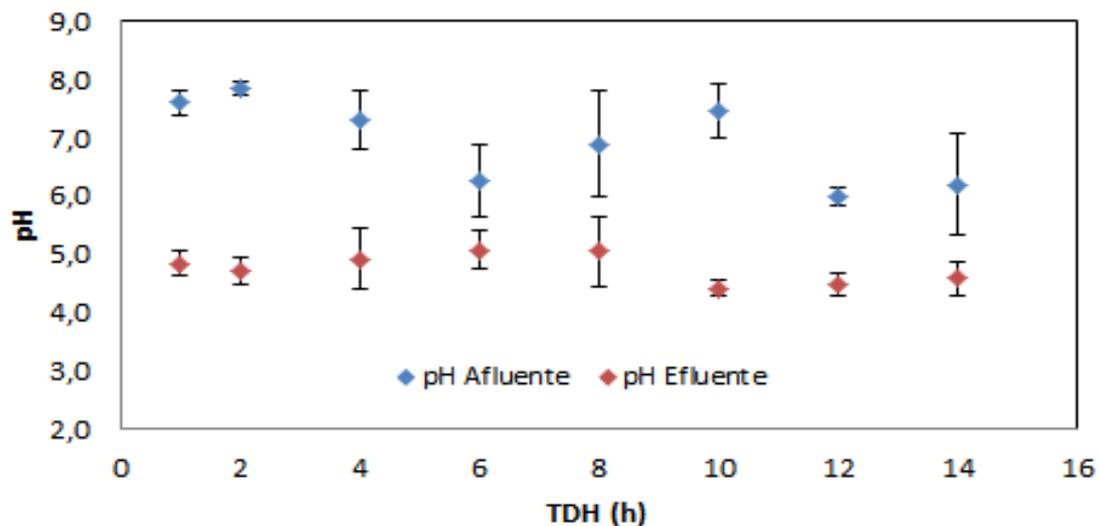


Figura 5. 2 Comportamento do pH afluente e efluente e respectivos desvios-padrão para glicerol bruto em função do TDH.

Na Figura 5.2, nota-se que o pH efluente manteve-se constante com a variação do TDH no reator, devido ao controle do pH afluente em função do pH efluente como já citado anteriormente.

SELEMBO et al. (2009), tendo glicerol bruto e glicerina pura como substrato (3 g.L^{-1}) para produção de H_2 , sob condições mesofílicas e com cultura mista, obtiveram um pH de 6,2 para ambos os substratos.

VLASSIS et al., (2012), como também já reportado anteriormente na revisão bibliográfica, utilizando glicerina pura em reator batelada estudaram o efeito do pH entre 8 e 4,5 para produção de H_2 sob condições mesofílicas com cultura mista. Nesse estudo obtiveram maiores rendimentos de H_2 para o pH de 6,5, sendo que em pH alcalino os rendimentos de H_2 foram menores que em pHs ácidos.

DE SÁ et al. (2013) utilizando glicerol puro como substrato, sob condições termofílicas e cultura mista (lodo de esgoto municipal), observaram um pH inicial de 5,5 para produção de H_2 . Nesse trabalho não houve controle do pH durante a operação do reator.

Dentre os trabalhos atuais, tendo glicerol como substrato em reatores contínuos, tanto LO et al., (2013) com TDH de 12h como REUNGSANG et al., (2013) com TDH de 24h, também não obtiveram mudanças no pH (7,5 e 5,0), respectivamente. Entretanto ambos os trabalhos utilizaram cultura pura como inóculo.

Apesar de ter glicose como substrato, na maioria dos reatores de leito fluidizado reportados até o momento, observou-se o mesmo comportamento do pH para maioria dos trabalhos reportados na literatura para produção de H₂ em RALF.

SHIDA et al., (2009) em RALF sob condições mesofílicas (37 °C), com glicose como substrato e cultura mista como inóculo, obtiveram valores de máximo e mínimo de pH (4,4 e 3,5), respectivamente. Entretanto o pH manteve-se estável durante toda operação, na qual variou-se o TDH de 8h a 1h.

AKUTSU et al. (2009) em condições termofílicas tendo amido como substrato notaram que a produção de H₂ foi favorecida com a diminuição do TDH. Os valores de pH mantiveram-se constantes torno de 4,8, o qual no foi monitorado durante a execução do trabalho.

No estudo de BARROS et al., (2012), tendo glicose como substrato em RALF, utilizando cultura mista como inóculo, o pH efluente, assim como no presente trabalho, também foi estável durante todo o período de operação, mantendo-se dentro da faixa ideal para produção de H₂ em reator acidogênicos (3,5 à 6).

MUÑOZ-PÁEZ (2013) operando RALF tendo sacarose como substrato verificou que o pH do meio reacional manteve-se entre 4 e 5 para produção de H₂.

Nota-se que o pH, por ser controlado, não influenciou nos principais parâmetros que apontam a produção de H₂: rendimento de H₂, quantidade de H₂ no biogás e conversão de substrato (Figura 5.3 e 5.4).

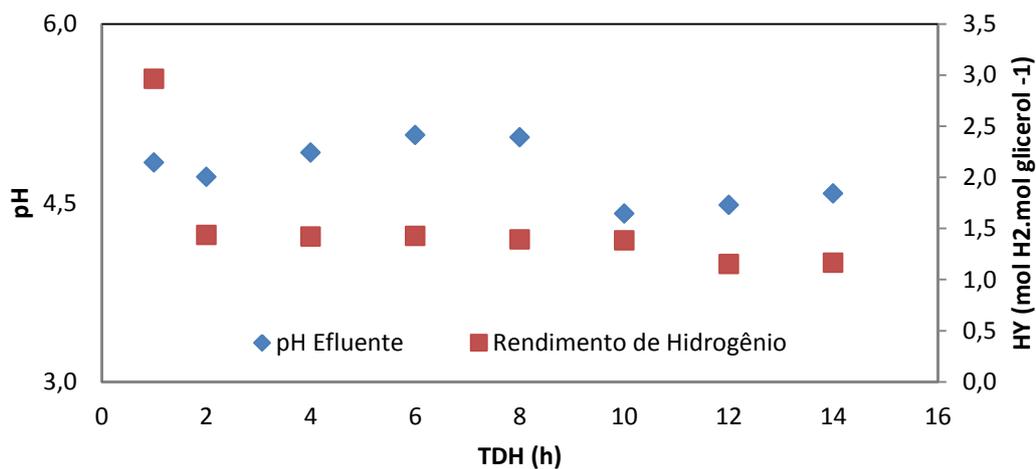


Figura 5. 3: Rendimento de H₂ e pH função do TDH.

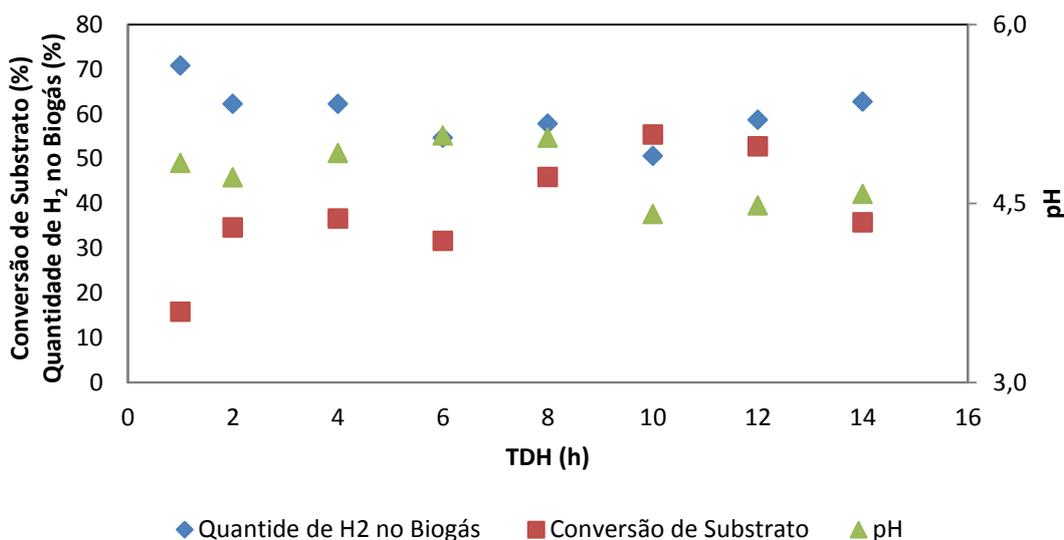


Figura 5. 4: Conversão de substrato e quantidade de H₂ no biogás em função do pH e TDH.

Os principais trabalhos em modo contínuo e batelada, já citados durante a revisão bibliográfica, de certa forma, apresentam uma ampla faixa de pH (5 a 8) (Tabela 3.3), para produção de H₂ a partir de glicerol/glicerina como substrato.

Dessa forma, comparando a faixa de pH do presente trabalho com os reportados na literatura com glicerol como substrato e pelo grupo de trabalho em RALF, pode-se

dizer que o pH encontrado está dentro do que já foi estudado na produção de H₂ com glicerol bruto, bem como por se tratar de um RALF acidogênico.

5.3. Remoção de DQO

Por se tratar de um reator acidogênio, a remoção de matéria orgânica em função da demanda química de oxigênio foi em média de 15% para todas as fases de operação no reator termofílico (Tabela 5.3). A porcentagem relativamente baixa de remoção na DQO já era esperada por se tratar de um reator anaeróbico para produção de H₂. Certo valor presente na DQO das amostras é reflexo tanto da produção de metabólitos (ácidos e álcoois) quanto, também, de substrato que não foi consumido.

Tabela 5.3: Valores médios de eficiência na remoção de DQO para glicerol bruto.

Fase	TDH	Remoção de DQO		
		Eficiência	DQO Afluente (mg.L ⁻¹)	DQO Efluente (mg.L ⁻¹)
I	14	15,7	5999,3	5959,7
II	12	15,6	6822,0	6523,4
III	10	16,4	7496,2	6872,8
IV	8	17,7	7565,6	6568,8
V	6	13,1	7181,0	7181,0
VI	4	13,6	6349,8	6148,7
VII	2	10,4	7416,7	7416,7
VIII	1	11,0	7625,0	7525,0

A estabilidade na eficiência da remoção de DQO no reator (Figura 5.5) confirma a característica de um reator acidogênio, ou seja, não houve variação na remoção de DQO com a diminuição do TDH.

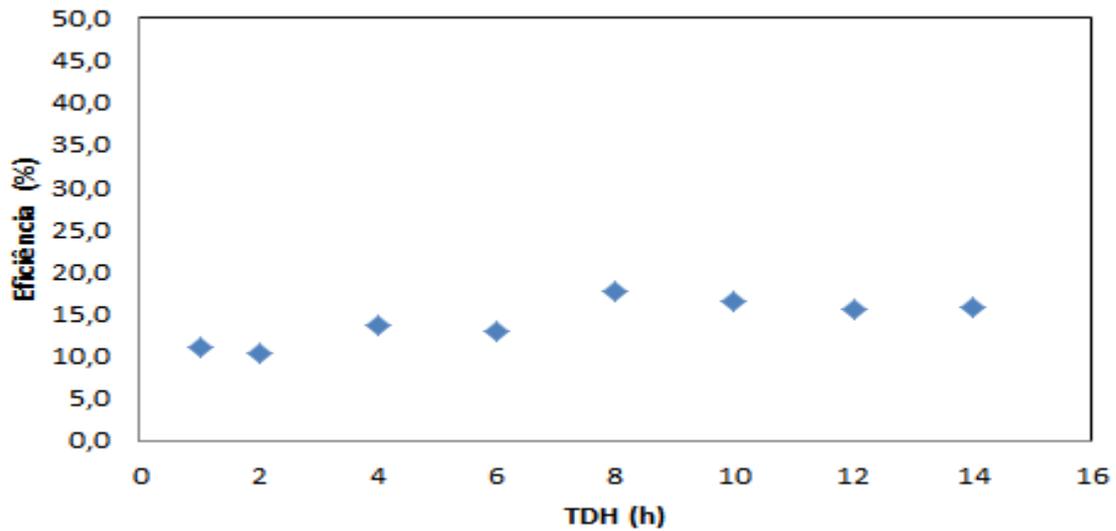


Figura 5.5: Eficiência na remoção de DQO para glicerol bruto em função do TDH.

Apesar de um parâmetro muito importante no tratamento de efluentes líquidos, a DQO removida em reatores produtores de H_2 é insuficiente para fins legislativos. A etapa metanogênica seria necessária caso esse efluente tivesse como destino um corpo receptor. Nesse trabalho o monitoramento da DQO nesse trabalho teve como objetivo facilitar o balanço de carbono através da quantificação da matéria orgânica, que será detalhada no tópico 5.7.

5.4. Glicerol bruto como Substrato: Principais Metabólitos

Uma ampla quantidade de metabólitos foi produzida durante a fermentação de glicerol. Entretanto dentre todos se destacam: ácido acético (HAc), ácido propiônico (HPr), ácido butírico (HBu), Etanol (EtOH) e 1,3-propanodiol (1,3-PD) (Figura 5.6, e Tabela 5.5).

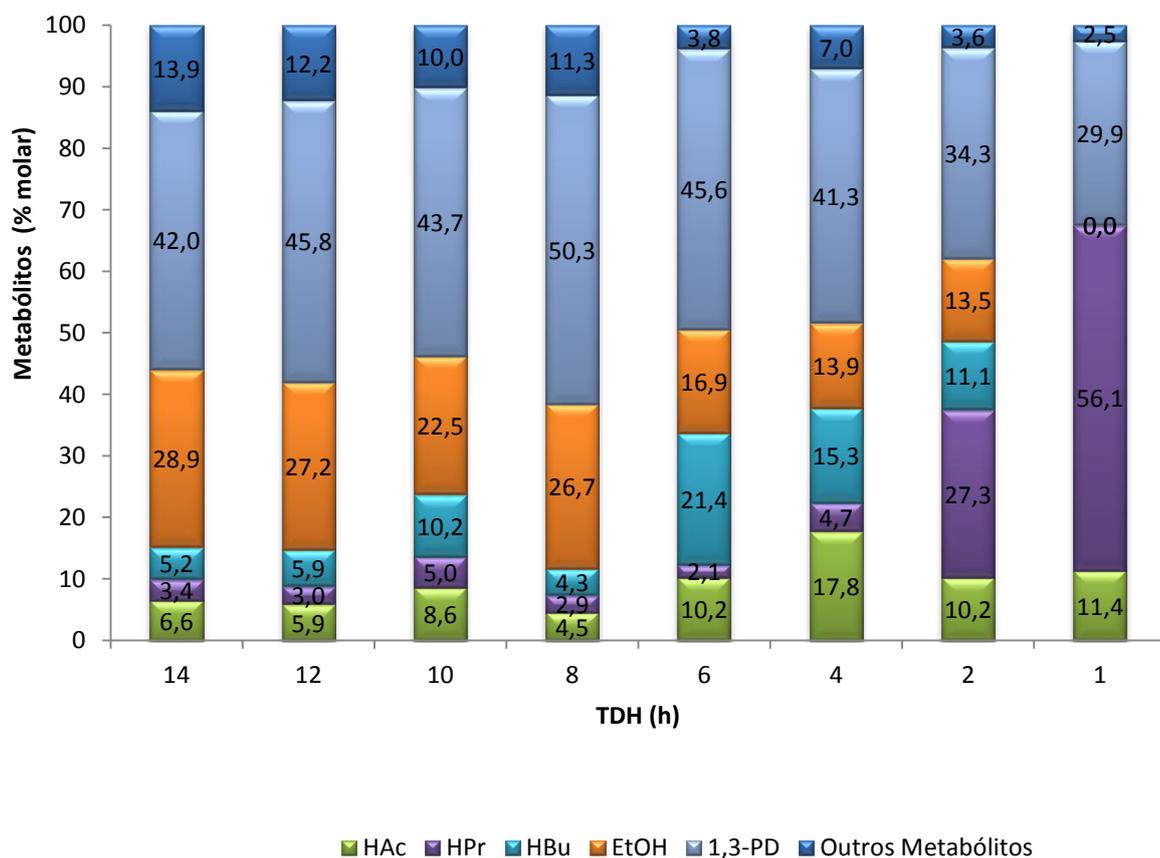


Figura 5. 6: Porcentagens do total de Metabólitos produzidos na fermentação de glicerol bruto em função do TDH.

Tabela 5.4: Concentrações médias (mg.L^{-1}) obtidas dos principais metabólitos produzidos em função do TDH em RALF para produção biológica de hidrogênio.

Fases	1,3-PD	HBu	HAc	EtOH	HPr	HY ($\text{mol H}_2 \cdot \text{mol glicerol}^{-1}$)
1	650,4	531,5	80,0	270,8	51,0	1,2
2	951,9	980,7	96,4	342,1	59,9	1,2
3	1127,8	907,1	175,5	350,7	124,8	1,4
4	910,3	698,4	64,0	292,7	51,8	1,4
5	635,5	637,4	112,4	142,3	28,5	1,4
6	700	2705,8	237,3	142,30	76,6	1,4
7	663,75	549,5	155,8	158,50	514,4	1,4
8	498,75	ND	149,8	ND	909,8	3,0

HSuc: ácido succínico; HLa: ácido láctico; HBu: ácido butírico; HAc: ácido acético; HISBu: ácido isobutírico; EtOH: etanol; HPr: ácido propiônico; ND: não detectado.

Em suma, pode-se afirmar que a produção de H_2 a partir da fermentação do glicerol teve como principais subprodutos 1,3-propanodiol, etanol, ácido acético e ácido butírico nas sete primeiras etapas, como nota-se na Figura 5.6. As porcentagens molares da produção desses metabólitos foram bastante significativas em relação aos demais subprodutos. 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 2h. Já a partir do TDH de 1h ocorreu o cessar da produção de etanol e predominância de ácido propiônico (56%) com 1,3-PD (30%) e ácido acético (11%) .

Percebe-se que para TDH de 14h às 2h a porcentagem de 1,3-propanodiol permaneceu estável, assim como o rendimento de H_2 . Entretanto já para o etanol nota-se que ocorreu uma queda na porcentagem com a diminuição do TDH. Ou seja, entre as fases I e VII, possivelmente houve uma rota fermentativa a qual favoreceu a produção de H_2 bem como a de 1,3-PD, porém prejudicou-se a formação de Etanol (Figura 5.7).

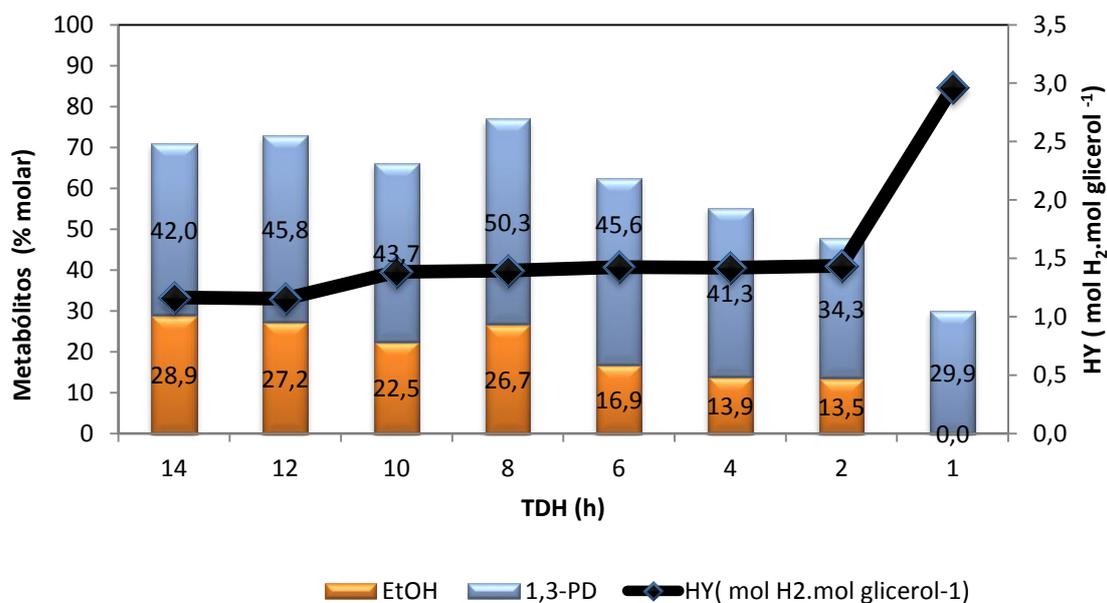
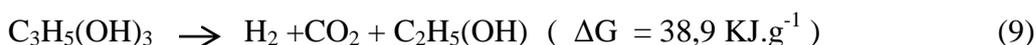


Figura 5. 7: Relação entre o rendimento de H₂ e porcentagens molar de Etanol e 1,3-Propanodiol.

As produções de H₂ e etanol pela fermentação de glicerol tem sido estudados (LIU e FANG., 2007; MARJOV et al., 2010 e OH et al., 2011). A Equação 9 mostra a fermentação de glicerol para a produção de H₂ e Etanol.

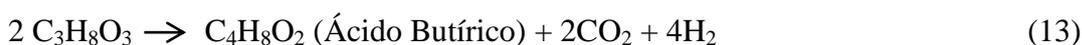


Baseada na equação (9) tem-se que o valor máximo teórico produzido de H₂ junto a etanol na fermentação de glicerol, deve ser de 1 mol.mol substrato⁻¹.

Como já comentado na revisão bibliográfica, há duas vias fermentativas para o glicerol (via oxidativa e via redutiva). Na via oxidativa, na qual é formado o piruvato, a fermentação do glicerol passa a ser comparada a uma fermentação de açúcares (glicose, xilose, etc) responsável pela produção de H₂, bem como outros metabólitos (YAZDANI e GONZALES., 2007).

Segundo HAWKES et al., (2002) e CHEN et al., (2009), elevadas concentrações de ácido butírico ou acético podem ser indicativas de alta produção de hidrogênio na

fermentação de glicose, como nota-se nas equações (10) e (11). O mesmo ocorre na fermentação de glicerol pelas equações (12) e (13) (SARMA et al., 2012).



As concentrações dos principais metabólitos: 1,3-Propanodiol, Etanol, ácido acético, ácido butírico e ácido propiônico no presente trabalho variaram entre: 1127 a 498; 350 a 0; 80 a 237; 2705 a 531 mg.L^{-1} , respectivamente. Assim sendo, o rendimento entre 1,2 à 1,4 $\text{mol H}_2 \cdot \text{mol glicerol}^{-1}$ encontrados para o TDH de 14h a 2h pode ser justificado pelas altas concentrações de metabólitos que favorecem a produção de H_2 como: Ácido Butírico, Ácido Acético e o Etanol bem como baixa quantidade de ácido propiônico que consome H_2 (Tabela 5.5).

Entretanto uma possível mudança na rota fermentativa de glicerol para produção de H_2 pode ter ocorrido para o TDH de 1h, pois apesar de estabilidade na produção de ácido acético houve um aumento da quantidade de ácido propiônico (Figura 5.8).

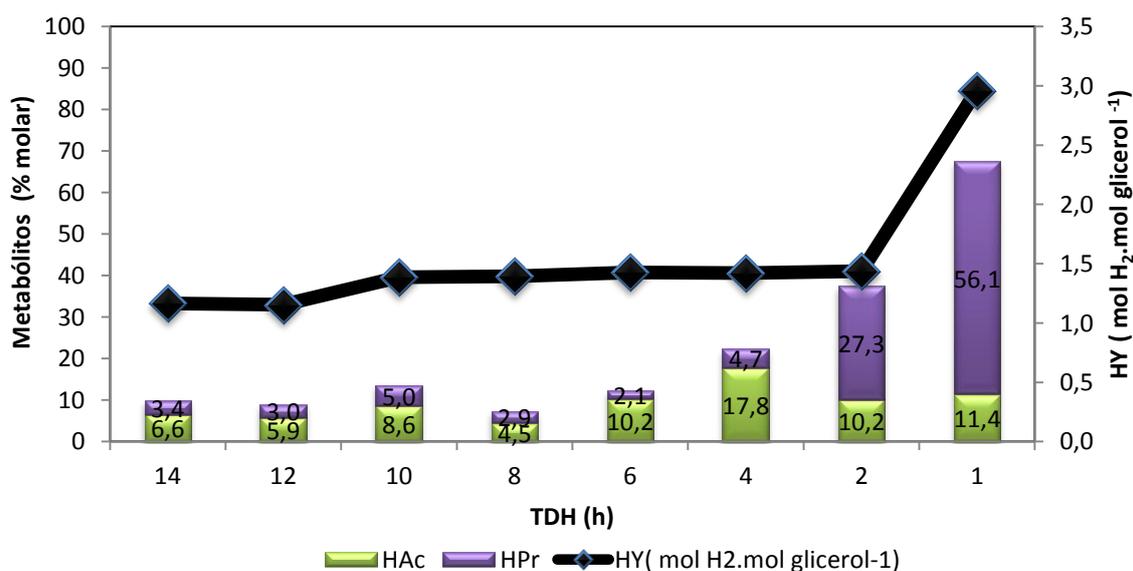


Figura 5.8: Relação entre rendimento de H_2 e porcentagem de Etanol e Ácido Propiônico.

ITO et. al., (2005), em reator contínuo com glicerol, obtiveram como principais metabólitos: etanol, 1,3-propanodiol, ácido fórmico, ácido acético e ácido láctico. LO et. al., (2013), também em reator contínuo (CSTR), tanto para glicerol bruto quanto para glicerina pura obtiveram os mesmo metabólitos obtidos por ITO et al., (2005) somados à butanol e ácido butírico. REUNGSANG et al., (2013), com reator UASB, além dos metabólitos produzidos por ITO et al., (2005) e LO et al., (2013), notaram também a presença de ácido propiônico.

Assim como no presente trabalho, 1,3-propanodiol foi o principal metabólito nos trabalhos citados anteriormente, seguido de etanol. LO et al., (2013) obtiveram 30% de 1,3-propanodiol entre os metabólitos, valor bem próximo do obtido no atual trabalho que foi em média de 45%, havendo uma leve queda passando para 30% no TDH 1h.

KIVISTO et al., (2013) com reator batelada tendo glicerol bruto como substrato para produção de H₂, sob condições mesofílicas e cultura mista, obtiveram como principal metabólito 1,3-propanodiol e ácido acético.

DE SÁ et al., (2013) também em reator batelada e cultura mista, obtiveram como principais metabólitos na produção de H₂ a partir de glicerol: 1,3-propanodiol, ácido acético e ácido butírico. Dentre os metabólitos houve predominância de 1,3-PD.

Tendo glicose como substrato em RALF para produção de H₂, com cultura mista, BARROS et al. (2012) verificaram a predominância de ácido acético, ácido butírico e etanol nos metabólitos formados.

KOSKINEN et al. (2008) sob condições termofílicas, tendo glicose como substrato, verificaram que a produção de H₂ foi favorecida tendo etanol como principal metabólitos.

Diante dos reatores contínuos e batelada tendo glicerol como substrato, pode-se dizer que os metabólitos encontrados do presente trabalho estão de acordo com o reportado pela literatura, assim como a predominância de 1,3-propanodiol seguida de etanol. Contudo, no presente trabalho foi utilizada cultura mista como inóculo, uma das principais divergências para os demais trabalhos com glicerol em reatores contínuos, já que todos eles utilizaram cultura pura. Assim sendo, no presente trabalho, diferentes rotas fermentativas podem ter ocorrido simultaneamente na fermentação do glicerol em função do TDH, o que pode justificar os maiores rendimentos de H₂ obtidos.

5.5. Produção de Hidrogênio

5.5.1. Quantidade de H₂ no Biogás

Em todas as etapas o biogás produzido foi composto de CO₂ e H₂. A ausência de metano no biogás pode ser atribuída ao tratamento térmico do lodo e ao controle do pH com valores abaixo de 5.

Na Tabela 5.7 e Figura 5.12, são expressos os valores médios, bem como seus respectivos desvios-padrão, e o comportamento do conteúdo de H₂ no biogás em função do TDH.

Tabela 5.7: Valores médios e desvios-padrão da porcentagem de H₂ no biogás em função do TDH para glicerol.

Fases	TDH	Quantidade de H ₂ no biogás (%)
I	14	62,7 ± 8,4
II	12	58,6 ± 3,2
III	10	50,6 ± 7,0
IV	8	57,8 ± 9,5
V	6	54,7 ± 7,2
VI	4	62,3 ± 5,3
VII	2	62,3 ± 5,3
VIII	1	70,8 ± 4,4

Em geral, houve estabilidade dos valores de conteúdo de H₂ em função dos dados do desvio.

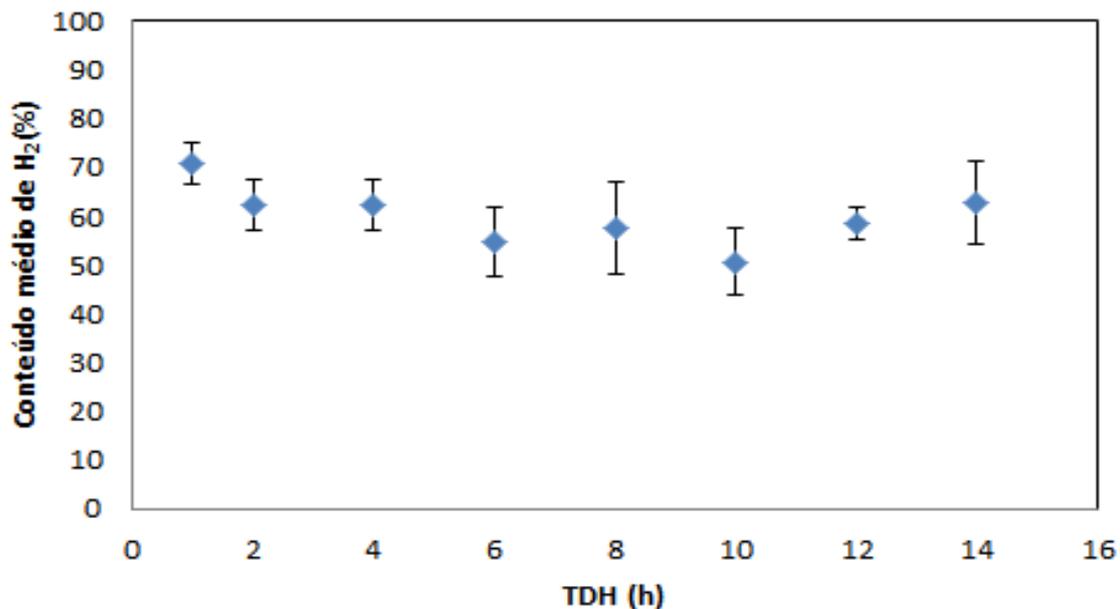


Figura 5.9: Comportamento da porcentagem de H₂ no biogás em função do TDH.

A porcentagem de H₂ no biogás em função do TDH manteve-se em média 60% em quase todas as fases de operação, tendo seu ponto de mínimo no TDH de 10h (50%) e seu ponto de máximo para TDH de 1h (70%) (Figura 5.9).

Tratando-se de reatores contínuos para produção de H₂, tendo glicerol como substrato, os mais recentes reportados na literatura foram LO et al., (2013) e REUNGSANG et al., (2013) utilizando reator CSTR e UASB, respectivamente. As porcentagens de H₂ no biogás obtidas nesses trabalhos foram de 73% e 24,2 % respectivamente. Sendo assim, os valores do presente trabalho estão coerentes com os obtidos na literatura. Entretanto nos trabalhos de LO et al., (2013), bem como de REUNGSANG et al., (2013) não houve variação no TDH, pois ambos trabalharam no TDH fixo de 12h e 24h, respectivamente. Além disso, ambos utilizaram cultura pura ao invés de cultura mista como no atual trabalho. Certas diferenças podem justificar a variação da porcentagem de H₂ no biogás, já que várias de rotas metabólicas podem ter ocorrido durante as fases de operação do reator.

GUO et al. (2008) avaliaram a produção de H₂ em reator EGSB (Reator de leito granular expandido) tendo melaço como fonte de carbono. O biogás foi composto apenas de H₂ e CO₂ sendo a porcentagem de H₂ entre 30 e 53%.

Em reatores RALF, tendo glicose como substrato para produção de H₂ (AMORIM et al., 2009; REIS e SILVA., 2010; BARROS et al., 2012) obtiveram diferentes porcentagens de H₂ no biogás que ficaram entre 8 e 35%, 40 e 67% e 12 e 53%, respectivamente

INTANOO et al., (2012) tendo águas residuárias de destilarias como fonte de carbono para produção de H₂, sob condições termofílicas, em reatores em batelada, obtiveram bons resultados em termos de conteúdo de H₂ no biogás, com 43%.

BARROS e SILVA (2012) sob condições mesofílicas em reator RALF tendo glicose como substrato obtiveram uma quantidade de H₂ no biogás entre 45 e 60%, sendo que as maiores porcentagens, assim como no presente trabalho, foram alcançadas para os menores TDH.

ROSA et al. (2014) utilizaram dois RALF para produção de H₂ a partir de glicose, junto ao aumento gradativo de soro de queijo para ambos os reatores. A diferença entre os dois reatores foi o tipo de lodo utilizado, sendo lodo de tratamento de águas residuárias de suínos e aves. Foi observado que no lodo de suíno o aumento de soro no substrato não afetou o conteúdo de H₂ no biogás que se manteve em torno de 18%. Contudo para o lodo de aves o aumento de soro no substrato favoreceu o aumento de H₂ no biogás, variando de 13,54% (com apenas 33% de soro) para 18,55% (com 100% de soro).

Verifica-se que neste trabalho os valores alcançados de porcentagem de H₂ estão coerentes tanto para trabalhos com glicerol, quanto com outros substratos e tipos de reatores. Os valores de porcentagens de H₂ obtidos foram semelhantes e, na maioria das fases, superiores. Sendo assim o glicerol, apesar de ser considerado uma água residuária complexa, torna cada vez mais real sua utilização como substrato para produção fermentativa de H₂ em condições termofílicas.

5.5.2. Rendimento de H₂ em função do substrato

Os valores médios de rendimento de H₂ em função do substrato, bem como seu comportamento para diferentes THD no reator, são apresentados na Tabela 5.8.

Tabela 5.8: Valores médios de rendimento de H₂ em função do TDH.

Fase	TDH	HY(mol H ₂ .mol glicerol ⁻¹)
I	14	1,2 ± 0,34
II	12	1,2 ± 0,18
III	10	1,4 ± 0,18
IV	8	1,4 ± 0,23
V	6	1,4 ± 0,12
VI	4	1,4 ± 0,13
VII	2	1,4 ± 0,30
VIII	1	3,0 ± 0,07

Nota-se que durante quase todas as fases de operação (TDH de 14h a 2h) o rendimento manteve-se, praticamente, constante (1,2 a 1,4 mol H₂.mol glicerol_{consumido}⁻¹). Entretanto na última fase de operação para o TDH de 1h esse rendimento chega a ser maior que o dobro das fases anteriores (3,0 mol H₂.mol glicerol_{consumido}⁻¹) (Figura 5.13).

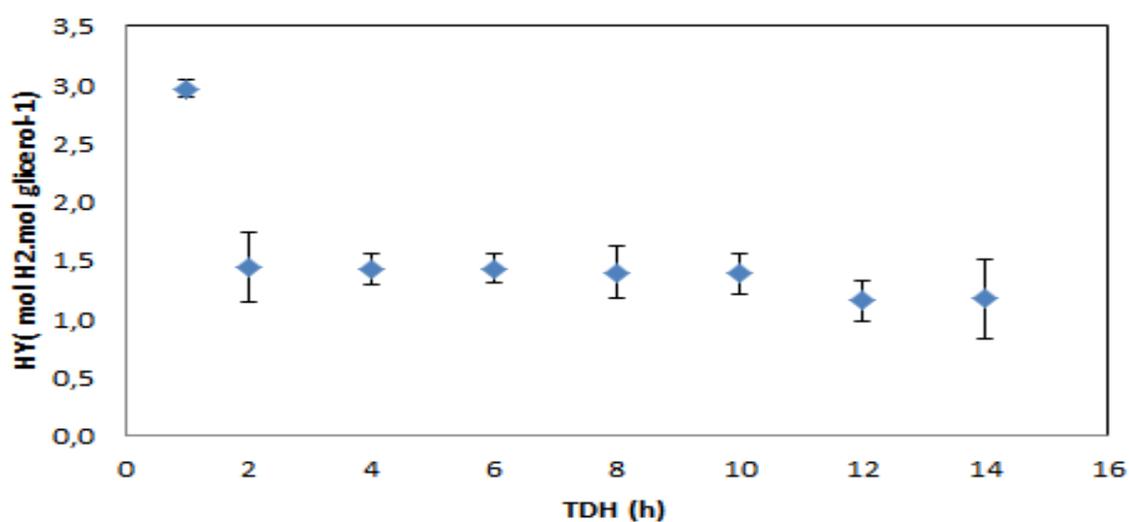


Figura 5. 10: Comportamento do rendimento de H₂ em função do TDH.

Nas primeiras sete fases houve predominância dos seguintes metabólitos: 1,3-PD, etanol, ácido butírico e ácido acético. As porcentagens foram: 34 a 50; 13 a 29; 4 a 20 e 4,5 a 18%, respectivamente. Entre o TDH de 8h e 2h ocorre uma diminuição da produção de etanol, que pode ter provocado a redução de hidrogênio, como mostra a equação: $C_3H_5(OH)_3 \rightarrow H_2 + CO_2 + C_2H_5(OH)$. Entretanto hidrogênio é produzido com a formação de ácido acético e butírico (equação 12 e 13, já citadas anteriormente no tópico 5.5 “Glicerol bruto como Substrato: Principais Metabólitos”, estes metabólitos tem uma elevação na concentração à medida que o TDH diminui de 8 à 2 horas, o que poderia explicar o rendimento constante de H_2 nas sete primeiras fases (Figura 5.10).

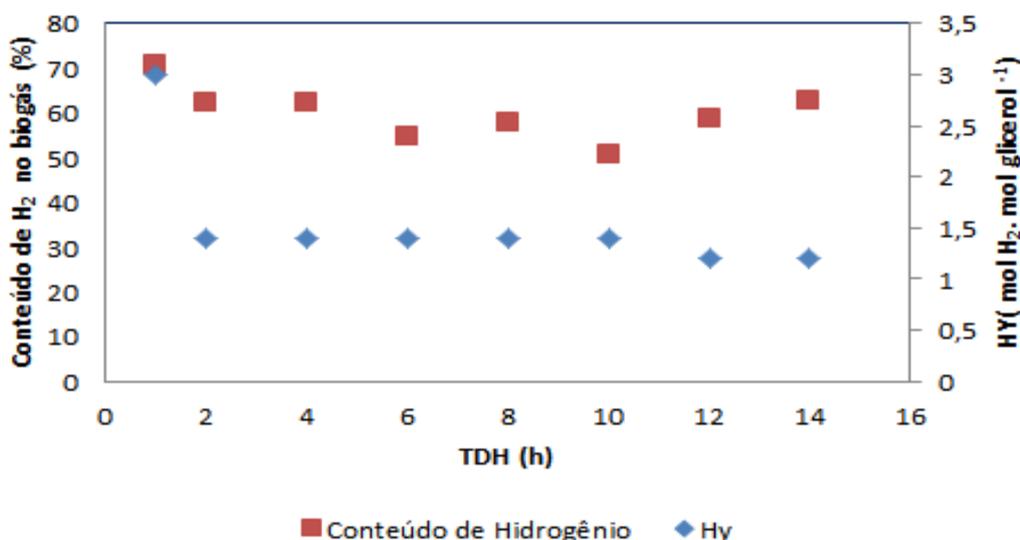


Figura 5.11: Rendimento de H_2 e porcentagem de Etanol, Ácido butírico e Ácido acético em função do TDH.

Já o rendimento de H_2 para TDH de 1h, atinge seu valor de máximo (3 mol H_2 · mol glicerol⁻¹) obtendo ácido propiônico como principal produto (56%) seguido de 1,3-PD (30%) e ácido acético (11%).

Dentre os reatores contínuos para produção de H_2 a partir glicerol, podemos citar LO et al., (2013) e REUNGSANG et al., (2013), que obtiveram um rendimento de 0,77 e 0,32 mol H_2 · mol glicerol consumido⁻¹ com reator CSTR e UASB, respectivamente. Ambos os trabalhos foram sob condições mesófilicas, cultura pura e com uma concentração de 10 g.L⁻¹ de substrato, já o TDH foi fixo de 10h e 24h. Os principais metabólitos obtidos foram: etanol, 1,3-propanodiol, ácido fórmico, ácido acético, ácido

lático, butanol e ácido butírico no LO et. al., (2013) quanto no de REUNGSANG et al., (2013), sendo que houve também produção de ácido propiônico no trabalho de REUNGSANG et al., (2013).

KIVISTO et al. (2013) em reator batelada utilizando glicerol como substrato, obtiveram rendimento de $3 \text{ mol H}_2.\text{mol glicerol}^{-1}$. Apenas ácido acético e 1,3-PD foram os metabólitos e cultura pura foi utilizada como inóculo.

NGO et al. (2011) utilizando glicerol como substrato para produção de H_2 , sob condições hipertermofílicas e com cultura mista obtiveram rendimento de H_2 próximo do teórico ($2,73 \text{ mol H}_2.\text{mol glicerol}^{-1}$).

Apesar a utilização de glicose como substrato (2 g.L^{-1}), temperatura mantida a 30°C e pH 3,8 no efluente, SHIDA et al. (2009), com RALF, verificaram que houve pequena variação no rendimento de H_2 ($1,84$ e $2,29 \text{ molH}_2.\text{mol glicose}^{-1}$) com a diminuição do TDH (8 a 1h).

AMORIM et al. (2009) também tendo glicose como substrato(2g.L^{-1}), operando reator RALF, temperatura de 30°C e TDH variado de 8 a 1 hora, notaram aumento do rendimento de hidrogênio, que foi crescente até o TDH de 2 horas, no TDH de 1 hora houve pequena queda. Os valores obtidos foram $1,41$, $2,49$ e $2,41 \text{ molH}_2.\text{mol. mol glicose}^{-1}$ para 8, 2 e 1 hora, respectivamente.

Vale lembrar que a faixa de rendimento de H_2 em função do substrato, tanto em reatores em bateladas quanto em reatores no modo contínuo, é bastante ampla ($0,25$ à $3 \text{ mol H}_2.\text{mol glicerol}^{-1}_{\text{consumido}}$) como mostrado na Tabela 3.8 da revisão bibliográfica. Além disso, os principais metabólitos encontrados na literatura para fermentação de glicerol, em geral, como reportado na Tabela 3.4, são: 1,3-PD, etanol, ácido acético, ácido butírico, ácido fórmico.

Assim sendo, os valores de rendimento obtidos nas sete primeiras etapas de operação, bem como na oitava etapa, estão de acordo com a faixa obtida na literatura para fermentação de glicerol. Os metabólitos encontrados também são coerentes com o que já se foi reportado.

O rendimento de H_2 no presente trabalho, por se tratar de uma cultura mista, possivelmente passou por uma fermentação mista, na qual diversas vias fermentativas para produção de H_2 podem ser consideradas.

Até o momento, o único trabalho reportado na literatura que chegaram a atingir o máximo teórico na produção de H_2 a partir de glicerol é o de KIVISTO et al., (2013), como já citado na revisão. Além disso, por se tratar de um resíduo complexo, este pode

conter outras substâncias as quais podem ter contribuído para produção de H₂ e metabólitos.

Outra hipótese seria uma rota fermentativa na qual o consumo de etanol favorecesse a formação de H₂, bem como a de ácido propiônico.

Uma análise biomolecular da última fase do reator seria necessária para esclarecer certos resultados.

5.5.3. Produção Volumétrica de Hidrogênio

São expressos os valores médios de produção volumétrica de H₂ bem como o comportamento dessa produção em função do TDH para glicerol bruto (Tabela 5.9 e Figura 5.15).

Tabela 5.9: Valores médios de produtividade volumétrica em função do TDH para glicerol bruto.

Fases	TDH	PVH (mL.h ⁻¹ .L ⁻¹)
I	14	102,5 ± 22,3
II	12	125,8 ± 59,7
III	10	225,3 ± 31,0
IV	8	158,6 ± 31,0
V	6	236,7 ± 40,8
VI	4	399,1 ± 59,7
VII	2	667,3 ± 40,8
VIII	1	1508,7 ± 72,1

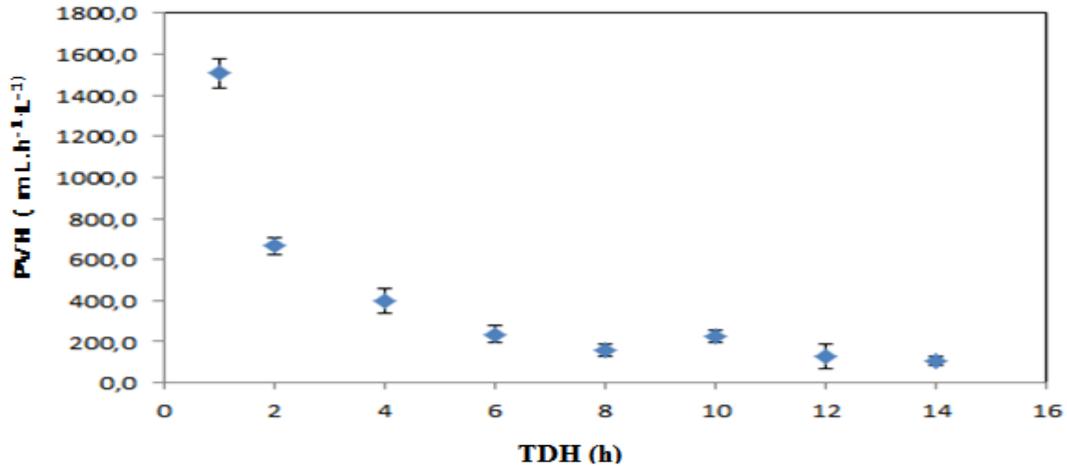


Figura 5. 12: Comportamento da Produção volumétrica de H₂ em função do TDH para glicerol bruto.

Nota-se (Tabela 5.9 e Figura 5.12), que há um aumento da produção volumétrica de H₂ (PVH) com a diminuição do TDH, sendo que a PVH máxima encontra-se para o TDH de 1h com $1508,7 \pm 72,1 \text{ mL.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$ ($61,1 \text{ mmol.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$).

Tratando-se de glicerol bruto como substrato para produção de H₂, na literatura LO et al., 2013 com reator CSTR em TDH de 12h obtiveram produtividade volumétrica de $7 \text{ mmol.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$ com glicerol bruto, valor próximo do obtido no presente trabalho para o mesmo TDH de 12h, que foi de $5,2 \text{ mmol.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$.

ITO et al., (2005) obtiveram $63 \text{ mmol.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$ no TDH de 12h com glicerol bruto, sendo esse valor bem próximo ao obtido no presente trabalho, que foi de $61,1 \text{ mmol.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$, ocorrido durante a melhor fase de operação (TDH de 1h), com glicerol bruto.

Por fim, entre os reatores contínuos reportados, REUNGSANG et. al., 2013, obtiveram uma produção volumétrica de $9 \text{ mmol.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$ em reator UASB no TDH de 24h para glicerol bruto.

O aumento da produção volumétrica de hidrogênio com a redução do TDH também foi observada nas pesquisas de Wu et al. (2003), Lin et al. (2006), Wu et al. (2006), Amorim et al. (2009), todos em reatores anaeróbios de leito fluidizado, entretanto utilizando glicose como substrato na maioria dos trabalhos.

SHIDA et al. (2008) tendo glicose como substrato (2g.L^{-1}) em RALF, também notaram o aumento da produção volumétrica de H₂ a medida que o TDH diminuía. A

maior produtividade foi também para o TDH de 1 hora com $1,15 \text{ L.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$. Tal comportamento foi semelhante ao de SHIDA et al. (2009) operando RALF com de glicose variando TDH 8 á 1 hora, esse comportamento foi justificado devido ao fato de que, com a diminuição do TDH ocorreu um aumento da taxa de carregamento orgânico.

GUO et al. (2008) no estudo de um reator EGSB tendo amido como substrato ($1 \text{ g amido.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), verificaram o aumento da produção volumétrica de hidrogênio a medida que o TDH diminuía, o obtido no estudo foi de aproximadamente $0,068 \text{ L.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$ de H_2 .

AMORIM et al. (2009) com reator RALF e uma concentração de 2 g.L^{-1} de glicose notaram que, a medida que o TDH diminuía a produtividade volumétrica de hidrogênio aumentava, sendo este aumento de $0,08 \text{ L.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$ no TDH de 8 horas para $0,97 \text{ L.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$ no TDH de 1 horas. Os autores atribuíram este aumento ao fato de que há mudança no metabolismo dos microrganismos a medida que o TDH diminui e que a uma maior quantidade de glicose foi utilizada para produção de metabólitos que deve ter contribuído para uma maior produção de H_2 .

BARROS et al. (2010) tendo dois reatores RALF, com glicose como substrato (4 g.L^{-1}), sendo argila expandida e poliestireno como material suporte, respectivamente, verificaram que com a diminuição do TDH, que variou de 8 à 1 hora, ocorria o aumento da produtividade de H_2 . Os valores máximos para o reator com argila expandida e poliestireno foram de $1,21$ e $0,95 \text{ L.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$ para o TDH de 1 hora, respectivamente. A conclusão dos autores foi que a produção volumétrica de hidrogênio é influenciada pelo TDH e pela concentração de substrato.

BARROS et al. (2012) também trabalharam com dois reatores RALF diferenciados pelo material suporte, porém ambos com 4 g.L^{-1} de glicose e variaram o TDH de 8 à 1 hora. Um dos reatores possuía polietireno (reator 1) e outro PET (reator 2) como meio suporte. Em ambos os reatores foi observado que a medida que o TDH diminuía ocorria o aumento na produção volumétrica de H_2 , que foi máxima para os dois reatores no TDH de 1 hora, sendo $0,52$ e $0,30 \text{ L.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$ para os reatores 1 e 2, respectivamente.

Apesar da maioria dos trabalhos com glicerol bruto serem realizados em bateladas, o número de reatores contínuos, vem aumentando. Segue abaixo (Tabela 5.10), para fins comparativos, principais trabalhos em reatores contínuos, incluindo o trabalho atual.

Tabela 5.10: Comparação entre o trabalho atual e os reportados na literatura para a produtividade volumétrica de H₂ a partir de glicerol bruto em reatores contínuos com diferentes tipos de inóculos e TDH.

Tipo de Reator	Fonte de Glicerol	Inóculo	Produção volumétrica de H ₂ (mmol.h ⁻¹ .L ⁻¹)	TDH (h)	Referências
Contínuo de leito fixo	glicerol bruto	<i>Enterobacter aerogenes</i> HU-104	63	12	ITO et al., (2005)
RALF	Glicerol bruto	Cultura Mista	61,1	1	Trabalho Atual
CSTR	glicerol bruto	<i>Clostridium pasteurianum</i> CH4	7	10	LO et al., (2013)
UASB	glicerol bruto	<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	9	24	REUNGSANG et al., (2013)
RALF	glicerol bruto	Cultura Mista	9,2	10	Trabalho Atual
RALF	glicerol bruto	Cultura Mista	5,2	12	Trabalho Atual

Houve certa coerência na produção volumétrica de H₂ para reator anaeróbio de leito fluidizado (RALF), em relação aos demais reatores contínuos, pois se deve levar em conta o fato dos reatores serem diferentes entre si bem como o tipo de inóculo e TDH.

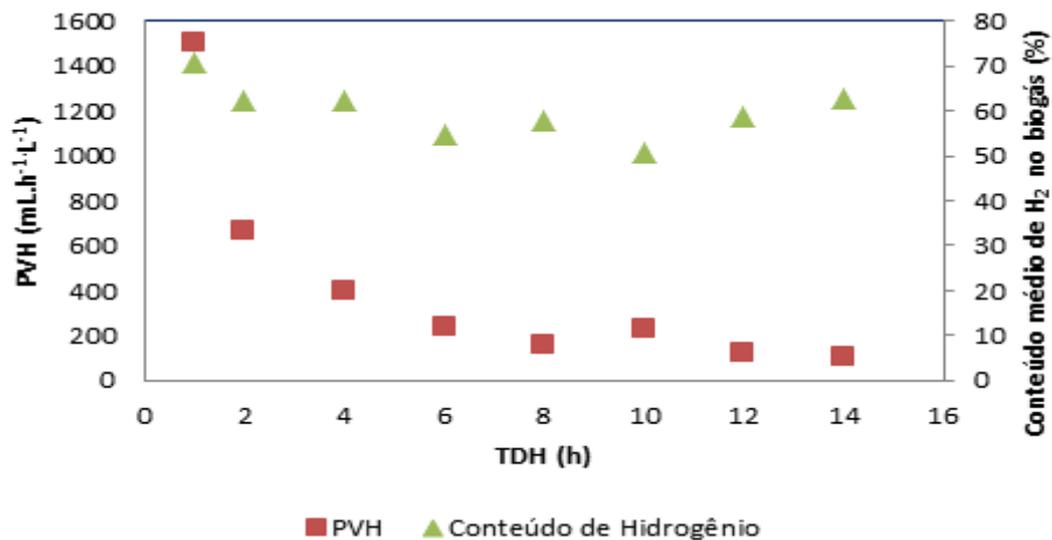


Figura 5. 13: Conteúdo de H₂ no biogás e PVH em função do TDH aplicado.

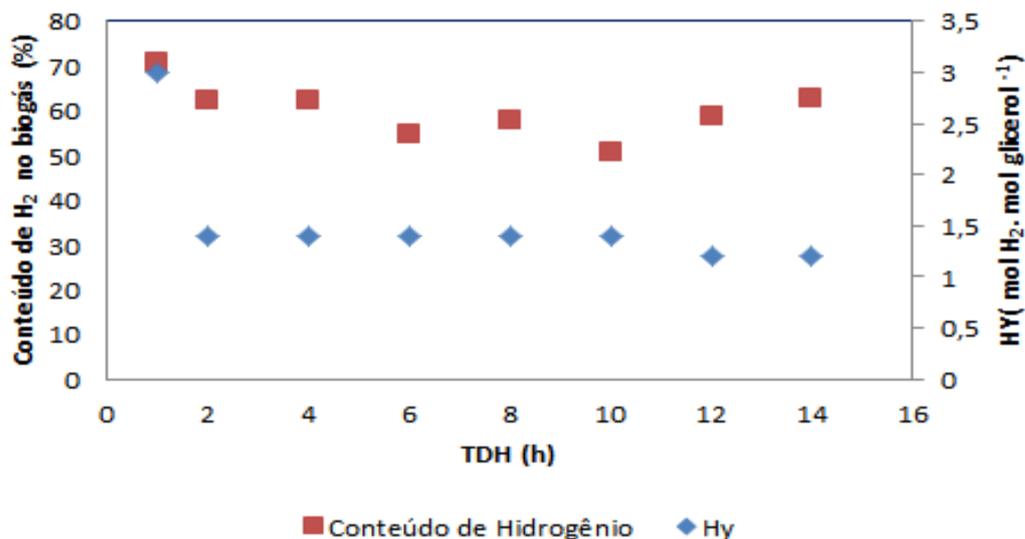


Figura 5.14: Conteúdo de H₂ no biogás e HY em função do TDH aplicado.

Tanto a produtividade volumétrica de H₂ quanto o rendimento não variaram entre o TDH de 14 a 2h, porém atingiram seus máximos para o TDH de 1h. No TDH de 1h observa-se que o conteúdo de H₂ no biogás, também atinge o maior valor (Figuras 5.13 e 5.14).

5.6. Rendimento dos principais Metabólitos produzidos

Além do rendimento de H_2 também foi expresso o rendimento dos principais subprodutos formados durante a fermentação do glicerol: 1,3-propanodiol, Etanol e ácido propiônico. Nota-se que houve um decréscimo no rendimento de etanol com a diminuição do TDH, já para o 1,3-propanodiol ocorreu o contrário. Fica evidente que o rendimento de H_2 bem como o rendimento de 1,3-propanodiol é máximo para o TDH de 1h e que nesse TDH não houve formação de Etanol. O ácido propiônico, a partir do TDH de 2h começou a ser produzido de forma significativa, sendo que para o TDH de 1h seu rendimento foi maior que o de 1,3-propanodiol (Figura 5.15).

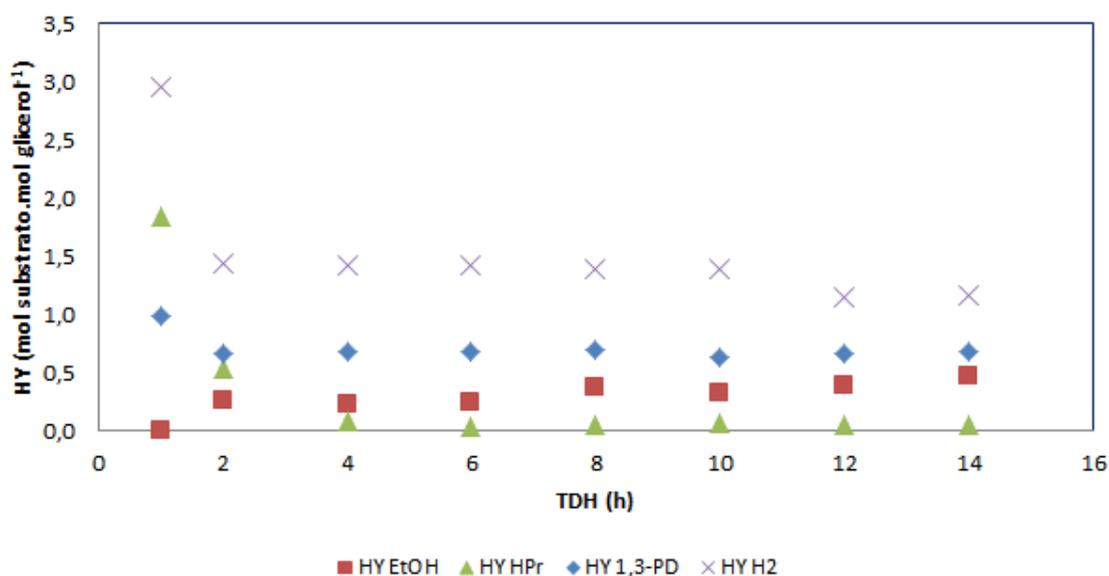


Figura 5. 15: Rendimento dos principais metabólitos formados e de H_2 durante a fermentação de glicerol para produção de H_2 .

Como já comentado na revisão bibliográfica desse trabalho, o rendimento máximo teórico para etanol e 1,3-propanodiol é de 1 mol. Já para o H_2 , o máximo teórico pode chegar a 3 moles via acetato (Equação 2, 3 e 8 respectivamente).

KIVISTO et al., (2013) em reator batelada e cultura mista obtiveram rendimento de 3 mol H_2 .mol.glicerol⁻¹ junto a 0,66 mol 1,3-PD.mol glicerol⁻¹.

No presente trabalho para TDH de 1h o rendimento de hidrogênio e 1,3-PD foram máximos e nos valores de 3 mol H₂.mol glicerol⁻¹ e 0,98 mol 1,3-PD.mol glicerol⁻¹, respectivamente. Já para produção simultânea de etanol e H₂ obteve-se maior rendimento de Etanol quando houve menor rendimento de H₂ no TDH de 14h, 0,47 mol EtOH. mol glicerol⁻¹ e 1,2 mol H₂.mol glicerol⁻¹, respectivamente. ITO et al., (2005) com reator contínuo obtiveram rendimento de 0,85 mol EtOH.mol glicerol⁻¹ seguido de 0,16 mol 1,3-PD.mol glicerol⁻¹, porém o rendimento de H₂ não foi expresso.

5.7. Balanço de Carbono

O balanço de carbono foi estimado em função do cálculo teórico da DQO com base nas relações estequiométricas para oxidação de glicerol, ácido acético, ácido butírico, ácido propiônico, etanol, 1,3-propanodiol entre outros. A Tabela 5.4 apresenta os valores de DQO teórica (DQO_t) para glicerol remanescente, metabólitos solúveis e sólidos suspensos voláteis (SSV), bem como a diferença entre a DQO teórica e DQO medida (DQO_m) no reator. O balanço de carbono demonstrou que houve uma diferença positiva (64 à 1631 mg.L⁻¹), e bastante significativa, entre a soma da DQO_t e DQO_m (Dif).

Assim sendo podemos supor que supostamente existem metabólitos, os quais não foram quantificados, e que poderiam ser levados em consideração.

Tabela 5.5: Balanço de Carbono em função da DQO_t e DQO_m.

TDH (h)	mg.L ⁻¹												DQO _t total SMP	DQO medida	(DQO _t – DQO _m)	Dif %		
	Hac DQO _t	Hbu DQO _t	HPr DQO _t	EtOH DQO _t	HSc DQO _t	Hla DQO _t	Hfo DQO _t	Hibu DQO _t	HiVa DQO _t	Hva DQO _t	Hibu DQO _t	1,3- PD DQO _t					Glicerol efluente DQO _t	SSV DQO _t
14	85	170	77	377	30	73	17	60	0	35	24	1094	3015,73	248	5306	5959,72	654	11,0
12	103	259	91	476	41	63	88	65	45	53	32	1324	2418,33	237	5293	6523,35	1230	18,9
10	187	552	189	488	48	97	76	68	33	46	35	1569	2258,77	200	5847	6872,75	1026	14,9
8	68	162	78	407	42	90	73	44	0	0	34	1266	2596,08	276	5137	6568,79	1432	21,8
6	120	626	43	198	0	0	0	0	0	0	112	884	3036,51	531	5550	7180,96	1631	22,7
4	253	546	116	220	0	0	0	91	60	26	64	974	2688,56	616	5656	6148,69	493	8,0
2	166	453	778	58	0	39	0	0	35	70	16	923	2681,64	836	6056	7416,72	1361	18,3
1	160	0	1376	0	0	39	0	0	0	49	0	694	3985,47	1157	7461	7524,98	64	0,9

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos e da discussão apresentada para os experimentos realizados em reator anaeróbio termofílico de leite fluidizado para produção de hidrogênio, tendo glicerol bruto como substrato na fermentação, concluiu-se que:

- Não houve a presença de metano durante todas as fases de operação do reator, ou seja, o tratamento térmico do lodo foi eficaz para eliminar arqueias metanogênicas.
- O TDH de 1h foi o mais eficaz, no qual foram obtidos os valores máximos de produção volumétrica, rendimento e porcentagem de H₂ no biogás: 61 mmol.h⁻¹.L⁻¹, 3 mol.H₂.mol glicerol⁻¹ e 70%, respectivamente.
- Os principais metabólitos formados foram: 1,3-propanodiol, etanol, ácido acético para TDH de 14h a 2h, quando também notou-se rendimento estável de H₂ (1,2 a 1,4 mol.H₂.mol glicerol⁻¹). Já para o TDH de 1h ácido propiônico, em elevada porcentagem (56%), ácido acético(11%) e 1,3 propanodiol(30%) foram os principais metabólitos. A presença de 1,3-propanodiol evidencia uma rota alternativa de H₂ concomitante ao de 1,3-propanodiol em todas as fases de operação. Altas concentrações de ácido butírico e ácido acético também podem justificar a estabilidade no rendimento de H₂ nas sete primeiras fases de operação do reator.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKUTSU, Y. et al. Hydrogen production potentials and fermentative characteristics of various substrates with different heat-pretreated natural microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 34, n. 13, p. 5365-5372, 2009.

AMORIM, E. L. C. de; 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.

ANDRADE, J. C.; VASCONCELOS, I.; *Biotechnol. Lett.* 2003, 25,121.

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

ABBAD-ANDALOUSSI S, MANGINOT-DURR C.L, AMINE J, PETITDEMANGE E, H. Isolation and characterization of *Clostridium butyricum* DSM 5431 mutants with increased resistance to 1,3-PD and altered production of acids. *Appl Environ Microbiol* 1995;61:4413-7.

AGNIESZK D, KATARZYNA L, KATARZYNA C. Biotechnological production of 1,3-propanediol from crude glycerol. *BioTechnologia*. 2011;92:92-100.

BANOS, R.; MANZANO-AGUGLIARO, F.; MONTOYA, F.G.; GIL, C.; ALCAYDE, A.; GÓMEZ, J. Optimization methods applied to renewable and sustainable energy: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 15, p. 1753-1766, 2011.

BARNWAL B. K.; SHARMA M. P. Prospects of biodiesel production from vegetable oils in India. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 9, P. 363-78, 2005.

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

BONDIOLI P.; DELLA BELLA L. (2005) An alternative spectrophotometric method for the determination of free glycerol in biodiesel. *Eur J Lipid Sci Technol*;107:153e7.

BORIES, A.; RAYNAL, J.BAZILE, F. Anaerobic digestion of high-strength distillery wastewater (cane molasses stillage) in a fixed-film reactor. *Biological Wastes*, v.23, p. 251-267, 1988.

BARROS, A. R.; AMORIM, E. L. C. de; REIS, C. M.; SHIDA, G. M.; SILVA, E. L. Biohydrogen production in anaerobic fluidized bed reactors: Effect of support material

and hydraulic retention time. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 35, p. 3379-3388, 2010.

BARROS, A. R.; ADORNO, M.A.T; SAKAMOTO, I. K.; MAINTINGUER, S. I.; VARESCHE, M. B. A.; SILVA, E. L. Performance evaluation and phylogenetic characterization of anaerobic fluidized bed reactors using ground tire and pet as support materials for biohydrogen production. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 3840-3847, 2011.

BARROS, A. R.; SILVA, E. L. Hydrogen and ethanol production in anaerobic fluidized bed reactors: Performance evaluation for three support materials under different operating conditions. *Biochemical Engineering Journal*, v. 61, p. 59-65, 2012.

BIEBL, H.; SPROER, C. Taxonomy of the glycerol fermenting clostridia and description of *Clostridium diolis* sp nov. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 25, n. 4, p. 491-497, 2002.

BIEBL H.; MARTEN S.; HIPPE H.; DECKWER W. D.; Glycerol conversion to 1,3-propanediol by newly isolated clostridia. *Appl Microbiol Biotechnol*, v.36, p.592-7,1992.

BIEBL H.; ZENG A. P.; MENZEL K.; DECKWER W. D. Fermentation of glycerol to 1,3 propanediol and 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, v.50, p. 44-9, 1998.

Bio Mat Net Item: FAIR-CT-96-1912. Biodegradable polyester from 1,3-propanediol and succinate produced by fermentation of regrowing resources. 1996.

CHANG, F.; LIN, C. Biohydrogen production using an up-flow anaerobic sludge blanket reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 29, p. 33-39, 2004.

CHANG, J.S.; LEE, K.S.; LIN, P.J. Biohydrogen Production with Fixed-Bed Bioreactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 27, p. 1167 – 1174, 2002.

CARLOS, R. M.; KHANG, D. B. Characterization of biomass energy projects in Southeast Asia. *Biomass & Bioenergy*, v. 32, n. 6, p. 525-532, 2008.

CAVALHEIRO, J. M. B. T. et al. Effect of cultivation parameters on the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-4-hydroxybutyrate-3-hydroxyvalerate) by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. *Bioresource Technology*, v. 111, p. 391-397, 2012.

CHANG, F.; LIN, C. Biohydrogen production using an up-flow anaerobic sludge blanket reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 29, p. 33-39, 2004.

CHANG, J.S.; LEE, K.S.; LIN, P.J. Biohydrogen Production with Fixed-Bed Bioreactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 27, p. 1167 – 1174, 2002.

CHEN, C.C.; LIN, C.Y. Using sucrose as a substrate in an anaerobic hydrogen-producing reactor. *Adv. Environ. Res.*, v.7 (3), p. 695–699, 2003.

CHEN, P.; SHAKHNOVICH, E.I. Thermal Adaptation of Viruses and Bacteria. *Biophysical Journal*, v. 98, p. 1109-1118, 2010.

CHERNICHARO, C.A.L. *Reatores anaeróbios: Princípios do tratamento biológico de águas residuárias*. Belo Horizonte. DESA- UFMG. 246 p., 1997.

CHEN, C.C.; LIN, C.Y. Using sucrose as a substrate in an anaerobic hydrogen-producing reactor. *Adv. Environ. Res.*, v.7 (3), p. 695–699, 2003.

Commission of European Communities, sixth Framework Programme, priority 6 Sustainable Energy Systems Integrated Project 019825. Acronym: HYVOLUTION, Nonthermal production of pure hydrogen from biomass. [http:// www.biohydrogen.nl/hyvolution/31231/7/0/20](http://www.biohydrogen.nl/hyvolution/31231/7/0/20); 2009 [accessed 3.08.10]

CHENG C.L, LO Y.C, LEE K.S, LEE D.J, LIN C.Y, CHANG J.S. Biohydrogen production from lignocellulosic feedstock. *Bioresour Technol* 2011;102(18):8514e23.

CHONG, M.-L. et al. Biohydrogen production from biomass and industrial wastes by dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 34, n. 8, p. 3277-3287, 2009.

DA SILVA GP, MACK M, CONTIERO J. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnol Adv.* 2009;27:30–39.

DILLIS, S. S.; APPERSON, A.; SCHMIDT, M. R.; SAIER, M.H.; *Microbiol. Rev* 1980, 44,385.

DEL NERY, V. Utilização de Lodo Anaeróbio Imobilizado em Gel no Estudo de Partida de Reatores de Fluxo Ascendente com Manta de Lodo. 1987. Dissertação - Escola de Engenharia de São Carlos, Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1987.

DECKEWER W.D. Microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol. *FEMS Microbiol.* 1995;16:143–9.

DILLALO, R; ALBERTSON,O.E. (1961). Volatile acids by direct titration. *Jornal Water Pollution Control Federation*, 33:356-365.

DOVI, V.G.; FRIEDLER, F.; HUISINGH, D.; KLEMES, J.J. Cleaner energy for sustainable future. *Journal of Cleaner Production*, v. 17, p. 889-895, 2009.

FERNANDES B. S.; PEIXOTO G.; ALBRRECHT F. U.; DEL AGUILA N. K. S.; ZAIAT M. Potential to produce biohydrogen from various wastewaters. *Energy for Sustainable Development. Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 14, p.143-148, 2010.

FONSECA AMARAL, P. F. et al. Glycerol valorization: New biotechnological routes. *Food and Bioproducts Processing*, v. 87, n. C3, p. 179-186, 2009.

GADOW, S.I.; LI, Y.; LIU, Y. Effect of temperature on continuous hydrogen production of cellulose. *International journal of Hydrogen Energy*, v. 37, p. 15465-15474, 2012.

GONZÁLEZ-PAJUELO, M.; ANDRADE, J. C.; VASCONCELOS I.; J. Ind. Microbiol. Biot. 2004, 31,442.

ITO T.; NAKASHIMADA Y.; SENBA K.; MATSUI T.; NISHIO N. Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing waste discharged after biodiesel manufacturing process. *J Biosci Bioeng*, v.100, p. 260-5, 2005.

INTANOO, P.; RANGSUNVIGIT, P.; NAMPROHM, W.; THAMPRAJAMCHIT, B.; CHAVADEJ, J.; CHAVADEJ, S. Hydrogen production from alcohol wastewater by an anaerobic sequencing batch reactor under thermophilic operation: Nitrogen and phosphorous uptakes and transformation. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.37, p.11104-11112, 2012.

JITRWUNG, R.; YARGEAU, V. Optimization of media composition for the production of biohydrogen from waste glycerol. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 36, n. 16, p. 9602-9611, 2011.

JARVIS, G. N. et al. Isolation and characterisation of obligately anaerobic, lipolytic bacteria from the rumen of red deer. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 21, n. 1, p. 135-143, 1998.

JITRWUNG R.; YARGEAU V. Optimization of media composition for the production of biohydrogen from waste glycerol. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.36, p. 9602-611, 2011.

JUANITA M, GUANGYI W. Metabolic pathway engineering for enhanced biohydrogen production. *Int J Hydrogen Energy*. 2009;34:7404–7416.

JUNGINGER, M.;SIKKEMA, R.; FAAIJ, A.; International bioenergy trade in the Netherlands. *Biomass and Bioenergy*, v. 32, p. 672-687, 2008.

KANAI, T.; IMANAKA, H.; NAKAJIMA, A.; UWAMORI, K.; OMORI, Y.; FUKUI, T.; ATOMI, H.; IMANAKA, T. Continuous hydrogen production by the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. *Journal of Biotechnology*, v. 116, p. 271-282, 2005.

KOUTROULI, E. C.; KALFAS, H.;GAVALA, H. N.; SKIADAS, I. V.; STA,ATELATOU, K.; LYBERATOS, G. Hydrogen and methane production through two-stage mesophilic anaerobic digestion of olive pulp. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 3718-3723, 2009.

KIM, D.; KIM, M. Thermophilic fermentative hydrogen production from various carbon sources by anaerobic mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 37, p. 2021-2027, 2012.

KIM, S.; HAN, S.; SHIN, H. Effect of Substrate Concentration on Hydrogen Production and 16s Rdna-Based Analysis of the Microbial Community in a Continuous Fermenter. *Process Biochemistry*, v. 41, p. 199–207, 2006.

KOSKINEN, P.E.P.; LAY, C.; PUHAKKA, J.; LIN, P.; WU, S.; ORLYGSSON, J.; LIN, C. High-efficiency hydrogen production by an anaerobic, thermophilic enrichment culture from an Icelandic hot spring. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 101, p. 665-678, 2008.

KONGJAN, P.; MIN, B.; ANGELIDAKI, I. Biohydrogen production from xylose at extreme thermophilic temperatures (70 degrees C) by mixed culture fermentation. *Water Research*, v. 43, n. 5, p. 1414-1424, 2009.

KOTAY, M. S.; DAS, D. Biohydrogen as a renewable energy resource-Prospects and potentials. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.33,p. 258-263, 2008.

KUMAR, A.; KUMAR, K.; KAUSHIK, N.; SHARMA, S.; MISHRA, S. Renewable energy in India: Current status and future potentials. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v.14, p. 2434-2442, 2010.

LAGES, F.; LUCAS, C.; *Biochem. Biophys. Acta*, 1997, 8, 1322.

LAGO, A.C. do; BONOMI, A.; CAVALETt, O.; CUNHA, M.P. da; LIMA, M.A.P. Sugarcane as a carbon source: The Brazilian case. *Biomass and Bioenergy*, v. 46, p. 5-12, 2012.

LAY, K.; LEE, Y.; MOIKE, T.; *Water Res.* 1999, 33, 2579.

LI, C. L.; FANG, H. H. P. Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. *Crit. Review. Environmental. Science Technology*, v. 37, p. 1–39, 2007.

LOGAN BE, OH SE, KIM IS, VAN GINKEL S. Biological hydrogen production measured in batch anaerobic respirometers. *Environ Sci Technol* 2002;36(11):2530e5.

LIU F, FANG B.S. Optimization of bio-hydrogen production from biodiesel wastes by *Klebsiella pneumoniae*. *J Biotechnol* 2007;2:274e80.

LUO, G.; XIE, L.; ZOU, Z.; WANG, W.; ZHOU, Q.; SHIM, H. Anaerobic treatment of cassava stillage for hydrogen and methane production in continuously stirred tank reactor (CSTR) under high organic loading rate (OLR). *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 35, p. 11733-11737, 2010.

LEE, Y.J.; MIJAHARA, Y.; NOIKE, T. Effect of iron concentration on hydrogen fermentation. *Bioresource Technology*, v. 80, p. 227-231, 2001.

LEONETI, B. A.; LEONETI A. V.; OLIVERIA W. V. S. Glycerol as a by-product of biodiesel production in Brazil: Alternatives for the use. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 45, p.138-145, 2012.

LEVIN D. B.; CHAHINE R. Challenges for renewable hydrogen production from biomass. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.35, p. 4962-9, 2010.

LEE K.S, LIN P.J, CHANG J.S. Temperature effect on hydrogen fermentation in a granular sludge bed induced by activated carbon carrier. *Int J Hydrogen Energy* 2006;31(4):465e72.

LEVIN, D. B. et al. Hydrogen production by *Clostridium thermocellum* 27405 from cellulosic biomass substrates. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 31, n. 11, p. 1496-1503, 2006.

LO, Y-C. et al. Dark fermentative hydrogen production with crude glycerol from biodiesel industry using indigenous hydrogen-producing bacteria. *international journal of hydrogen energy*, 2013.

LO Y.C, SU Y.C, CHENG C.L, CHANG J.S. Biohydrogen production from pure and natural lignocellulosic feedstock with chemical pretreatment and bacterial hydrolysis. *Int J Hydrogen Energy* 2011;36(21):13955e63.

MATSUMOTO, M.; NISHIMURA, Y. Hydrogen Production by Fermentation Using Acetic Acid and Lactic Acid. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 103, p. 236-241, 2007.

MARKOV S.A, AVERITT J, WALDRON B. Bioreactor for glycerol conversion into H₂ by bacterium *Enterobacter aerogenes*. *Int J Hydrogen Energy* 2010;36:262e6.

MOTA, C. J. A.; SILVA, C. X. A.; GONÇALVES, V. L. C.; *Quim. Nova* 2009, 32, 639.

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

MORAES, E. M.; ADORNO, M. A.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. Determinação de Ácidos Orgânicos Voláteis por Cromatografia em Efluentes de Reatores Anaeróbios Tratando Resíduos Líquidos e Sólidos. *Anais, Vol II da Oficina e Seminário Latino Americano sobre Digestão Anaeróbia*, Recife – 05 a 09 de Novembro: p. 146-149, 2000.

NANDI R, SENGUPTA S. Microbial production of hydrogen: an overview. *Crit Rev Microbiol* 1998;24(1):61e84

NITAYAVARDHANA, S.; KHANAL, S. K. Biodiesel-derived crude glycerol bioconversion to animal feed: A sustainable option for a biodiesel refinery. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 10, p. 5808-5814, 2011

NGO T. A.; KIM M. S.; SIM S. J. High-yield biohydrogen production from biodiesel, manufacturing waste by *Thermotoga neapolitana*. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 36, p. 58336-42, 2011.

OOI, T. L.; YOMG, K. C.; HAZIMAH, A. H.; DZULKFLY, K.; WAN-yUNUS, M. Z.; J. Oleo Sxi. 2004, 53,29.

O-THONG, S.; PRASERTSAN, P.; BIRKELANDD, N. Evaluation of methods for preparing hydrogen-producing seed inocula under thermophilic condition by process performance and microbial community analysis. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 909–918, 2009.

OBAZU, F.O.; NGOMA, L.; GRAY, V.M.; Interrelationships between bioreactor volume, effluent recycle rate, temperature, pH, %H₂, hydrogen productivity and hydrogen yield with undefined bacterial cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.37, p.5579-5590, 2012.

OH B.R, SEO J.W, HEO S.Y, HONG W.K, LUO L.H, JOE M.H, et al. Efficient production of ethanol from crude glycerol by a *Klebsiella pneumoniae* mutant strain. *Bioresour Technol* 2011;102:3918e22.

PEINTNER, C. ; ZEIDAN, A.A. ; SCHMITZHOFER, W. Bioreactor systems for thermophilic fermentative hydrogen production: evaluation and comparison of appropriate systems. *Journal of Cleaner Production*, v. 18, p.S15-S22, 2010.

PETITDEMANGE, E. et al. EFFECT OF CARBON-SOURCES ON CELLULASE PRODUCTION BY *CLOSTRIDIUM-CELLULOLYTICUM*. *Biomass & Bioenergy*, v. 3, n. 6, p. 393-402, 1992.

PACHAURI N.; HE B. Value-added utilization of crude glycerol from biodiesel production: a survey of current research activities. In *Proceedings of the ASABE Annual International Meeting* 2006.

PAPANIKOLAOU, S.; MUNIGLIA, L.; CHEVALOT, I.; AGGELIS, G.; Marc, I.; J. *Appl. Microbiol.* 2002, 92, 737.

PEREIRA, G. M.; CAMACHO, F. C.; FREITAS, V. A. M. The renewable energy market in Brazil: Current status and potential. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 16, p.3786-3802, 2012.

PEINTNER, C. ; ZEINDAN, A.A. ; SCHNITZHOFER, W. Bioreactor systems for thermophilic fermentative hydrogen production: evaluation and comparison of appropriate systems. *Journal of Cleaner Production*, v. 18, p.S15-S22, 2010.

PETITDEMANGE G.; DURR C.; ABBAD A. S.; RAVAL G. Fermentation of raw glycerol to 1,3-propanediol by new strains of *Clostridium butyricum*. *International Journal of Hydrogen Energy*,v.15,p. 498-502, 1995.

REIS, C. M. dos.; 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, p. 6970-6979, 2013.

RIPLEY, L.E.; BOYLE, W.C.; CONVERSE, J.C. Improved Alkalimetric Monitoring for Anaerobic Digestion of High-Strength Wastes. *Journal of Water Pollution Control Federation*, v. 58, p. 406-411, 1986.

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. 6473-90, 2012.

SCARLAT, N.; DALLEMAND, J. Recent developments of biofuels/bioenergy sustainability certification: A global overview. *Energy Policy*, v. 39, p. 1630-1646, 2011.

SHIDA, G.M. *Produção de Hidrogênio e Ácidos Orgânicos por Fermentação Acidogênica em Reator Anaeróbico de Leito Fluidificado*. 2008. Dissertação de Mestrado, EESC/USP, São Carlos – SP, 2008.

SARATALE G.D, CHEN S.D, LO Y.C, SARATALE R.G, CHANG J.S. Outlook of biohydrogen production from lignocellulosic feedstock using dark fermentation e a review. *J Sci Ind Res* 2008;67:962e79.

SILVA G. P. D.; MACK M.; CONTINEIRO J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnol Adv* 2009;27:30e9.

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.

SRIKANTH, S.; MOHAN, V.; BABY, L.; SARMA, P.N. Metabolic shift and electron discharge pattern of anaerobic consortia as a function of pretreatment method applied during fermentative hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 35, p.10693-10700, 2012.

SRIRANGAN, K., AKAWI, L.; MOON-YOUNG, M.; CHOU, C.P. Towards sustainable production of clean energy carriers from biomass resources. *Applied Energy*, v. 100, p. 172-186, 2012.

SHIDA, G.M. *Produção de Hidrogênio e Ácidos Orgânicos por Fermentação Acidogênica em Reator Anaeróbico de Leito Fluidificado*. 2008. Dissertação de Mestrado, EESC/USP, São Carlos – SP, 2008.

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

SUN YQ, WEN TQ, TENG H, XIU ZL, ZENG. Mathematical modeling of glycerol fermentation by *Klebsiella pneumoniae*: concerning enzyme-catalytic reductive pathway

and transport of Glycerol and 1,3-propanediol across cellmembrane. *Biochem Eng J.* 2008;38:22–32.

SEIFERT, K. et al. Hydrogen generation from glycerol in batch fermentation process. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 34, n. 9, p. 3671-3678, 2009.

SELEMBO, P. A. et al. Enhanced Hydrogen and 1,3-Propanediol Production From Glycerol by Fermentation Using Mixed Cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 104, n. 6, p. 1098-1106, 2009.

SARMA, S. J. et al. Evaluation of different supplementary nutrients for enhanced biohydrogen production by *Enterobacter aerogenes* NRRL B 407 using waste derived crude glycerol. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 38, n. 5, p. 2191-2198, 2013.

Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 20th ed. American Public Health Association / American Water Works Association / Water Environment Federation, Washington, DC, USA. 1998.

TANG, J. et al. Inhibitory effects of acetate and ethanol on biohydrogen production of *Ethanoligenens harbinese* B49. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 37, n. 1, p. 741-747, 2012.

TIEN ANH, N.; SIM, S. J. Dark fermentation of hydrogen from waste glycerol using hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga neapolitana*. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, v. 31, n. 3, p. 466-473, 2012.

TEMUDO, M. F. et al. Glycerol fermentation by (open) mixed cultures: A chemostat study. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 100, n. 6, p. 1088-1098, 2008.

TIWARI A.; PANDEY A. Cyanobacterial hydrogen production e A step towards clean Environment. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 37, p.139-150, 2012.

TOKLU, E. Overview of potential and utilization of renewable energy sources in Turkey. *Renewable Energy*, v. 50, p. 456-463, 2013.

UENO Y, KAWAI T, SATO S, OTSUKA S, MORIMOTO M. Biological production of hydrogen from cellulose by natural anaerobic microflora. *J Fermen Bioeng* 1995;79:395e7

VARDAR-SCHARA, G.; MAEDA T.; WOOD, T. K.; *Microbiol. Biotechnol.* 2008, 1,107.

VERHAART, M.R.A.; BIELEN A.A.M.; OOST.; JVD.; STAMS A.J.M.; and KENGEN S.W.M. Hydrogen production by hyperthermophilic and extremely thermophilic bacteria and archaea: mechanisms for reductant disposal. *Environ Technol* 2010;31:993 – 1003.

VLASSIS, T. et al. ANAEROBIC TREATMENT OF GLYCEROL FOR METHANE AND HYDROGEN PRODUCTION. *Global Nest Journal*, v. 14, n. 2, p. 149-156, 2012.

WATKINSON, I.I.; BRIDGWATER, A.V.; LUXMORE, C. Advanced education and training in bioenergy in Europe. *Biomass and bioenergy*, v. 38, p. 128-143, 2012.

WINTER, C. Hydrogen energy d Abundant, efficient, clean: A debate over the energy-system-of-change. *International Journal Hydrogen Energy*, v.34, p. S1-S52, 2009.

WIEGEL J.; LJUNGAHL L.G.; DEMAIN A.L. The importance of thermophilic bacteria in biotechnology. *Crit Rev Biotechnol* 1985;3:39–108.

WU, S.Y; LIN, C.N.; CHANG, J.S. Hydrogen Production with Immobilized Sewage Sludge Inthree-Phase Fluidized-Bed Bioreactors. *Biotechnol. Prog.*, v. 19, p. 828-832, 2003.

WU, S.; CHU, C.; SHEN, Y. Effect of calcium ions on biohydrogen production performance in a fluidized bed bioreactor with activated carbon-immobilized cells. *International Journal Hydrogen Energy*, v.37, p. 15496-15502, 2012.

XIU, Z-L.; CHEN, X.; SUN, T-Q.; ZHANG, D-J.; *Biochem. Eng J.* 2007, 33, 42.

YANG F.; HANNA M. A.; Sun R. Value-added uses for crude glycerol e a byproduct of biodiesel production. *Biotechnol Biofuels* 2012;5:13.

YAZDANI S. S.; GONZALEZ R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Curr Opin Biotech*, v.18, p. 213-9, 2007.

YUSUF, N. N. A. N.; KAMARUDIN, S. K.; YAAKUB, Z. Overview on the current trends in biodiesel production. *Energy Conversion and Management*, v. 52, n. 7, p. 2741-2751, 2011.

ZHANG, T.; LIU, H.; FANG, H. H. P. Biohydrogen production from starch in wastewater under thermophilic condition. *Journal of Environmental Management*, v. 69, n. 2, p. 149-156, 2003.

ZEIDAN A. A.; NIEL V. E. W. J. A quantitative analysis of hydrogen production efficiency of the extreme thermophile *Caldicellulosiruptor owensensis* OLT. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.35, p.1089-98, 2010.

ZEIDAN A. A.; NIEL V. E. W. J. Developing a thermophilic hydrogen-producing co-culture for efficient utilization of mixed sugars. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.34, p.4524-98, 2009-8.

ZENG A. P.; BIEBL H. Bulk chemicals from biotechnology: the case of 1,3-propanediol production and the new trends. In: Scheper T, editor. *Advances in biochemical engineering and biotechnology*, vol. 74. Heidelberg: Springer Berlin; 2002. p. 239–59.

ZENG A. P.; MENZEL K.; DeECKWER W. D. Kinetic, dynamic, and pathway studies of glycerol metabolism by *Klebsiella pneumoniae* in anaerobic continuous culture: II

analysis of metabolic rates and pathways under oscillation and steady state conditions. *Biotechnol Bioeng*, v.56, p. 561-71, 1996.

ZHANG, Z.P.; TAY, J.H.; SHOW, K.Y.; YAN, R.; LIANG, D.T.; LEE, D.J.; JIANG, W.J. (2007) Biohydrogen Production in a Granular Activated Carbon Anaerobic Fluidized Bed Reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32: 185 – 191.

ZHANG Z. P.; SHOW K. Y.; TAY J.H.; LIANG D. T.; LEE D. J. Bio-hydrogen production with anaerobic fluidized bed reactorsd A comparison of biofilm-based and granule-based systems. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.33, p.1559-64, 2008.

ZHANG, Z. P.; TAY, J. H.; SHOW, K. Y.; YAN, R.; LIANG, D. T.; LEE, D. J.; JIANG, W. J. Biohydrogen production in a granular activated carbon anaerobic fluidized bed reactor, . *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 32, p. 185-191, 2007.

ZHANG, Z-P.; SHOW, K-Y.; TAY, J-H.; LIANG, D.T.; LEE, D-J. Enhanced Continuous Biohydrogen Production by Immobilized Anaerobic Microflora. *Energy & Fuels*, v. 22, p. 87–92, 2008.

ZHANG, Z.P.; SHOW, K.Y.; TAY, J.H.; LIANG, D.T.; LEE, D.J.; JIANG, W.J. (2006) Effect of Hydraulic Retention Time on Biohydrogen Production and Anaerobic Microbial Community. *Process Biochemistry*, 41: p. 2118–2123.

ZENG AP. A new balance equation of reducing equivalents for data consistency check and bioprocess calculation. *J Biotechnol* 1995;43:111–24.

ZEIDAN, A.A.; VAN NIEL, E.W.J. Developing a thermophilic hydrogen-producing co-culture for efficient utilization of mixed sugars. *International Journal Hydrogen Energy*, v.34, p. 4524-4528, 2009.