

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Aline Gomes de Oliveira Paranhos**

**PRODUÇÃO OTIMIZADA DE 1,3-PROPANODIOL, ÁCIDO  
PROPIÔNICO, ETANOL E HIDROGÊNIO, A PARTIR DE  
GLICEROL BRUTO E CULTURA MISTA, EM REATOR  
ANAERÓBIO DE LEITO FLUIDIFICADO**

São Carlos/SP

2016

**Aline Gomes de Oliveira Paranhos**

**PRODUÇÃO OTIMIZADA DE 1,3-PROPANODIOL, ÁCIDO  
PROPIÔNICO, ETANOL E HIDROGÊNIO, A PARTIR DE  
GLICEROL BRUTO E CULTURA MISTA, EM REATOR  
ANAERÓBIO DE LEITO FLUIDIFICADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos, como requisito para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química. Área de concentração: Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Silva

São Carlos/SP

2016

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

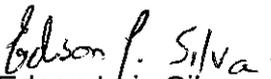
P223p Paranhos, Aline Gomes de Oliveira  
Produção otimizada de 1,3-propanodiol, ácido propiônico, etanol e hidrogênio, a partir de glicerol bruto e cultura mista, em reator anaeróbico de leito fluidificado / Aline Gomes de Oliveira Paranhos. -- São Carlos : UFSCar, 2016.  
142 p.

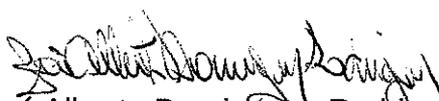
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2016.

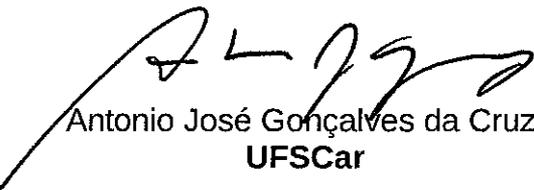
1. Glicerol. 2. Planejamento experimental. 3. Otimização. 4. 1,3-propanodiol. 5. Etanol. I. Título.

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE ALINE GOMES DE OLIVEIRA PARANHOS APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 18 DE MARÇO DE 2016.

BANCA EXAMINADORA:

  
Edson Luiz Silva  
**Orientador, UFSCar**

  
José Alberto Domingues Rodrigues  
**IMT**

  
Antonio José Gonçalves da Cruz  
**UFSCar**

## DEDICATÓRIA

*A Deus:*

“Tudo posso n’Aquele que me fortalece”

Filipenses 4:13

*Aos meus amados pais, Dalva e Gilmar:*

Meus maiores exemplos de educadores, por me ensinarem o real sentido da vida.

“Que o ódio deixe lugar ao amor, a mentira à verdade, a vingança ao perdão,  
e a tristeza à alegria”

Papa Francisco

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela dádiva da vida, por sempre me guiar pelo melhor caminho e me iluminar com tantas oportunidades de crescimento e tantas pessoas maravilhosas ao meu redor. Aos meus santos Nossa Sra. Das Graças e Frei Galvão por me protegerem de todo e qualquer mal.

Ao Prof. Dr. Edson Luiz Silva pelo aceite de orientação, pela constante presença, pelo comprometimento, por toda a experiência transferida a mim, pela grande confiança em todas as etapas de execução desse projeto, pela infinita paciência com o meu “perfeccionismo” e por me proporcionar grandes oportunidades de crescimento pessoal e profissional. O seu exemplo de profissional sempre estará presente em minha carreira!

Ao Prof. Ass. Marcelo Zaiat, assim como ao meu orientador, Prof. Dr. Edson, pela oportunidade de ter participado como bolsista vinculada ao projeto temático “Produção de Bioenergia no Tratamento de Águas Residuárias e Adequação Ambiental dos Efluentes e Resíduos Gerados”, financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo 2009/15.984-0).

À FAPESP pelo apoio financeiro concedido por meio da Bolsa de Mestrado (Processo 2014/20472-7).

Ao Prof. Dr. Antônio José Gonçalves da Cruz (DEQ/UFSCar) e Prof. Ass. Marcelo Zaiat (SHS/USP) pela gentileza nos comentários e pelas valiosas considerações no Exame de Qualificação. Aproveito para agradecer ao Prof. Dr. José Alberto Domingues Rodrigues (EEM/IMT) pelo aceite em avaliar este trabalho. Muito obrigada pelo exemplo de postura, pessoal e profissional que possuem.

A Profa. Dra. Gabriela Cantarelli Lopes e à Profa. Dr. Mônica Lopes Aguiar, pela delicadeza nas considerações a respeito do projeto de dissertação e da postura de apresentação.

A Profa. Dra. Maria Bernadete Amâncio Varesche, pela tão solícita ajuda com a parte teórica do projeto e pela gentileza que sempre me tratou, à Profa. Dra. Tereza Cristina Zangirolami, pela grande e constante ajuda com a parte estatística do trabalho e à Profa. Dra. Paula Rúbia Ferreira Rosa pela valiosa ajuda no laboratório.

Aos Professores Dr. Roberto Campos Giordano, Dr. José Maria Corrêa Bueno, Dr. Alberto Colli Badino Junior e Dr. Antônio José Gonçalves da Cruz, do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos, pelo amplo conhecimento transmitido durante às disciplinas do mestrado, além do exemplo de profissionais e pessoas que representam.

À Profa. Dra. Alcení Augusta Werle e ao Prof. Dr. Sérgio Francisco de Aquino, do Departamento de Química da Universidade Federal de Ouro Preto, pela fundamental orientação pessoal e profissional “à distância” que me forneceram. Agradeço de coração, toda a ajuda de vocês!

Às indústrias Biobrotas Oleoquímica (Brotas/SP) e Biocapital (Charqueada/SP) por disponibilizar as amostras de glicerol, pela gentil recepção e pela constante atenção ao longo deste trabalho.

Aos especialistas Alexandre Cruz e Miller Rufino (SINC do Brasil), e às laboratoristas Msc. Alexandra Gonçalves (DEQ/UFSCar), Dra. Maria Ângela Tallarico Adorno e Dra. Inês Tomita (LPB/SHS/USP), pela grande ajuda com a cromatografia e por me socorrerem nos diversos problemas durante as análises. Agradeço a constante paciência e solicitude que tiveram ao longo destes dois anos.

Ao químico Amadeus, meu colega de profissão, pela grande e constante ajuda com as análises e pela gentileza em realizar meus pedidos de última hora. Muito obrigada por toda a paciência e compreensão! Ao querido Oscar, por me ajudar sempre que precisei, pelas constantes risadas e conversas e pela construção e manutenção dos reatores.

As queridas secretárias do Departamento de Engenharia Química, Raquel e Alcione, pela grande ajuda com todas as questões burocráticas do programa. Agradeço pelas risadas, gentileza e delicadeza que sempre me trataram. Ao técnico de informática Eudoro, pela valiosíssima ajuda com meu computador. Às queridas mocinhas da limpeza, por alegrarem à todos no laboratório, pelas constantes risadas, conversas no corredor e lições de vida.

A turma de mestrado do PPGEQ/2014 pelas valiosas contribuições durante as disciplinas, em especial à Ana Clara, Stefani, Andreza e Lucas. Aos amigos de Cabo Verde que me alegravam com sua cultura riquíssima. Aos amigos da Território Fit e ao seu Luiz, por toda a gentileza em me ajudar. À Nida e à Luciana Assumpção, por estarem sempre presentes. Vocês contribuíram para que meus dias em São Carlos se tornassem melhores.

Agradeço imensamente aos colegas do Laboratório de Controle Ambiental II (LCAII/DEQ/UFSCar) – Helberth, Talita, Lucas, Tiago, Gabriel, Camila, Andreza e Talles. Helberth e Talita, muito obrigada pelos primeiros ensinamentos no laboratório. Camila, muito obrigada pelas conversas e risadas, me fazia muita falta! Andreza e Talles, muito obrigada pela ajuda na etapa final de operação dos reatores, pela curiosidade e por nos fazer relembrar diversos procedimentos que fazíamos no “automático”. Meus três mosqueteiros queridos, Lucas, Tiago e Gabriel, muito obrigada por toda a ajuda com o procedimento experimental, por confiarem em mim, por acreditarem em mim quando nem eu mesmo acreditava, por cederem o ombro de vocês quando eu precisava chorar e por rirem comigo em todos os momentos. Eu tive a honra de trabalhar com vocês e sou sortuda por isso. Adoro vocês! Muito obrigada por tudo!

Aos meus anjos da guarda de São Carlos, Ana Clara e Janice, por todo o companheirismo, pela infinita paciência comigo, pela grande amizade, pelas risadas, pelos apertos, pelas conversas intermináveis, enfim, por tudo! Vocês foram presentes que ganhei de São Carlos! Muito obrigada por tudo! Amo vocês!!!

Aos amigos de Itabirito que sempre torceram pelo meu sucesso, em especial Marina, Lorena A., Lorena R. e Paola, muito obrigada pela grande amizade de anos, por estarem sempre presentes, pela paciência e compreensão quanto a minha ausência. À minha doce amiga, minha irmã de coração, Patrícia Mendanha Dias, pelos 10 anos de amizade sincera, por saber me confortar com suas palavras, por torcer pelo meu crescimento pessoal e profissional e por estar sempre presente em todos os momentos da minha vida. Aos amigos de Ouro Preto, em especial à querida turma de Química Industrial 10.1 pela torcida, e à minha amada República Tomara ki Caia e agregados pela compreensão quanto à minha ausência. Muito obrigada! Vocês são fundamentais!

Ao João Victor, por todo o seu amor e carinho, por toda a paciência em me ouvir e esperar, por saber me reconfortar com suas palavras, por estar sempre comigo me encorajando e não deixando que eu desista, por dividir seus planos e sonhos comigo e me apoiar nos meus. Meu bem, muito obrigada por tudo! Te amo!

Enfim, aos meus familiares, pelo constante e incansável incentivo dispensado a mim, por acreditarem que eu seria capaz, por me fortalecerem e me apoiarem em todos os momentos que precisei. Meus pais, Dalva e Gilmar, muito obrigada pelo eterno incentivo, por acreditarem nos meus sonhos e pela compreensão. Vocês são meus maiores exemplos de determinação e trabalho. Muito obrigada pela educação e pelos ensinamentos. Meu irmão, Álvaro, muito obrigada pelas palavras reconfortantes e pelo bom coração. Minhas avós, agradeço pelas doces palavras e pelas orações. Meu avô, agradeço a torcida e o gosto pela ciência, sempre me motivando a seguir essa carreira. Minhas madrinhas, padrinho e tia Simone, obrigada pela compreensão, alegrias e conselhos.

A todos, que mesmo aqui não citados, fizeram ou fazem parte dessa etapa em minha vida, e torceram pelo meu sucesso pessoal e profissional.

*Meus sinceros e alegres agradecimentos*

The dictionary is the only place where success comes before work”

Albert Einstein

## RESUMO

PARANHOS, A. G. O. **Produção otimizada de 1,3-propanodiol, ácido propiônico, etanol e hidrogênio, a partir de glicerol bruto e cultura mista, em reator anaeróbio de leito fluidificado**. 2016. 142f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2016.

O presente trabalho teve como objetivo otimizar a produção de hidrogênio e outros metabólitos, utilizando glicerol bruto como substrato, empregando técnicas de planejamento experimental e otimização estatística de processos. O primeiro estudo visou a otimização de parâmetros operacionais do processo fermentativo, e para tanto, um reator RALF mesofílico foi operado em 10 fases distintas, distribuídas conforme uma combinação do TDH e da concentração de glicerol (Cg) proposta por uma matriz de um DCCR contendo 10 condições experimentais. O TDH variou de 9,24h a 0,76h, enquanto a Cg variou de 17,1 g/L a 2,9 g/L. Os resultados obtidos mostraram que a máxima conversão de glicerol (CG), 98,4%, foi obtida utilizando concentrações de substrato menores que 5,0 g/L. O máximo rendimento (0,17 mol H<sub>2</sub>/mol glicerol consumido) e conteúdo de H<sub>2</sub> no biogás produzido (87,4%) foram atingidos em concentrações superiores a 10,0 g/L e TDH de 5h. Dentre os principais metabólitos solúveis produzidos, 1,3-propanodiol (1,3-PD) e ácido propiônico (HPr) se destacaram. O máximo rendimento de 1,3-PD (1,05 mol 1,3-PD/mol glicerol consumido) foi obtido com 10,0 g/L de glicerol em TDH de 9,24h, enquanto que o máximo rendimento de HPr (0,71 mol HPr/mol glicerol consumido) foi alcançado com 15,0 g/L de glicerol e TDH de 2h. O segundo estudo, por sua vez, consistiu na otimização de componentes do meio de cultura (glicerol, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, extrato de levedura e vitamina B12), através de ensaios em batelada, e posterior aplicação em RALF. Os máximos rendimentos de H<sub>2</sub> e etanol, 0,006 e 0,291 mol/mol glicerol consumido, foram obtidos em meio de cultura ótimo constituído por 26,53 g/L de glicerol, 1,75 de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,0076 g/L de B12 e 0,5 g/L de extrato de levedura. A aplicação do meio de cultura otimizado em reator contínuo não resultou na melhoria dos rendimentos de H<sub>2</sub> e etanol, no entanto, ocasionou um aumento no rendimento de 1,3-PD, alcançando 0,38 mol 1,3-PD/mol glicerol consumido.

**Palavras-chave:** Glicerol, planejamento experimental, otimização, 1,3-Propanodiol, etanol, hidrogênio, ácido propiônico, RALF.

## ABSTRACT

PARANHOS, A. G. O. **Produção otimizada de 1,3-propanodiol, ácido propiônico, etanol e hidrogênio, a partir de glicerol bruto e cultura mista, em reator anaeróbio de leito fluidificado.** 2016. 142f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2016.

This study aimed to optimize the production of hydrogen and other metabolites using crude glycerol as substrate, through design of experiments (DoE) and statistical process optimization. The first study aimed at optimizing the operational parameters of the fermentation process, and therefore, a mesophilic AFBR reactor was operated on 10 different phases, distributed as a combination of HRT and the glycerol concentration ( $G_c$ ) proposed by a matrix containing CCD array containing 10 experimental trials. The HRT varied to 9.24h to 0.76h, while  $G_c$  ranged from 17.1g / L to 2.9 g / L. The results showed that the maximum conversion of glycerol (CG), 98.4%, was obtained using substrate concentrations lower than 5.0 g/L. The maximum yield (0.17 mol  $H_2$  / mol consumed glycerol) and  $H_2$  content in the produced biogas (87.4%) were achieved at concentrations greater than 10.0 g/L and HRT of 5h. Among the main soluble metabolites produced, 1,3-propanediol (1,3-PD) and propionic acid (HPr) stood out. The maximum yield of 1,3-PD (1.05 mol 1,3-PD / mol consumed glycerol) was obtained with 10.0 g/L glycerol in HRT of 9,24h, whereas the maximum yield of HPr (0.71 mol HPr / mol consumed glycerol) was achieved with 15.0 g/L of glycerol and HRT of 2h. The second study, in turn, consisted of optimizing the culture medium components (glycerol,  $KH_2PO_4$ , yeast extract and vitamin B12), through batch tests, and subsequent application in AFBR reactor. The maximum hydrogen and ethanol yields, 0.006 and 0.291 mol / mol consumed glycerol, was obtained in optimal culture medium consisting of 26.53 g/L glycerol, 1.75 g/L  $KH_2PO_4$ , 0.0076 g/L B12 and 0.5 g/L yeast extract. The application of optimal culture medium in a continuous reactor did not result in improvement of  $H_2$  and ethanol yields, however, caused an increase in 1,3-PD yield, reaching a maximum of 0.38 mol 1.3-PD / mol consumed glycerol.

**Keywords:** Glycerol, design of experiments, optimization, 1,3-propanediol, ethanol, hydrogen, propionic acid, AFBR.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 3.1:</b> Reação de transesterificação de um triglicerídeo com etanol (alcoólise), utilizando NaOH como catalisador e produzindo biodiesel (mistura de alquil ésteres de ácidos graxos) e glicerol. ....	23
<b>Figura 3.2:</b> Processo produtivo do Biodiesel. ....	24
<b>Figura 3.3:</b> Evolução da produção de Biodiesel de 2005 a 2014. ....	26
<b>Figura 3.4:</b> Glicerina gerada na produção de biodiesel (B100), segundo grandes regiões – 2005 à 2014. ....	29
<b>Figura 3.5:</b> Rotas metabólicas da fermentação do glicerol até compostos mais simples.....	31
<b>Figura 4.1:</b> Fluxograma das etapas operacionais dos reatores. ....	56
<b>Figura 4.2:</b> Esquema do Reator Anaeróbico de Leito Fluidificado (RALF). ....	58
<b>Figura 4.3:</b> Material suporte (cinasita). ....	59
<b>Figura 5.1:</b> Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para HY – interação entre $\text{KH}_2\text{PO}_4$ x Glicerol. ....	82
<b>Figura 5.2:</b> Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para HY – interação entre B12 x Glicerol. ....	82
<b>Figura 5.3:</b> Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para HY – interação entre B12 x $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . ....	82
<b>Figura 5.4:</b> Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para HY – interação entre $\text{KH}_2\text{PO}_4$ x Glicerol. ....	85
<b>Figura 5.5:</b> Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para HY – interação entre B12 x Glicerol. ....	85
<b>Figura 5.6:</b> Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para HY – interação entre B12 x $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . ....	85
<b>Figura 5.7:</b> Porcentagem molar dos metabólitos produzidos nos 16 ensaios experimentais.....	88

<b>Figura 5.8:</b> Consumo de substrato no RGB. ....	94
<b>Figura 5.9:</b> Consumo de substrato no RGP. ....	94
<b>Figura 5.10:</b> Rendimentos de H <sub>2</sub> , etanol e 1,3-propanodiol no reator RGB. ....	97
<b>Figura 5.11:</b> Rendimentos de H <sub>2</sub> , etanol e 1,3-propanodiol no reator RGP. ....	98
<b>Figura 5.12:</b> Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para CG. ....	103
<b>Figura 5.13:</b> Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para COVR. ....	107
<b>Figura 5.14:</b> Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para %H <sub>2</sub> . ....	111
<b>Figura 5.15:</b> Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para HY. ....	116
<b>Figura 5.16:</b> Porcentagem molar dos principais metabólitos produzidos nos 10 ensaios experimentais. ....	120

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 3.1:</b> Evolução da utilização de diferentes matérias-primas para produção de biodiesel.....	25
<b>Tabela 3.2:</b> Propriedades físico-químicas do glicerol. ....	28
<b>Tabela 3.3:</b> Composição do glicerol bruto obtido durante a produção de biodiesel em função de diferentes matérias-primas. ....	28
<b>Tabela 3.4:</b> Grau de redução de substratos e produtos. ....	33
<b>Tabela 3.5:</b> Rendimentos teóricos de 1,3-PD e biomassa (ATP) para diferentes subprodutos do metabolismo do glicerol.....	38
<b>Tabela 3.6:</b> Componentes necessários em um meio de cultura sintético. ....	44
<b>Tabela 3.7:</b> Composição dos meios de cultura para produção de metabólitos a partir de glicerol reportados na literatura. ....	47
<b>Tabela 4.1:</b> Dimensões e volumes dos RALFs utilizados. ....	57
<b>Tabela 4.2:</b> Propriedades da cinasita. ....	59
<b>Tabela 4.3:</b> Composição do meio nutricional. ....	60
<b>Tabela 4.4:</b> Composição da Solução de Elementos Traços SL7. ....	60
<b>Tabela 4.5:</b> Caracterização das soluções de glicerol bruto e glicerina pura (~5,0 g/L)..	61
<b>Tabela 4.6:</b> Valores das variáveis do planejamento do tipo Plackett-Burman e seus respectivos níveis codificados. ....	65
<b>Tabela 4.7:</b> Valores das variáveis do planejamento do tipo DCCR e seus respectivos níveis codificados.....	66
<b>Tabela 4.8:</b> Condições operacionais do RGB e RBP. ....	67
<b>Tabela 4.9:</b> Valores das variáveis do planejamento do tipo DCCR, aplicado ao reator RM, e seus respectivos níveis codificados. ....	68
<b>Tabela 4.10:</b> Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). ....	69
<b>Tabela 4.11:</b> Condições operacionais do RM1 e RM2 .....	69
<b>Tabela 4.12:</b> Frequência de análise de monitoramento dos reatores e dos ensaios em batelada. ....	72

<b>Tabela 5.1:</b> Matriz PB com as quatro variáveis independentes e a respectiva resposta, Produção Acumulada de Hidrogênio – PAH <sub>2</sub> (mL H <sub>2</sub> / L). .....	74
<b>Tabela 5.2:</b> Detalhes do modelo linear construído utilizando delineamento PB. ....	75
<b>Tabela 5.3:</b> Matriz DCCR para as três variáveis selecionadas e as respectivas respostas, HY e EtOHY .....	78
<b>Tabela 5.4:</b> Coeficientes de regressão para a resposta HY. ....	79
<b>Tabela 5.5:</b> ANOVA para a resposta HY. ....	80
<b>Tabela 5.6:</b> Valores Previstos pelo modelo e respectiva %Ajuste – HY. ....	80
<b>Tabela 5.7:</b> Coeficientes de regressão para a resposta EtOHY. ....	83
<b>Tabela 5.8:</b> ANOVA para a resposta EtOHY. ....	84
<b>Tabela 5.9:</b> Valores Previstos pelo modelo e respectiva %Ajuste – EtOHY. ....	84
<b>Tabela 5.10:</b> Concentração (mg/L) dos metabólitos solúveis produzidos nos 16 ensaios. ....	86
<b>Tabela 5.11:</b> Fração molar (%) dos metabólitos produzidos nos 16 ensaios experimentais. ....	87
<b>Tabela 5.12:</b> Estudo comparativo do rendimento de hidrogênio e etanol, entre o trabalho atual e os reportados na literatura (em batelada). ....	92
<b>Tabela 5.13:</b> Consumo e concentrações afluente e efluente para o RGB e RGP. ....	94
<b>Tabela 5.14:</b> Produção de H <sub>2</sub> , etanol e 1,3-propanodiol no reator RGB. ....	96
<b>Tabela 5.15:</b> Produção de H <sub>2</sub> , etanol e 1,3-propanodiol no reator RGP. ....	98
<b>Tabela 5.16:</b> Comparação dos rendimentos máximos obtidos no reator em batelada e no reator contínuo. ....	99
<b>Tabela 5.17:</b> Desempenho do reator RM nos 10 ensaios experimentais. ....	100
<b>Tabela 5.18:</b> Coeficientes de regressão para a resposta CG. ....	101
<b>Tabela 5.19:</b> ANOVA para a resposta CG. ....	102
<b>Tabela 5.20:</b> Valores previstos pelo modelo e a respectiva %Ajuste – CG. ....	103
<b>Tabela 5.21:</b> Coeficientes de regressão para a resposta COVR. ....	105
<b>Tabela 5.22:</b> ANOVA para a resposta COVR. ....	106

<b>Tabela 5.23:</b> Valores previstos pelo modelo e a respectiva %Ajuste – COVR. ....	106
<b>Tabela 5.24:</b> Coeficientes de regressão para a resposta %H <sub>2</sub> . ....	109
<b>Tabela 5.25:</b> ANOVA para a resposta %H <sub>2</sub> . ....	109
<b>Tabela 5.26:</b> Valores previstos pelo modelo e a respectiva %Ajuste – %H <sub>2</sub> . ....	110
<b>Tabela 5.27:</b> Coeficientes de regressão para a resposta HY. ....	114
<b>Tabela 5.28:</b> ANOVA para a resposta HY. ....	114
<b>Tabela 5.29:</b> Valores previstos pelo modelo e a respectiva %Ajuste – HY. ....	115
<b>Tabela 5.30:</b> Comparação da performance de produção de hidrogênio entre o trabalho atual e os reportados na literatura. ....	118
<b>Tabela 5.31:</b> Concentração (mg.L <sup>-1</sup> ) dos principais metabólitos produzidos no reator RM nos 10 ensaios experimentais. ....	119
<b>Tabela 5.32:</b> Porcentagem molar dos principais metabólitos obtidos no reator RM nos 10 ensaios experimentais. ....	120
<b>Tabela 5.33:</b> Produção volumétrica e rendimento de 1,3-PD obtidos nos 10 ensaios experimentais. ....	124
<b>Tabela 5.34:</b> Comparação da performance de produção de 1,3-propanodiol entre o trabalho atual e os reportados na literatura. ....	127
<b>Tabela 5.35:</b> Produção volumétrica e rendimento de HPr obtidos nos 10 ensaios experimentais. ....	128
<b>Tabela 5.36:</b> Comparação da performance de produção de ácido propiônico entre o trabalho atual e os reportados na literatura. ....	131
<b>Tabela 5.37:</b> Parâmetros gerais apresentados pelo reator RM nos 10 ensaios experimentais. ....	132
<b>Tabela 5.38:</b> Balanço de DQO para os 10 ensaios experimentais realizados no reator RM. ....	134
<b>Tabela 5.39:</b> Produção de H <sub>2</sub> , 1,3-PDO e HPr e cargas orgânicas nos 10 ensaios.....	135

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

1,3-PD: 1,3-Propanodiol

1,3-PDY: 1,3-Propanediol yield (Rendimento de 1,3-PD)

ButOH: n-Butanol

COVR: Carga Orgânica Volumétrica Removida

CSTR: Continuous Stirred Tank Reactor

DCCR: Delineamento Composto Central Rotacional

DQO: Demanda Química de Oxigênio

EGSB: Expanded Granular Sludge Bed

ERDQO: Eficiência de Remoção de DQO

EtOH: Etanol

EtOHY: Ethanol yield (Rendimento de EtOH)

HAc: Ácido Acético

HBu: Ácido Butírico

HPr: Ácido Propiônico

HPrY: Propionic acid yield (Rendimento de HPr)

HY: Hydrogen yield (Rendimento de Hidrogênio)

PB: Placket-Burman design

PVH: Produção volumétrica de Hidrogênio

PAH: Produção acumulada de Hidrogênio

PVHPr: Produção volumétrica de HPr

PV1,3-PD: Produção volumétrica de 1,3-PD

RALF: Reator Anaeróbico de Leito Fluidificado

RM – RALF mesofílico alimentado com glicerol bruto para otimização do TDH x [substrato]

RGB – RALF alimentado com glicerol bruto e meio de cultura otimizado.

RGP – RALF alimentado com glicerina pura e meio de cultura otimizado.

SST: Sólidos Suspensos Totais

SSV: Sólidos Suspensos Voláteis

TCO: Taxa de Carregamento Orgânico

TDH: Tempo de Detenção Hidráulica

UASB: Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>18</b>
<b>2. OBJETIVO .....</b>	<b>21</b>
2.1. Objetivo Geral .....	21
2.2. Objetivos Específicos .....	21
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>22</b>
3.1. O Biodiesel .....	22
3.1.1. Biodiesel e Matriz Energética .....	22
3.1.2. Produção de biodiesel no Brasil e no mundo.....	25
3.2. O Glicerol .....	27
3.3. Fermentação do Glicerol: Rotas Metabólicas .....	30
3.4. Produção e Rendimento de Álcoois, Ácidos Orgânicos e H <sub>2</sub> a partir do Glicerol .....	35
3.5. Fatores que influenciam a produção de metabólitos a partir de Glicerol.....	41
3.5.1. Concentração de Glicerol .....	41
3.5.2. Composição do meio nutriente .....	43
3.5.3. pH e Temperatura .....	46
3.6. Biorreatores contínuos utilizados na fermentação do Glicerol .....	49
3.7. Processos fermentativos em Reator Anaeróbio de Leito Fluidificado .....	52
3.8. Considerações Preliminares .....	55
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>56</b>
4.1. Reator Anaeróbio de Leito Fluidificado .....	57
4.2. Material Suporte .....	59
4.3. Meio Nutricional .....	60
4.4. Água Residuária .....	61
4.5. Inóculo .....	61
4.6. Procedimento de partida dos reatores .....	62
4.7. Condições Operacionais .....	63
4.7.1. Estudo A: Otimização do meio de cultura e aplicação em reatores contínuos.....	63
4.7.1.1. Planejamento Experimental aplicado na otimização do meio nutriente .....	64
4.7.1.1.1. Delineamento Plackett & Burman (PB) .....	64

4.7.1.1.2.	Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) ...	65
4.7.1.2.	Aplicação do meio de cultura otimizado aos reatores contínuos RGB e RGP .....	66
4.7.2.	Estudo B: Otimização de parâmetros operacionais em reator contínuo.....	67
4.8.	Métodos Analíticos .....	70
4.8.1.	Composição do Biogás .....	70
4.8.2.	Determinação da concentração de glicerol .....	70
4.8.3.	Análises Físico-Químicas .....	70
4.8.4.	Medida da produção volumétrica do biogás. ....	70
4.8.5.	Determinação de álcoois e ácidos orgânicos voláteis .....	71
4.9.	Frequência de Análises .....	71
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>73</b>
5.1	Estudo A: Otimização do meio de cultura e aplicação em reatores contínuos ...	73
5.1.1	Otimização do Meio de Cultura .....	73
5.1.1.1	Delineamento Plackett-Burman .....	73
5.1.1.2	Delineamento Composto Central Rotacional .....	77
5.1.1.2.1	Efeito da concentração de glicerol bruto, $\text{KH}_2\text{PO}_4$ e vitamina B12, no rendimento de $\text{H}_2$ , por cultura mista. ....	77
5.1.1.2.2	Efeito da concentração de glicerol bruto, $\text{KH}_2\text{PO}_4$ e vitamina B12, no rendimento de Etanol, por cultura mista. ....	81
5.1.1.2.3	Metabólitos solúveis produzidos. ....	86
5.1.1.3	Ensaio de Validação .....	90
5.1.1.4	Análise comparativa com os trabalhos reportados na literatura. ....	90
5.1.2	Aplicação do meio de cultura otimizado em reatores contínuos. ....	93
5.1.2.1	Consumo de glicerol. ....	93
5.1.2.2	Hidrogênio e Metabólitos solúveis produzidos. ....	96
5.1.2.3	Comparação entre os resultados obtidos no reator batelada e no reator contínuo. ....	99
5.2	Estudo B: Otimização de parâmetros operacionais em reatores contínuos .....	100
5.2.1	Efeito da concentração de glicerol bruto e do TDH na conversão do substrato e na carga orgânica volumétrica removida.....	101
5.2.2	Efeito da concentração de glicerol bruto e do TDH no conteúdo de $\text{H}_2$ no biogás. ....	108

5.2.3	Efeito da concentração de glicerol bruto e do TDH no rendimento de H <sub>2</sub>	113
5.2.4	Metabólitos solúveis produzidos no reator RM	119
5.2.4.1	Produção volumétrica e rendimento de 1,3-Propanodiol	124
5.2.4.2	Produção volumétrica de rendimento de Ácido Propiônico	128
5.2.5	Aspectos gerais: pH, remoção de DQO e sólidos suspensos	132
5.2.6	Considerações adicionais a respeito da taxa de carregamento orgânico na produção de H <sub>2</sub> , 1,3-PD e HPr	135
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.</b>	<b>137</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>138</b>

## **CAPÍTULO 1**

### **INTRODUÇÃO**

A demanda por biocombustíveis está atualmente em ascensão em todo o mundo e a utilização da biomassa é uma das alternativas mais promissoras. O Brasil foi o pioneiro no uso de fontes de energia limpa (biocombustíveis), quando seu governo decidiu substituir a gasolina pelo álcool combustível, em 1973, por meio do programa denominado PROÁLCOOL. Em meados de 1980, cerca de 95% dos automóveis produzidos no Brasil foram modificados para a combustão do etanol. Os veículos flex, que foram projetados em 2003, representam mais de 80% dos automóveis vendidos no país. (DA SILVA et al., 2009).

Um outro biocombustível produzido a partir da biomassa é o biodiesel. Assim como o etanol pode substituir a gasolina em motores de ciclo Otto, o biodiesel pode substituir o diesel em motores a diesel. O biodiesel é produzido por meio da transesterificação dos óleos vegetais ou gorduras animais com, por exemplo, etanol ou metanol (alcoólise), geralmente catalisada por NaOH ou KOH. O glicerol, subproduto da transesterificação, representa 10% (v/v) do éster produzido.

No Brasil, a produção de biodiesel encontra-se em crescimento acelerado. Tal cenário resulta da obrigatoriedade da adição de 4% de biodiesel ao combustível de petróleo, estabelecida pelo governo brasileiro mediante a Lei 11.097/2005. Entretanto a Lei 13.033/2014, visando aproveitar a capacidade de produção do biodiesel no país, eleva a porcentagem da mistura de biodiesel ao diesel de 5% para 6%, a partir de Julho de 2014 e, para 7% a partir de Novembro do mesmo ano. Dados da Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) indicam que a produção anual de biodiesel, em 2014, foi na ordem de 3,4 bilhões de litros. O glicerol, principal resíduo gerado do processo de produção de biodiesel, teve sua produção estimada em 312 milhões de litros neste mesmo ano.

O aumento da oferta de glicerol seguida da baixa demanda do mercado já resultou na queda do preço desse subproduto. Além disso, o glicerol pode ser considerado um resíduo perigoso devido ao seu baixo ponto de fulgor (<140°F). Novos usos para o glicerol são necessários para estabilizar o preço e a oferta do biodiesel e do

seu subproduto, e para evitar o acúmulo de um material que pode ter um impacto ambiental negativo. (SELEMBO et al., 2009).

O glicerol pode ser utilizado como substrato para produção de inúmeros metabólitos, como exemplo, destacam-se: 1,3-propanodiol (TONG, 1991; ABBAD-ANDALOUSSI, 1998; KIVISTO, 2011; MOON, 2011), di-hidroxiacetona (WETHMAR & DECKWER, 1999; HEKMAT, 2003; BAUER, 2005), ácido succínico (LEE, 2004; SONG & LEE, 2006), ácido propiônico (BARBIRATO, 1997; HIMMI, 2000), etanol (JARVIS, 1997, ITO, 2005; DHARMADI, 2006), ácido cítrico (PAPANIKOLAOU, 2002; IMANDI, 2007) e hidrogênio (ITO, 2005; YAZDANI, 2008).

Produtos com alto valor agregado e amplamente utilizados, podem ser obtidos a partir da fermentação do glicerol. Como exemplo, o ácido propiônico e seus sais de cálcio, sódio e potássio são comumente aplicados como conservantes de alimentos para humanos e para ração de animais, além de ser um importante intermediário químico na síntese de fibras de celulose, herbicidas, perfumes e produtos farmacêuticos (HARADA, 2012). O 1,3-Propanodiol, por sua vez, é utilizado na fabricação de cosméticos, lubrificantes e remédios, além de também ser considerado um valioso intermediário químico potencialmente utilizado na manufatura de polímeros (poliésteres, poliéteres, poliuretanas, entre outros), e na síntese de compostos heterocíclicos (MENZEL et al., 1997; BIEBL et al., 1999). Além disso, diante do cenário mundial de esgotamento de reservas fósseis e minerais, o biohidrogênio e o bioetanol se consolidam como promissoras alternativas energéticas e renováveis.

O processo fermentativo do glicerol envolve duas rotas metabólicas paralelas. Na rota oxidativa, glicerol é convertido em di-hidroxiacetona e, após fosforilado, o produto segue para a via glicolítica, onde são gerados os metabólitos ácido succínico, ácido propiônico, etanol, ácido cítrico e H<sub>2</sub>. Na rota redutora, glicerol é convertido em 3-hidroxiopropionaldeído (3-HPA) que, posteriormente, gera o composto 1,3-propanodiol (DA SILVA et al., 2014).

Como é de se esperar, o tipo de inóculo, puro ou misto, e a composição no meio de cultura, podem favorecer a formação de diferentes produtos. A literatura demonstra que altas concentrações de glicerol favorecem a via redutora (MOON et al., 2011), enquanto prejudicam a via oxidativa (HU et al., 2010). Da mesma forma, fontes de

nitrogênio complexas (SITTIJUNDA & REUNGSANG, 2012) e vitaminas (KIVISTÖ et al., 2011) têm sido constantemente estudadas para promover a formação de produtos resultantes de uma via metabólica em detrimento da outra.

Soma-se a isso, o fato de que o modo de operação do processo pode exercer um efeito significativo na produção dos metabólitos. Inúmeros trabalhos têm aplicado reatores em batelada na fermentação de glicerol (ITO, 2005; SELEMBO, 2009; JITRWUNG & YARGEAU, 2011; HONG, 2013). No entanto, o emprego de reatores contínuos ainda é precário na literatura científica.

Nesse contexto, a utilização de reatores anaeróbios de leito fluidificado (RALF) se apresenta como uma boa alternativa. Dentre as vantagens do RALF, destacam-se: retenção de grande concentração de biomassa aderida no material suporte, apresenta menos queda de pressão quando comparados com reatores de leito fixo, sem problemas de entupimento do leito, demanda pequeno volume na configuração do reator e apresenta baixa resistência externa ao transporte de massa se comparado a outras configurações de reatores (FUENTES et al., 2009).

Com o intuito de contribuir e motivar pesquisas relacionadas à produção de hidrogênio, álcoois e ácidos orgânicos a partir do glicerol, o diferencial do presente trabalho está na aplicação de técnicas de planejamento experimental e otimização estatística de processos, em reatores operados em modo contínuo e batelada, visando a fermentação do glicerol aos produtos de interesse.

Portanto, a presente Dissertação de Mestrado apresenta dois estudos que foram desenvolvidos de forma concomitante e inter-relacionada. O primeiro deles consiste na otimização de componentes do meio de cultura, em ensaios em batelada, e posterior aplicação do meio otimizado em reatores anaeróbios de leito fluidificado, objetivando maiores rendimentos de H<sub>2</sub> e Etanol. O outro estudo propõe a otimização de parâmetros operacionais do processo fermentativo, como o TDH e a concentração do substrato, visando a melhoria na produção de H<sub>2</sub>, ácido propiônico e 1,3-Propanodiol. O outro estudo, por sua vez,

## CAPÍTULO 2

### OBJETIVOS

#### 2.1 Objetivo Geral

O objetivo principal deste trabalho foi a maximização da produção de hidrogênio, 1,3-propanodiol, etanol e ácido propiônico, utilizando glicerol bruto como substrato, por meio de técnicas de Planejamento Experimental e otimização estatística de processos.

#### 2.2 Objetivos Específicos

Nesta dissertação foram desenvolvidos dois estudos distintos, porém inter-relacionados, associados aos seus respectivos objetivos específicos:

##### **Estudo A:** Otimização do meio de cultura e aplicação em reatores contínuos

- Definir concentrações ótimas de determinados componentes do meio de cultura - glicerol, extrato de levedura,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e vitamina B12 - que maximizam a produção de  $\text{H}_2$  e Etanol, em ensaios em batelada.
- Avaliar a aplicação do meio de cultura otimizado em reatores anaeróbios de leito fluidificado, operados em modo contínuo e alimentados com glicerol bruto (RGB) e glicerina pura (RGP), e esclarecer as principais diferenças ocorridas na produção dos metabólitos em função da alteração do modo operacional.

##### **Estudo B:** Otimização de parâmetros operacionais em reator contínuo RALF

- Avaliar os efeitos individuais e interativos das variáveis TDH (0,76 a 9,24h) e Concentração de Glicerol (2,9 a 17,1 g/L) na produção de  $\text{H}_2$  e metabólitos, utilizando um reator RALF.

## CAPÍTULO 3

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 O Biodiesel

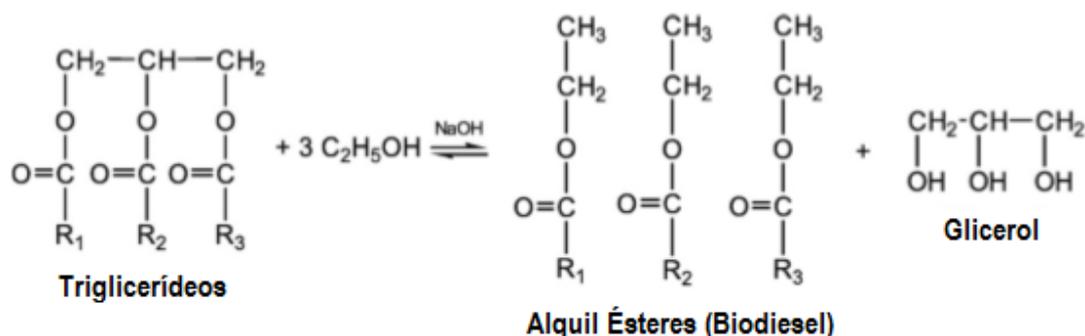
##### 3.1.1 *Biodiesel e Matriz Energética*

A relevância de combustíveis fósseis como fonte de energia é hoje amplamente reconhecida como insustentável devido à exaustão de recursos e envolvimento destes combustíveis na contaminação do ambiente (DEMIRBAS & DEMIRBAS, 2011). De acordo com o relatório da Agência Internacional de Energia (IAE), a demanda primária de energia no mundo é proposta para aumentar em 55% entre 2005 e 2030, a uma taxa anual média de 1,8% ao ano. Se esta tendência continuar, o mundo vai encontrar uma enorme crise de energia. Assim, para resolver esses importantes problemas sistematicamente, biodiesel e carbono neutro são essenciais para a sustentabilidade ambiental e econômica. O biodiesel abrange uma gama de combustíveis alternativos que podem ser obtidos a partir de sementes de plantas, óleos vegetais, bem como gorduras de origem animal (SORATE & BHALE, 2015).

A tecnologia mais comum de produção de biodiesel é a transesterificação de óleos (triglicerídeos) com o álcool, que resulta em biodiesel (álquil ésteres de ácidos graxos) como produto principal e glicerina como subproduto. A base da reação de transesterificação é ilustrada na Figura 3.1. O primeiro passo é a conversão de triglicerídeos em diglicerídeos, a qual é seguida pela conversão de diglicerídeos em monoglicerídeos e, monoglicerídeos a glicerol, obtendo-se uma molécula de éster metílico de cada glicerídeo em cada passo (MA & HANNA, 1999). A transesterificação, também chamada de alcoólise, é a troca de um álcool a partir de um éster por outro álcool, num processo semelhante à hidrólise, exceto pela utilização de álcool ao invés de água (BARNWAL & SHARMA, 2005).

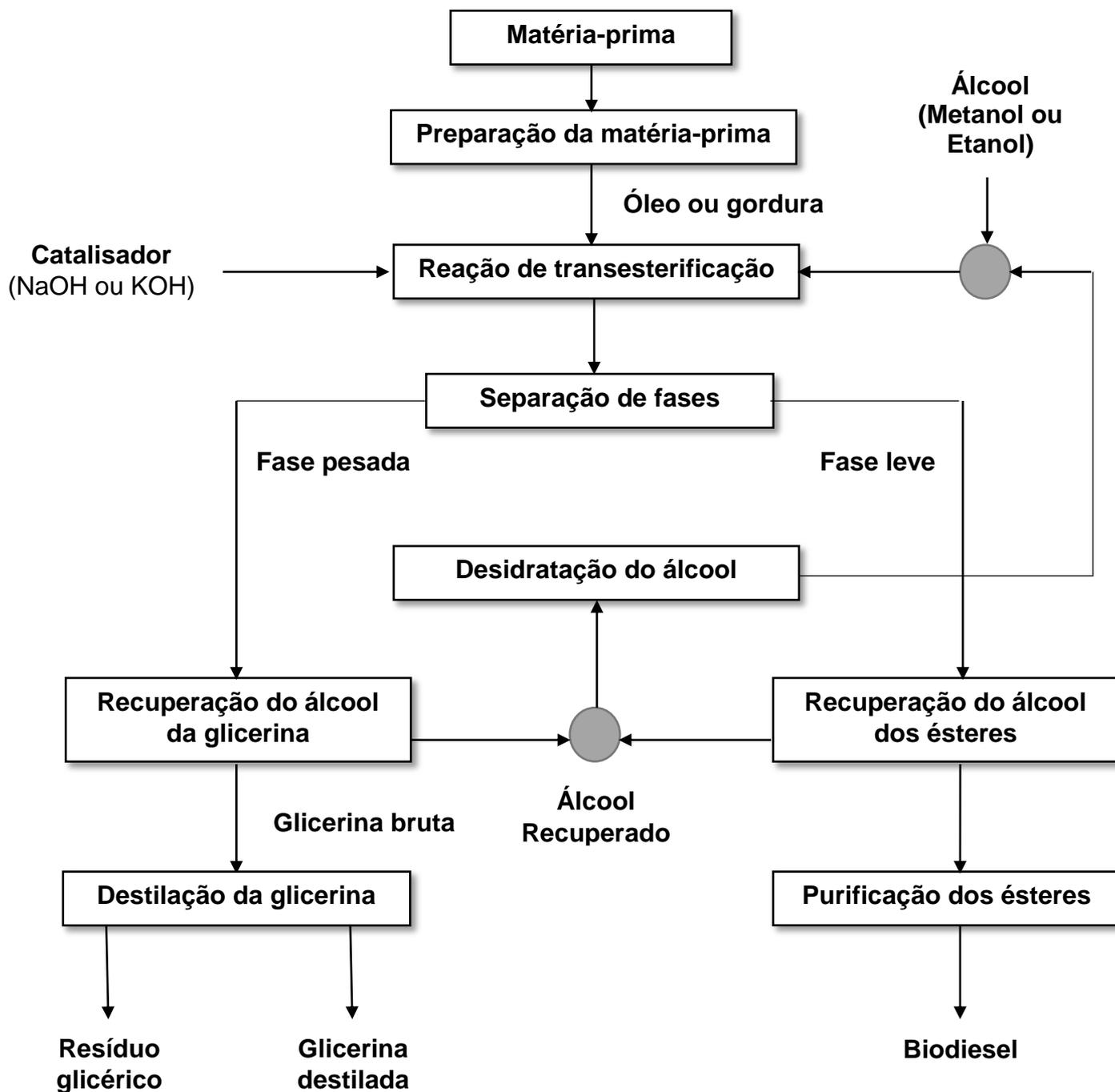
As mais relevantes variáveis operacionais que afetam o processo de transesterificação são a temperatura de reação, o tempo de reação, a pressão de reação, a razão álcool/óleo, a concentração e o tipo de catalisador, a intensidade de mistura e o tipo de matéria-prima (MARCHETTI et al., 2007).

**Figura 3.1:** Reação de transesterificação de um triglicerídeo com etanol (alcoólise), utilizando NaOH como catalisador e produzindo biodiesel (mistura de alquil ésteres de ácidos graxos) e glicerol.



Fonte: DA SILVA et al., 2009 (adaptado)

O processo produtivo do biodiesel, mostrado na Figura 3.2, se inicia na seleção da matéria-prima, como exemplo soja, mamona, girassol, palma, algodão ou gorduras animais. O óleo ou gordura passa, então, por uma etapa de preparação da matéria-prima, onde são realizados os processos de clareamento - remoção dos pigmentos do óleo - e degomagem - retirada de resquícios de umidade. O óleo previamente preparado segue para a etapa de transesterificação. Esta é a operação fundamental para a produção de biodiesel. Nesse processo, o óleo filtrado é misturado com álcool (metanol ou etanol) na presença de um catalisador (NaOH ou KOH) e os ácidos graxos são separados. A mistura bifásica é então lavada e destilada, a fim de separar o biodiesel da glicerina (subproduto). O biodiesel (fase leve) segue para o processo de remoção do álcool e purificação. Nessa etapa, obtêm-se o biodiesel de melhor qualidade. Da mesma forma, a glicerina (fase pesada) também segue para um processo de remoção do álcool e purificação por destilação. O álcool, então recuperado, passa por uma etapa de desidratação e retorna ao processo.

**Figura 3.2:** Fluxograma do processo produtivo do biodiesel.

Fonte: [www.tnsustentavel.com.br/biodiesel](http://www.tnsustentavel.com.br/biodiesel) (adaptado).

### 3.1.2 Produção de biodiesel no Brasil e no mundo

O Brasil tem grande destaque no panorama mundial do biodiesel, devido a sua grande diversidade em grãos de onde é extraído o óleo vegetal, e sua extensa criação de animais bovinos que fornecem gordura animal ou sebo (GONÇALVES et al., 2009). A Tabela 3.1 ilustra a evolução da utilização das principais matérias-primas utilizadas na produção de biodiesel.

**Tabela 3.1:** Evolução da utilização de diferentes matérias-primas para produção de biodiesel.

Matérias-primas	Produção de Biodiesel B100* (m <sup>3</sup> )								
	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Total	736	69.012	408.005	1.177.638	1.614.834	2.387.639	2.672.771	2.719.897	2.921.006
Óleo de soja	226	65.764	353.233	967.326	1.250.590	1.980.346	2.171.113	2.105.334	2.231.464
Óleo de Algodão	-	-	1.904	24.109	70.616	57.054	98.230	116.736	64.359
Gordura Animal <sup>1</sup>	-	816	34.445	154.548	255.766	302.459	358.686	458.022	578.427
Outros materiais graxos <sup>2</sup>	510	2.431	18.423	31.655	37.863	47.781	44.742	39.805	46.756

\*B100 = Biodiesel 100% puro

Fonte: ANP, 2014.

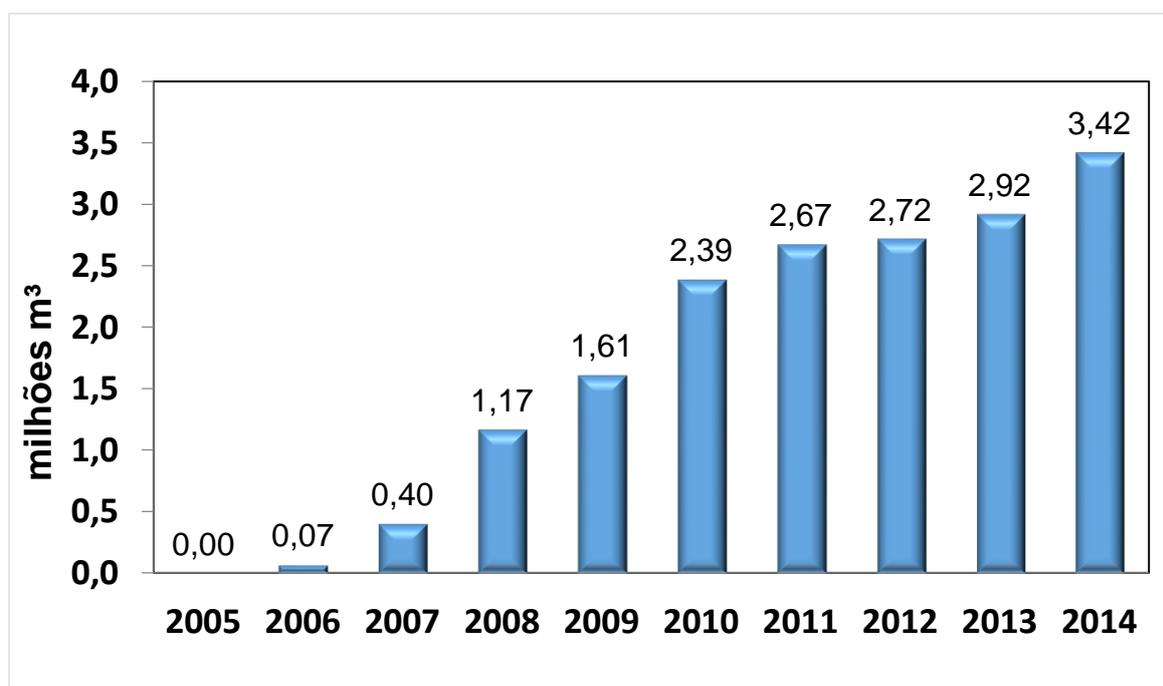
Frente a esse grande potencial de produção, ao final do século XX, o Governo Federal intensificou as discussões sobre a produção e uso do biodiesel, sendo efetuados vários estudos por comissões interministeriais em parceria com universidades e centros de pesquisa. Dentre as muitas estratégias traçadas pelo ministério brasileiro, houve a criação do Programa Brasileiro de Desenvolvimento Tecnológico do Biodiesel (PROBIODIESEL), que visa à gradual substituição do diesel proveniente do petróleo pelo biodiesel (GONÇALVES et al., 2009).

Segundo a Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), a produção nacional de biodiesel foi significativamente acelerada quando o governo brasileiro estabeleceu a obrigatoriedade da adição de, no mínimo, 4% de biodiesel ao combustível de petróleo até 2013 mediante a Lei 11097/2005 (ANP, 2010). Entretanto, o Conselho Nacional de Política Energética (CNPE), por meio da Resolução nº 6/2009, reduziu este prazo e, desde o início de 2010, o óleo diesel comercializado em todo o Brasil contém 5% de biodiesel (ANP, 2012).

Visando permitir o melhor aproveitamento da capacidade de produção do biodiesel no país, além de beneficiar os agricultores familiares, foi publicada no Diário Oficial da União em 25 de Setembro de 2014, a Lei 13.033, originária da conversão da Medida Provisória nº 647, que eleva a mistura de biodiesel ao diesel de 5% para 6%, a partir de Julho de 2015 e, para 7% a partir de 1º de Novembro. Desde a sua implantação, em Julho, já se verifica um forte crescimento da produção de biodiesel: no primeiro mês da entrada em vigor da elevação para 6% do teor deste biocombustível, a produção cresceu 26%, atingindo o recorde mensal de 302 mil m<sup>3</sup> (Ministério de Minas e Energia - MME, 2014).

Esta contínua e rápida elevação do percentual de biodiesel ao diesel demonstra o sucesso do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel e da experiência acumulada pelo Brasil na produção e no uso em larga escala de biocombustíveis. A Figura 3.3 ilustra a falta de incentivo à produção de biodiesel no ano 2005, ano em que a Lei 11097/2005 foi citada e aprovada. Nota-se também um forte aumento no volume total de biodiesel produzido a partir de 2008, ano em que a mistura de biodiesel ao diesel tornou-se obrigatória. Porém, em 2010 já se encontrava 5% de biodiesel associado ao diesel de petróleo no Brasil (ANP, 2010).

**Figura 3.3:** Evolução da produção de biodiesel de 2005 à 2014.



Fonte: ANP, 2014.

Essa elevação na mistura de biodiesel ao diesel consolida o Brasil entre os dois maiores produtores de biodiesel no mundo, junto com os Estados Unidos, ultrapassando definitivamente os tradicionais produtores europeus (os primeiros a utilizarem esse biocombustível em larga escala). Dados preliminares com base nas entregas dos leilões promovidos pela ANP mostram que a produção em agosto de 2014 foi de 307 mil m<sup>3</sup>, com uma capacidade instalada de 7.538 mil m<sup>3</sup>/ano (628 mil m<sup>3</sup>/mês). No acumulado do ano, a produção atingiu 2.115 mil m<sup>3</sup>, um acréscimo de 11% em relação ao mesmo período de 2013 (1.907 mil m<sup>3</sup>) (MME, 2014).

### 3.2 O Glicerol

Glicerol é o nome comum do composto orgânico 1,2,3-propanotriol, 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). Pode também ser denominado por glicerina, trihidroxipropano, glicil álcool, gliceril e 1,2,3-trihidróxipropano. Na natureza, o glicerol existe em vegetais (soja, mamona, babaçu, girassol, palma, algodão, côco, dendê, pinhão manso) e animais em formas combinadas de glicerina com ácidos graxos (LAGES & LUCAS, 1997). Em microrganismos eucarióticos, o glicerol constitui o principal composto formado para regular as variações de atividade de água em ambientes altamente osmofílicos. O glicerol na sua forma pura apresenta-se como um líquido viscoso, incolor, inodoro e higroscópico, com sabor doce, solúvel em água e álcool, insolúvel em éter e em clorofórmio (WANG et al., 2001).

Devido às suas características físicas e químicas (Tabela 3.2) e ao fato de ser inócuo, o glicerol puro apresenta diferentes aplicações em cosméticos, pintura, automóveis, alimentos, tabaco, indústria farmacêutica, papel e celulose, couro e têxtil. É também usado como matéria-prima para a produção de diversos produtos químicos (WANG et al., 2001). Novas aplicações têm sido avaliadas na indústria de alimentos, na indústria de poliglicerol e de poliuretano, no campo de estabilizadores de madeira e na produção de moléculas pequenas, tais como di-hidroxiacetona (DHA), ácido glicérico e hidroxipirúvico, e carbonato de glicerol (DA SILVA et al., 2009).

Em relação ao glicerol bruto, as características físicas, químicas e nutricionais, dependem, basicamente, do tipo de matéria-prima (Tabela 3.3) e do tipo de catálise empregada na produção de biodiesel (RIVALDI et al., 2007).

**Tabela 3.2:** Propriedades físico-químicas do glicerol.

Peso Molecular	92,09
Densidade (glicerol 100%) 25°C	1,262 kg/m <sup>3</sup>
Viscosidade 20°C	939 cps
Ponto de Ebulição (101,3KPa)	290°C
Ponto de Fusão	18°C
Ponto de Inflamação	177°C
Tensão Superficial 20°C	63,4 mN/m
Calor específico (glicerol 99,94%) 26°C	2,435 J/g
Calor de Evaporação 55°C	88,12 J/mol

Fonte: ARRUDA et al., 2007

**Tabela 3.3:** Composição do glicerol bruto obtido durante a produção de biodiesel em função de diferentes matérias-primas.

Composição	Matérias-primas					
	Mostarda*	Mostarda**	Canola	Soja	ROV	
ppm	Ca	11,7	23,0	19,7	11,0	ND
	K	ND	ND	ND	ND	ND
	Mg	3,9	6,6	5,4	6,8	0,4
	P	25,3	48,0	58,7	53,0	12,0
	S	21,0	16,0	14,0	ND	19,0
	Na	1,17	1,23	1,07	1,2	1,4
% (p/p)	C	24,0	24,3	26,3	26,0	37,7
	N	0,04	0,04	0,05	0,04	0,12

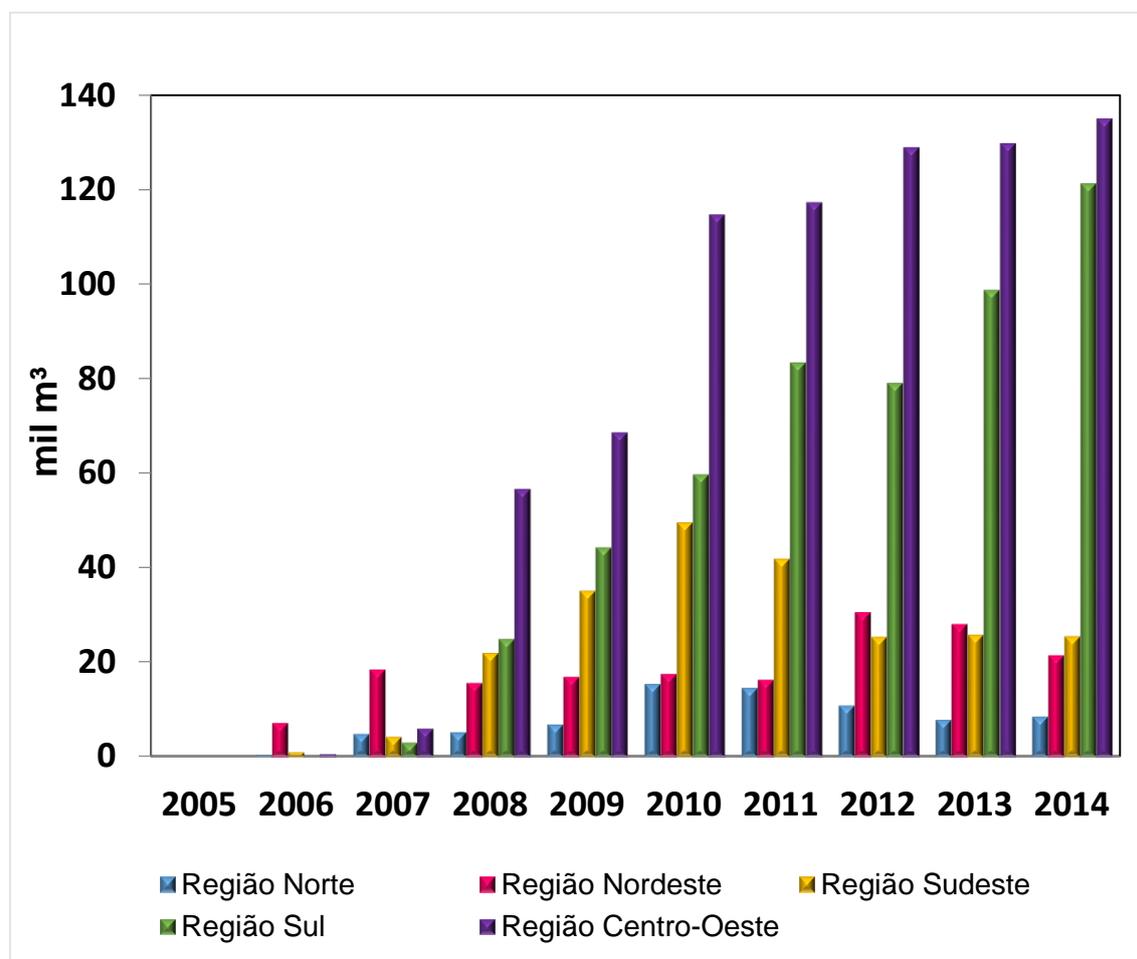
\**Ida Gold*, \*\**Pac Gold*, ROV: *resíduos de óleo vegetal (óleo usado)*, ND: *não detectado*

Fonte: RIVALDI et al., 2007.

Por conter elementos nutricionais como fósforo, enxofre, magnésio, cálcio, nitrogênio e sódio, o glicerol também tem sido considerado matéria-prima para novas fermentações industriais do futuro, uma vez que esses elementos são factíveis de serem utilizados por microrganismos para o seu crescimento durante o processo fermentativo (WANG et al., 2001; RIVALDI et al., 2007). Assim, uma das muitas aplicações promissoras para o uso do glicerol é a sua bioconversão em compostos de elevado valor agregado por meio da fermentação microbiana.

Como principal subproduto gerado nas indústrias de biodiesel, o glicerol tem ganhado uma certa visibilidade decorrente da quantidade produzida. No âmbito nacional, segundo o Anuário Estatístico de 2014, elaborado pela Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustível, a produção de glicerina coproduto do biodiesel foi 5,67% maior que no ano anterior. Em 2013, a produção de biodiesel atingiu um total de 2.917.488 m<sup>3</sup> e a produção de glicerol foi de 290.260 m<sup>3</sup>, representando cerca de 10% em volume do total de biodiesel gerado. A Figura 3.4 mostra a evolução na geração de glicerina, segundo as grandes regiões produtoras. Nota-se que a Região Centro-Oeste é a maior produtora de glicerina bruta desde 2008.

**Figura 3.4:** Glicerina gerada na produção de biodiesel (B100), segundo grandes regiões – 2005 à 2014.



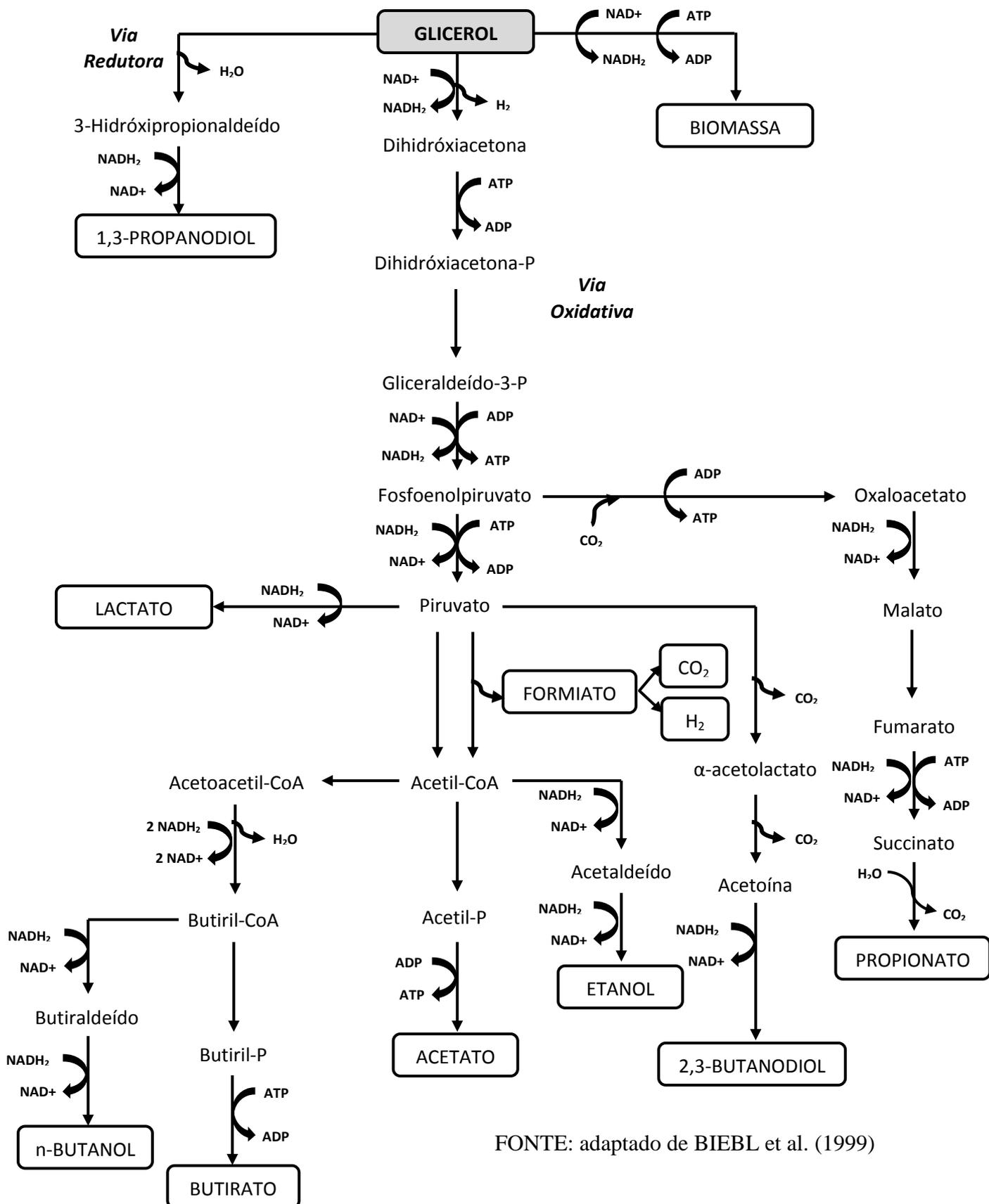
Fonte: ANP, 2014.

### 3.3 Fermentação do Glicerol: Rotas Metabólicas

Um certo número de microrganismos é capaz de crescer anaerobicamente em glicerol como única fonte de carbono e energia, como por exemplo: *Citrobacter freundii* (HOMANN et al., 1990; DANIEL et al., 1995), *Klebsiella pneumoniae* (JOHNSON et al., 1987; HOMANN et al., 1990; TONG et al., 1991; CAMERON et al., 1998; CHENG et al., 2007), *Clostridium pasteurianum* (FORSBERG, 1987; MOON et al., 2011), *Clostridium butyricum* (FORSBERG, 1987; ABBAD-ANDALOUSSI et al., 1998; PAPANIKOLAOU et al., 2003; KIVISTO et al., 2011), *Enterobacter agglomerans* (BARBIRATO et al., 1997), *Enterobacter aerogenes* (ITO et al., 2005) e *Lactobacillus reuteri* (LÜTHI-PENG et al., 2002).

As rotas metabólicas fermentativas de glicerol já estão bem estabelecidas e, de acordo com Biebl et al. (1999), podem ocorrer por via redutora ou por via oxidativa. Pela via redutora o glicerol sofre um processo de desidratação, intermediado pela coenzima *glicerol desidratase*, produzindo 3-hidroxi propionaldeído, que por sua vez é reduzido a 1,3-propanodiol (1,3-PD), mediado pela enzima *1,3-propanediol desidrogenase*. A rota oxidativa consiste em desidrogenar o glicerol, com auxílio da enzima *glicerol desidrogenase*, formando o composto dihidroxiacetona que, após sofrer fosforilação por intermédio da enzima *dihidroxiacetona quinase*, pode ser convertido a succinato, que é posteriormente convertido a propionato, ou a piruvato. As reações que levam à formação de compostos a partir de piruvato variam de acordo com as condições ambientais e com as enzimas que mediam a reação, ou seja, de organismo para organismo, podendo originar compostos mais simples, tais como 2,3-butanodiol, lactato, butirato, etanol, formato, acetato, hidrogênio e dióxido de carbono (SILVA et al., 2009; ADHIKARI et al., 2009; PAPANIKOLAOU et al., 2008; REHMAN et al., 2008; YASDANI & GONZALEZ, 2007; DHARMADI et al., 2006; BIEBL, 2001; BIEBL et al., 1999; QATIBI et al., 1991; MAGASANIK et al., 1953). O esquema das rotas metabólicas de fermentação do glicerol até compostos mais simples está apresentado na Figura 3.5.

**Figura 3.5:** Rotas metabólicas de fermentação do glicerol até compostos mais simples.



FONTE: adaptado de BIEBL et al. (1999)

Nas enterobactérias, o piruvato é clivado a Acetil-CoA e formato, numa reação catalisada pela enzima *piruvato-formiato liase*. A partir do Acetil-CoA, ácido acético é formado via acetil-fosfato, produzindo ATP extra, bem como etanol, envolvendo duas etapas NADH – oxidante tendo acetaldeído como intermediário. Formato é usualmente clivado a hidrogênio e dióxido de carbono com auxílio da enzima *formiato liase*. Análises da fermentação de produtos mostram que parte do glicerol é convertida nos mesmos produtos da fermentação do açúcar. Essa conversão proporciona a energia necessária para o crescimento, mas para muitos outros produtos, equivalentes redutores são lançados, sendo estes oxidados na conversão do glicerol pela via redutora, levando a formação de 1,3-propanodiol (BIEBL et al., 1999).

Por outro lado, o piruvato também pode ser condensado a  $\alpha$ -acetolactato para gerar, finalmente, acetoína e 2,3-butanodiol. Ácido láctico, um produto reduzido do piruvato, e ácido succínico, o qual é originado do fosfoenolpiruvato, também pode aparecer dentre os produtos finais da fermentação por enterobactérias (BIEBL et al., 1999).

Em *C. butyricum* e cepas relacionadas, praticamente dois outros produtos são formados em adição ao 1,3-PD: ácidos acético e butírico. Ácido butírico é formado após a condensação de duas moléculas de acetil-CoA, na cadeia reacional que envolve duas etapas NADH - oxidante e geração de ATP. Pequenas quantidades de etanol também são encontradas. Por sua vez, *C. pasteurianum* forma butanol simultaneamente ao 1,3-PD que, em algumas vezes, se torna o produto predominante (DABROCK et al. 1992; BIEBL, et al. 1999).

O ácido propiônico vem se destacando como um importante intermediário para fibras de celulose, herbicidas e perfumes, além de ser um valioso inibidor de mofo na preservação de alimentos. Ultimamente, esse composto tem sido investigado como produto derivado da fermentação do glicerol por cepas de *Propionibacterium*. Dentre as espécies frequentemente relatadas, incluem *Propionibacterium acidipropionici* (LIU et al., 2011), *Propionibacterium freudenreichii* (FENG et al., 2010), *Propionibacterium thoenii* (BOYAVAL et al., 1994) e *Propionibacterium jensenii* (ZHUGE et al., 2014).

Propionato é produzido majoritariamente pela via metabólica do ácido dicarboxílico, no entanto, muitas espécies produzem propionato pela via metabólica do ácido acrílico. A rota seguida depende da espécie bacteriana. De qualquer maneira,

propionato é dificilmente o único produto a ser formado, sua síntese é geralmente acompanhada pela formação de acetato e dióxido de carbono, que ocorre em proporções estequiométricas (CORAL et al., 2008).

Na via metabólica do ácido dicarboxílico, o substrato é inicialmente oxidado a piruvato com geração de NADH. De acordo com Wang e Yang (2013), fontes de carbono com baixos estados de oxidação, como o glicerol (Tabela 3.4), podem gerar mais NADH para a mesma quantidade de piruvato produzida. A partir do piruvato, 2 mols de NADH são oxidados com a formação de 1 mol de ácido propiônico, enquanto 1 mol de NADH é produzido com a síntese de 1 mol de ácido acético. O particionamento do fluxo de carbono entre essas duas rotas proporciona grande flexibilidade às propionibactérias, ao usar uma ampla variedade de substratos, com vários estados de oxidação, para manter o balanço de NADH (WANG & YANG, 2013).

**Tabela 3.4:** Grau de redução de substratos e produtos.

Substrato/Produto	Grau de redução ( $\gamma$ D)
Hidrogênio	2,00
Piruvato	3,33
Succinato	3,50
Glicose	4,00
Acetato	4,00
Biomassa	4,29
Glicerol	4,67
Propionato	4,67
Butirato	5,00
1,3-Propanodiol	5,33
Propanol	6,00
n-Butanol	6,00
Etanol	6,00

Fonte: adaptado de LIU et al., 2011

Desde que a glicólise não forneça NADH suficiente para a produção de ácido propiônico, ácido acético é formado como um metabólito de compensação, fornecendo

um poder redutor extra para manter o balanço redox. Conseqüentemente, para produzir ácido propiônico a partir da glicose, que possui um menor grau de redução ( $\gamma D = 4,00$ ) que o propionato ( $\gamma D = 4,67$ ), é necessária a co-geração de um metabólito mais oxidado, como o ácido acético ( $\gamma D = 4,00$ ). Em contrapartida, o glicerol, com o mesmo grau de redução que o propionato ( $\gamma D = 4,67$ ), possui maior poder redutor que a glicose. Portanto, a sua conversão a piruvato produz NADH suficiente para a biossíntese de ácido propiônico sem requerer a co-produção de metabólitos que forneçam NADH adicionais (LIU et al., 2011).

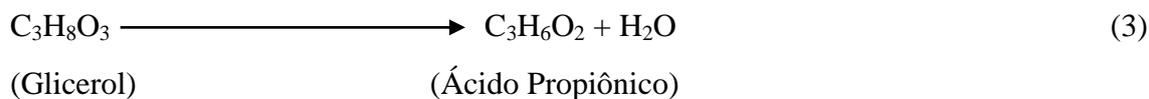
Quando o processo anaeróbico visa a geração de energia, devem estar presentes microrganismos formadores de formiato, acetato, hidrogênio e dióxido de carbono (na forma de íon bicarbonato), uma vez que estes são os únicos compostos que podem ser convertidos diretamente a metano ( $CH_4$ ).

Contudo, nem todas as reações de acetogênese ocorrem espontaneamente sob condições ambientais padrões (pH neutro,  $25^\circ C$  e 1 atm), como é o caso do propionato, butirato e etanol, sendo necessário que haja um mecanismo de remoção de  $H_2$  do meio, e assim ocorra o deslocamento da reação no sentido de formar acetato, hidrogênio e dióxido de carbono (na forma de íon bicarbonato). O principal mecanismo de remoção do  $H_2$  do meio é o seu consumo pelas *archaeas* metanogênicas hidrogenotróficas. Quando este consumo é suficiente para manter uma pressão de  $H_2$  no meio entre  $10^{-4}$  e  $10^{-6}$  atm, a degradação de propionato, butirato ou etanol se torna exergônica, liberando energia para as bactérias acetogênicas, tornando essas reações termodinamicamente favoráveis (LETTINGA et al., 1999). Posteriormente, os subprodutos da acetogênese são assimilados por *archaeas* metanogênicas acetoclásticas e convertidos a  $CH_4$  e  $CO_2$ .

As vias metabólicas anteriormente mencionadas podem ser inibidas caso algum fator externo interfira no processo de degradação. Além de fatores ambientais e operacionais (como pH, temperatura e alcalinidade), outro fator de importância é o acúmulo de intermediários e a presença de compostos considerados tóxicos encontrados neste resíduo, como por exemplo, ácidos graxos de cadeia longa - AGCL (HAZIMAH et al., 2003; YONG et al., 2001), sais inorgânicos de cloretos (CARMONA et al., 2009), sulfatos (MA et al., 2008) e sulfetos (HULSHOFF POL et al., 1998), formados a partir de compostos sulfurosos, causando inibição da atividade bacteriana, em especial as do domínio *archaeas* metanogênicas.



teórico de 0,80g HPr/g glicerol (WANG & YANG, 2013). A equação (3) representa a reação de formação do ácido propiônico a partir do glicerol (WANG & YANG, 2013):



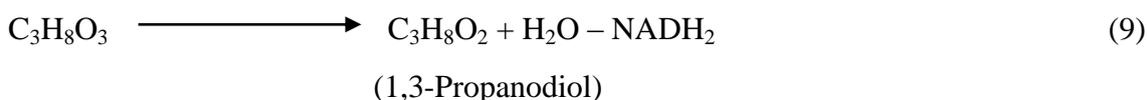
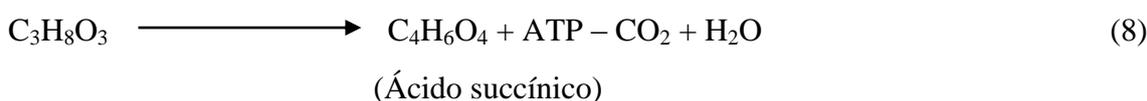
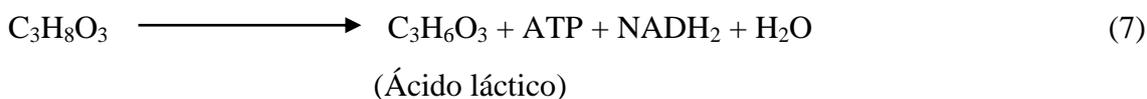
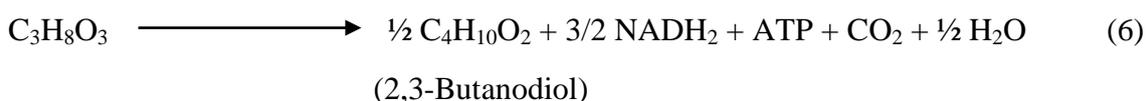
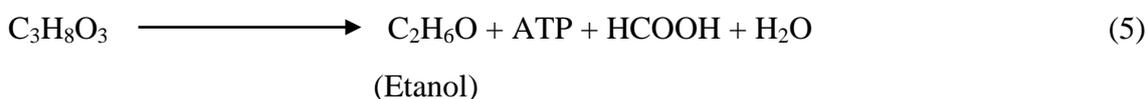
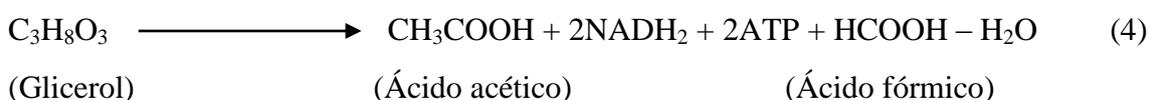
Entretanto, de acordo com Wang e Yang (2013), o rendimento real de ácido propiônico pode ser menor devido a fração de substrato utilizada para a biomassa celular ou maior se a rota HMP for utilizada na glicólise, sendo esta afetada pelas condições de crescimento.

Barbirato et al. (1997) avaliaram três diferentes substratos na fermentação do glicerol à HPr por meio de *P. acidipropionici*. Os substratos avaliados foram glicerol, glicose e lactato, em concentração equivalente a 20g/L. Verificou-se que a concentração e produtividade máxima de HPr, 13,6 g/L e 0,18 g/L/h respectivamente, ocorreu ao utilizar glicerol como substrato. Além disso, a razão molar P/A (HPr/HAc) obtida para os três substratos testados – 37 com glicerol, 4 com glicose e 2,5 com ácido láctico – indicam que o processo posterior de purificação do produto será facilitado, em função da baixa concentração de ácido acético. Outro teste foi realizado aumentando, gradativamente, a concentração de glicerol de 20 g/L a 80 g/L. A concentração máxima de HPr, 42,0 g/L, foi obtida ao utilizar 80,0 g/L de glicerol. No entanto, para esta concentração de glicerol obteve-se o menor rendimento de HPr (0,766 mol/mol glicerol), devido a inibição da bactéria pelo HPr e o aumento na concentração de ácido succínico e propanol.

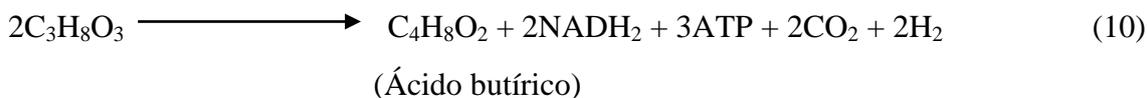
Coral et al (2008) estudaram a produção de ácido propiônico, por meio de *Propionibacterium acidipropionici*, por três diferentes substratos orgânicos: Melaço, Glicerol e Lactato. Os experimentos foram conduzidos em batelada, pH inicial entre 6,8 e 7,0 e duas temperaturas testadas, 30°C e 36°C. Os autores constataram que, apesar da pouca diferença, a melhor temperatura para produção de ácido propiônico foi 30°C, para todos os substratos utilizados. Além disso, a concentração (15,06 g/L) e produtividade máxima de HPr (0,113 g/L/h) foi obtida utilizando-se lactato como fonte de carbono. Por outro lado, ao utilizar glicerol, não houve produção de ácido acético, o que maximizou o rendimento de ácido propiônico (0,724 g HPr/g glicerol), com uma razão estimada experimentalmente de Propionato/Acetato (P/A) igual a 100:1.

Com a valorização da produção industrial de 1,3-propanodiol, microrganismos da família gram-negativa *Enterobacteriaceae*, que inclui espécies de *Escherichia*, *Klebsiella* e *Citrobacter*, e da família gram-positiva *Clostridiaceae*, com destaque para *C. butyricum* e *C. pasteurianum*, têm sido intensivamente estudados e suas rotas metabólicas elucidadas (YAZDANI & GONZALEZ, 2007).

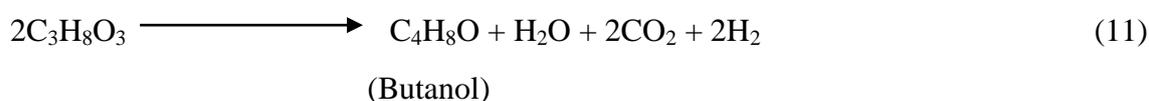
De acordo com a Figura 3.5, as reações que levam à formação de diferentes metabólitos na fermentação do glicerol, por meio de *K. pneumoniae*, podem ser escritas como as seguintes (ZENG et al., 1995):



No entanto, utilizando *C. butyricum*, ácido acético e ácido butírico são os principais produtos derivados do piruvato na fermentação do glicerol. A reação de formação do ácido butírico é descrita a seguir (ZENG, 1996):



Ao fermentar o glicerol, *C. pasteurianum* é capaz de formar uma grande variedade de produtos incluindo butanol, etanol, 1,3-propanodiol, ácidos butírico, acético e láctico. Diante das inúmeras condições testadas e investigadas por alguns autores (DABROCK, et al. 1992; BIEBL, 2001; MOON, et al. 2011), butanol é o produto majoritário, muitas vezes acompanhado por etanol. A reação de fermentação do glicerol a butanol e etanol mostra um balanço redox neutro, o qual não requer a formação de subprodutos (BIEBL, 2001). A Equação (5) supracitada representa a reação do etanol. A reação do butanol é demonstrada pela Equação (11) a seguir (BIEBL, 2001):



De acordo com a Tabela 3.4, observa-se que, assumindo que a composição da massa celular média corresponde a  $\text{C}_4\text{H}_7\text{O}_2\text{N}$  (HERBERT et al., 1971), o substrato glicerol é mais reduzido que o material celular. Assim, o crescimento da biomassa também produz equivalentes redutores, que podem ser usados para a produção de 1,3-propanodiol (1,3-PD). O rendimento teórico de ATP e de 1,3-PD, juntamente com outros subprodutos individuais, está compilado na Tabela 3.5 abaixo.

**Tabela 3.5:** Rendimentos teóricos de 1,3-PD e biomassa (ATP) para diferentes subprodutos do metabolismo do glicerol.

Produtos	Rendimento (mol/100 mol glicerol)			
	Formação de 1 mol $\text{H}_2$ /mol $\text{CO}_2$		Não formação de $\text{H}_2$	
	1,3-PD	ATP	1,3-PD	ATP
Ácido Acético	64	57	72	44
2,3-Butanodiol	59	36	59	36
Ácido Butírico	50	64	65	44
Ácido Láctico	50	44	60	44
Etanol	11	79	50	44
Butanol	11	79	50	44
Ácido Succínico	11	79	11	11

Fonte: BIEBL et al., 1999.

De acordo com Biebl et al. (1999), durante a fermentação do glicerol, as culturas que apresentam maior rendimento de 1,3-propanodiol são as que produzem, além de CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>, somente ácido acético como subproduto, fornecendo 64% de 1,3-PD do glicerol consumido. Em contrapartida, se duas moléculas de NADH, liberadas durante a formação de uma molécula de piruvato, são completamente reutilizadas para posterior processamento do próprio piruvato, ou seja, formação de butanol e etanol, o rendimento de 1,3-PD é menor (11%), pois o rendimento da biomassa é maior. Ainda assim, o rendimento de 1,3-PD pode ser melhorado reduzindo-se a evolução de H<sub>2</sub>.

De maneira semelhante às outras fermentações, a formação dos produtos na fermentação a 1,3-propanodiol depende, majoritariamente, da disponibilidade da fonte de carbono e energia e do pH. Quando a concentração de glicerol é o fator limitante, a formação da biomassa celular é otimizada e grandes quantidades de etanol são produzidos, mas à medida que glicerol aparece no meio, por causa do aumento da inibição pelos subprodutos, a formação de etanol cessa e o rendimento de 1,3-PD se aproxima do seu valor máximo (BIEBL et al.; 1999).

Abbad-Andalousssi et al. (1998) estudaram o fluxo metabólico na fermentação de misturas de glicose/glicerol por meio de *Clostridium butyricum* DSM 5431. Para tanto, os autores conduziram fermentações em bateladas com a mistura glicose/glicerol (218 mM / 222 mM) e com os substratos puros. Observou-se que quando *Cl. Butyricum* foi o inóculo no meio contendo ambos os substratos, a conversão de glicerol a 1,3-PD aumentou de 0,57 (glicerol puro) para 0,93 mol 1,3-PD/mol glicerol consumido. Mediante as análises enzimáticas, os autores concluíram que em misturas de glicose/glicerol, o catabolismo da glicose é utilizado pelas células para geração de energia através da produção de acetato-butirato e NADH, enquanto o glicerol é utilizado, sobretudo, no aproveitamento da força redutora, uma vez que 93% do fluxo de glicerol foi convertido para a via metabólica produtora de 1,3-PD.

Boenigk et al. (1993) avaliaram a conversão de glicerina pura em 1,3-propanodiol, por meio de *Citrobacter freundii* DSM 30040, em um quimiostato de dois estágios. A concentração de glicerol aplicada foi de 300 mM. O primeiro estágio foi operado sob as condições: pH 7,2, D=0,1h<sup>-1</sup>, 31°C e, o segundo estágio apresentou pH 6,6, D=0,05h<sup>-1</sup> e 28°C. Sob essas condições, alcançou-se uma concentração final de 545 mM de 1,3-PD, com produtividade global de 1,38 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. Os autores observaram que

a produtividade do *C. freundii* aumenta com a taxa de diluição (D), obtendo um máximo de  $3,7 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , em  $D=0,30\text{h}^{-1}$ . Nessa condição, o rendimento de 1,3-PD obtido foi de  $0,54 \text{ mol / mol glicerol}$ .

González-Pajuelo et al. (2005) avaliaram os efeitos da taxa de diluição (D) e da concentração alimentada de substrato na fermentação contínua de glicerina pura à 1,3-PD, por meio de *Clostridium butyricum* VPI 3266, em um CSTR. Os autores também observaram que um aumento na taxa de diluição gera um aumento na produtividade volumétrica de 1,3-propanodiol. O maior valor reportado de produtividade ( $10,3 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) foi atingido em  $D=0,30 \text{ h}^{-1}$  e  $60 \text{ g.L}^{-1}$  de glicerol, obtendo o rendimento de 1,3-PD igual a  $0,65 \text{ mol/mol glicerol consumido}$ .

Zhang et al. (2007) avaliaram a produção de 1,3-PDO utilizando *Klebsiella pneumoniae*. As condições ótimas determinadas para pH e temperatura foram 8,0 e  $40^{\circ}\text{C}$ , respectivamente. Como fontes de nitrogênio e carbono, as concentrações ótimas obtidas foram, respectivamente,  $6,0 \text{ g/L}$  de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e  $20,0 \text{ g/L}$  de glicerol. Fermentações em batelada, nas condições acima, resultaram em concentração, rendimento e produtividade de 1,3-PD equivalentes a  $12,2 \text{ g/L}$ ,  $1,53 \text{ g/L/h}$  e  $0,75 \text{ mol/mol glicerol}$ , respectivamente. Para as fermentações em batelada-alimentada, a concentração de 1,3-PD apresentou um máximo de  $38,1 \text{ g/L}$ , enquanto a produtividade e rendimento decresceram ( $0,79 \text{ g/L/h}$  e  $0,70 \text{ mol/mol}$ ).

Liu et al. (2013) examinaram os efeitos do tempo de retenção de hidrogênio (HyRTs), os intervalos de coleta de gás (GCIs) e o ponto inicial de coleta de gás (IGCTs), na produção de 1,3-propanodiol e hidrogênio em reatores em batelada. Os autores observaram que, no maior HyRT, GCI e IGCT houve a menor produção de hidrogênio e maior produção de 1,3-PD. A concentração de glicerol de  $7 \text{ g/L}$  gerou o máximo rendimento de 1,3-PD ( $0,65 \text{ mol / mol glicerol}$ ) em GCI/IGCT de  $20\text{h}/65\text{h}$  e, o máximo rendimento de hidrogênio ( $0,75 \text{ mol / mol glicerol}$ ) em GCI/IGCT de  $2,5\text{h}/20\text{h}$ .

Dharmadi et al. (2006) reportaram a fermentação do glicerol pela *E. coli*, onde a dependência do pH e a disponibilidade de  $\text{CO}_2$  foram analisados. Os autores demonstraram que alto pH resulta em baixa geração de  $\text{CO}_2$  (menor atividade da enzima formato-hidrogênio-liase) e disponibilidade (mais  $\text{CO}_2$  foi convertido em bicarbonato), e conseqüentemente fermentação muito ineficiente do glicerol. Ito et al. (2005) mostraram que o glicerol, em concentração de  $10 \text{ g/L}$ , é quase completamente

consumido no prazo de 84h e os produtos majoritários são etanol e ácido succínico com rendimento molar de 86% e 7%, respectivamente. De acordo com esses autores, *E. coli* é considerado um bom biocatalisador para a conversão de glicerol em etanol e hidrogênio.

Da mesma forma, *Enterobacter aerogenes* pode ser utilizado para a produção de etanol com alto rendimento, a partir de resíduos de biodiesel contendo glicerol. Ito et al. (2005) analisaram a fermentação de um meio sintético contendo resíduos de biodiesel e observaram que o glicerol foi consumido em 24h produzindo 0,89 mol de H<sub>2</sub> e 1,0 mol de etanol por mol de glicerol. Jitrwung & Yargeau (2011), por sua vez, observaram um rendimento de 0,95 mol H<sub>2</sub> e 0,79 mol EtOH, por mol de glicerol, ao utilizarem glicerol bruto (21,0 g/L) e otimizarem importantes parâmetros, como componentes do meio de cultura e oxigênio presente no sistema.

### **3.5 Fatores que influenciam a produção de metabólitos a partir de Glicerol**

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

#### *3.5.1 Concentração de Glicerol*

Uma alternativa bastante viável e promissora para utilização do glicerol bruto é o reaproveitamento direto deste resíduo, sem tratamento prévio, como fonte de carbono em processos fermentativos. Ao contrário da maioria dos compostos celulósicos, materiais residuais dificilmente necessitam de pré-tratamento, o que viabiliza o seu uso. Substratos como soro de leite e melaço, tornam-se menos abundantes devido às amplas aplicações em processos fermentativos industriais. Outros substratos como resíduos alimentícios em geral, necessitam de pré-tratamento (moagem) como etapa prévia ao processo fermentativo, por possuírem materiais sólidos em sua composição. Dessa forma, o glicerol tem se destacado como substrato promissor na produção biológica de hidrogênio e outros produtos de valor agregado.

Um parâmetro determinante na produção dos metabólitos explicitados é a concentração de glicerol. Altas concentrações de glicerol geram uma diminuição na produção de hidrogênio e etanol (HU et al., 2010) enquanto promovem uma maior produtividade de 1,3-PD (MOON et al., 2011).

Para a espécie *Klebsiella pneumoniae*, diversos trabalhos foram reportados sob o foco da produção de 1,3-PD. Oh et al. (2008) encontraram uma produção ótima de 13,88 g/L de 1,3-PD (0,48 mol / mol Glicerol) utilizando 35,2 g/L de glicerol bruto em 10,8h. Hong et al. (2013), por sua vez, encontraram 52,59 g/L de 1,3-PD (0,63 mol / mol de Glicerol) utilizando 108,5 g/L de glicerol em 26h de operação.

Visando a produção combinada de hidrogênio e etanol, Varrone et al. (2012) encontraram 0,96 mol H<sub>2</sub> / mol glicerol e 1 mol EtOH / mol glicerol (7,9 g/L) utilizando 15,0 g/L de glicerol bruto, por meio de cultura microbiana mista. Chookaew et al. (2014), por sua vez, encontraram 0,26 mol H<sub>2</sub> / mol glicerol e 0,58 mol EtOH / mol glicerol, utilizando 11,14 g/L de glicerol bruto, por meio de *Klebsiella* sp. TR17.

Ito et al. (2005) realizaram ensaios em batelada, utilizando glicerol bruto e glicerol puro como fontes de carbono, por meio da cultura pura *Enterobacter aerogenes* HU-10. Os autores observaram que ao aumentar a concentração de glicerol bruto de 1,7 g/L para 25 g/L, o rendimento de H<sub>2</sub> e EtOH decrescia de 1,12 para 0,71 mol H<sub>2</sub>/mol glicerol e 0,96 para 0,56 mol EtOH/mol glicerol, respectivamente. O mesmo fenômeno aconteceu nos experimentos com glicerol puro: os rendimentos de H<sub>2</sub> e EtOH diminuíram de 1,05 para 0,82 mol H<sub>2</sub>/mol glicerol e de 1,00 para 0,80 mol EtOH/mol glicerol, ao aumentar a concentração do substrato de 5,0 para 25,0 g/L, respectivamente.

No entanto, ao observarem o rendimento de 1,3-propanodiol, os autores constataram que o aumento da concentração de glicerol favorecia a produção desse produto. No ensaio utilizando glicerol puro como fonte de carbono, ao aumentarem a concentração de glicerol de 5,0 g/L para 25,0 g/L, o rendimento de 1,3-PD passou de 0,06 para 0,14 mol 1,3-PD/mol glicerol.

### 3.5.2 Composição do Meio Nutriente

Um importante fator associado à produção de determinado produto é o meio de cultura, que pode ser adicionado ao inóculo em experimentos de degradação. O meio de cultura é constituído de vários minerais e não contém qualquer quantidade significativa de carbono orgânico. Um meio sintético pode ser adicionado como fonte de micronutrientes, vitaminas e metais traços, fatores necessários para o crescimento dos microrganismos. Os meios sintéticos são utilizados nos casos em que a falta de componentes importantes para o crescimento limitam o desenvolvimento microbiano (ANGELIDAKI et al., 2004). A Tabela 3.6 descreve esses componentes e suas respectivas funções na célula microbiana.

A Tabela 3.7 sintetiza as principais diferenças na composição do meio de cultura visando a produção de determinado metabólito. Vale se atentar para o fato de que a maioria dos trabalhos utilizam culturas puras na fermentação do glicerol. Esse fato, de certa forma, facilita a otimização do processo, uma vez que o planejamento experimental será desenvolvido com base nas características de uma única espécie e não de um consórcio microbiano.

A influência de fontes de nitrogênio, tanto orgânicas quanto inorgânicas, como possíveis variáveis na produção fermentativa desses metabólitos, tem sido constantemente estudada. Como mostrado na Tabela 3.8, a grande maioria dos trabalhos utilizam extrato de levedura como fonte de nitrogênio complexa. No entanto, substâncias como triptona (ITO, 2005; ADNAN, 2014), uréia (SITTIJUNDA & REUNGSANG, 2012; YUE, 2012), peptona (PFLÜGL, 2012; HONG, 2013) e cisteína (BOENIGK, 1993; KIVISTÖ, 2011), também são muito utilizadas.

Ito et al. (2005) demonstraram que a produção de hidrogênio e etanol aumenta significativamente com a adição de extrato de levedura e triptona. Os autores encontraram 1,12 mol H<sub>2</sub> / mol glicerol, 0,96 mol EtOH / mol glicerol e 0,2 mol 1,3-PD / mol glicerol, utilizando 1,7 g/L de glicerol bruto, 0,5 g/L de extrato de levedura e 0,5 g/L de triptona, com *Enterobacter aerogenes*. Sittijunda et al. (2012) reportaram o uso de 0,16 g/L de uréia, como fonte de nitrogênio complexa, na produção de 0,30 mol H<sub>2</sub> / mol glicerol bruto, 3,46 g/L de 1,3-PD e 3,01 g/L de EtOH, por meio de culturas termofílicas mistas.

**Tabela 3.6:** Componentes necessários em um meio de cultura sintético.

<b>Composto</b>	<b>Função celular</b>	<b>Substâncias químicas que suplementam o meio sintético</b>
Nitrogênio (N)	Segundo composto mais abundante após o carbono. Elemento majoritário nos ácidos nucleicos e aminoácidos.	NH <sub>4</sub> Cl, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , N <sub>2</sub> , KNO <sub>3</sub>
Fósforo (P)	Necessário em ácidos nucleicos e fosfolipídios.	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
Enxofre (S)	Necessário nos aminoácidos cisteína e metionina, em vitaminas, como tiamina, biotina e ácido lipóico, coenzima A.	NaSO <sub>4</sub> , KH <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> , Na <sub>2</sub> S, cisteína.
Potássio (K)	Utilizado por muitas enzimas diferentes.	KCl, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Magnésio (Mg)	Estabiliza ribossomos, membranas celulares e ácidos nucleicos.	MgCl <sub>2</sub> , MgSO <sub>4</sub>
Sódio (Na)	Necessário a muitas enzimas.	NaCl
Cálcio (Ca)	Ajuda a estabilizar a parede celular bacteriana e é importante na estabilização de endósporos.	CaCl <sub>2</sub>
Ferro (Fe)	Presente nos citocromos.	FeCl <sub>3</sub> , FeSO <sub>4</sub> , agentes quelantes de Ferro complexados com EDTA.
Micronutrientes	São usualmente necessários em enzimas específicas.	Cr, Co, Cu, Mn, Mo, Ni, Se, V, Zn.
Fatores de crescimento	Requeridos em pequenas quantidades.	Vitaminas, aminoácidos (essenciais), purinas, pirimidinas.

Fonte: Angelidaki et al. (2004).

Servindo com um tampão no sistema fermentativo, as fontes de fosfato impedem que o pH diminua drasticamente devido a acumulação de ácidos orgânicos voláteis durante a fermentação do hidrogênio (LIN et al., 2004). Além disso, essas substâncias

atuam como provedoras de fósforo, que é essencial na síntese de DNA, RNA e ATP nas células microbianas (WANG et al., 2009). Jitrwung & Yargeau (2011) encontraram 0,78 mol EtOH / mol glicerol e 0,67 mol H<sub>2</sub> / mol glicerol, ao utilizar 15 g/L de glicerol bruto e 8,0 g/L de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, utilizando *Enterobacter aerogenes*. Da mesma forma, Kaür et al. (2012) obtiveram 0,65 mol 1,3-PD / mol glicerol, ao utilizar 3,21 g/L de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 2,75 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, com *Clostridium diolis*.

Estudo realizado por Mangayil et al. (2015), utilizando glicerol bruto na produção ótima de hidrogênio com cultura mista, mostra que componentes como MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O e KCl exercem um efeito negativo na produção de hidrogênio e seleciona NH<sub>4</sub>Cl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> como variáveis significativas. O delineamento experimental sugeriu o meio ótimo composto por NH<sub>4</sub>Cl, 4,40g/L; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,6g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,27g/L; MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 1,0g/L; KCl 1,0g/L; Na-acetato.3H<sub>2</sub>O, 1,0g/L e triptona, 2,0g/L. O rendimento de Hidrogênio previsto foi de 1,41 mol H<sub>2</sub>/mol glicerol. O experimento de validação confirmou a precisão do método resultando em uma variância de 0,58% (1,42 ± 0,15 mol H<sub>2</sub>/mol glicerol) em relação ao valor previsto.

A Vitamina B12, isto é, cobalamina ou cianocobalamina, é um produto industrial biologicamente não-ativo. Organismos biológicos processam a vitamina B12 nas suas formas ativas: 5'-deoxiadenosilcobalamina (coenzima B12) e metilcobalamina (MARTENS et al., 2002). A vitamina B12 é vital para muitas bactérias porque realiza uma série de funções importantes no organismo, incluindo transferência intra e intermolecular de hidrogênio e grupos metila (MARTENS et al., 2002).

A vitamina B12 está envolvida em diversas funções celulares, uma vez que as enzimas responsáveis por essas reações são dependentes da vitamina. No âmbito da fermentação do glicerol, a vitamina B12 corrobora para as seguintes reações: degradação do glicerol a 3-hidróxi propionaldeído na primeira etapa da produção de 1,3-PD, com auxílio da enzima *glicerol desidratase*; degradação do 1,2-propanodiol a propionaldeído ou 1,2-etanodiol a acetaldeído, através da enzima *diol desidratase* (FORAGE & FOSTER, 1982); degradação de etanolamina, por meio da enzima *etanolamina amônia liase*; biossíntese de metionina e reciclagem de ácidos fólicos, através da enzima *metionina sintetase*; e produção de propionato, com auxílio da enzima *metilmalonil-CoA mutase* (ROTH, LAWRENCE & BOBIK, 1996).

### 3.5.3. pH e Temperatura

Os mais importantes parâmetros físicos que afetam a produção de hidrogênio e etanol são o pH inicial e a temperatura. Dentro do intervalo apropriado, um aumento no pH inicial e na temperatura pode aumentar o crescimento e a atividade dos microrganismos, bem como a atividade da *hidrogenase* e da *álcool desidrogenase*, que são as enzimas responsáveis pela produção de hidrogênio e etanol, respectivamente (OTHONG, 2008; WANG, 2009).

Reugsang et al. (2013) otimizaram da produção simultânea de Hidrogênio e Etanol, utilizando glicerol bruto e *Enterobacter aerogenes* KKU-S1, através de Metodologia de Superfície de Resposta. Dentre as variáveis estudadas – pH inicial, temperatura, concentração de vitamina, concentração de Extrato de Levedura e concentração de glicerol – constatou-se que o pH, temperatura e as concentrações de glicerol e extrato de levedura, exerceriam um efeito significativo na produção de etanol e na produtividade de hidrogênio. Os autores obtiveram a máxima produtividade de H<sub>2</sub> (0,34 mmol H<sub>2</sub>/L.h) ao utilizarem pH 7,29 e 30°C e, a máxima produção de **etanol** (119,18 mmol/L) em pH 8,62 e 35°. Para a maximização de ambos os produtos (0,24 mmol H<sub>2</sub>/L.h e 120 mmol/L EtOH), as condições ótimas encontradas resultaram em pH 8,14 e 37°C.

Da mesma forma, a produção de 1,3-propanodiol em processos fermentativos - assim como a de outros metabólitos provenientes do glicerol - é bastante influenciada pelos parâmetros pH inicial e temperatura. Diversos trabalhos na literatura destacam a produção desse metabólito em pH variando de 6,5 a 7,5 e temperatura entre 30° e 37°C (HOMANN, 1990; BOENIGK, 1993; CHENG, 2007; ZHENG, 2008; MOON, 2011; HONG, 2013).

Através da Metodologia de Superfície de Resposta, Oh et al. (2008) avaliaram as melhores condições para otimização da produção de 1,3-PD, por meio de *Klebsiella pneumoniae*, utilizando glicerol bruto como substrato. O rendimento máximo de 1,3-PD (13,88 g/L) foi encontrado nas condições ótimas de pH e temperatura equivalentes a 7,37 e 36,88°C, respectivamente.



**Tabela 3.7:** Composição dos meios de cultura para produção de metabólitos a partir de glicerol reportados na literatura (continuação).

Referências	Glicerol (g/L)	Concentração (g/L)																		
		Fosfatos			Sulfatos				Cloretos						Compostos Orgânicos					
		K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	FeSO <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub>	MnSO <sub>4</sub>	NH <sub>4</sub> Cl	NiCl <sub>2</sub>	ZnCl <sub>2</sub>	CaCl <sub>2</sub>	NaCl	CuCl <sub>2</sub>	CoCl <sub>2</sub>	GLU	YE	AC. P- AMINOBENZÓICO	B7	B12
SATTAYAS AMITSATHI T et al (2011)	200,0	3,4	1,3	2,0	0,005	0,2	0,1		0,025	0,07	0,00 2		0,02	0,2			1,9 6			
SITTIJUND A et al (2012)	25,0	0,125		3,97		0,0025	0,1	0,015					0,005	0,00012 5						
VARRONE et al (2012)	15,0	3,4	1,3		2,0	0,005	0,2				0,02									
PFLÜGL et al (2012)	500,0	2,0					0,2	0,05							97,8	5,0			0,00 5	
OH et al (2013)	10,0 – 60,0	3,4	1,3		2,0	0,005	0,2	0,1	0,025	0,07	0,02		0,02	0,2	20,0	1,0				
LIU et al (2013)	7,0		1,0				0,1	0,015			0,01	0,01								
HONG et al (2013)	180,5	0,5	0,25		4,38	0,005	0,4	2,0		1,0	0,01 5	0,5		1,0						
REUGSANG et al (2013)	31,23	200,0						0,05	100,0	0,092	0,05	5,0	10,0	0,038	0,05	1,0	0,005	0,002	0,00 001	
CHOOKAE W et al (2014)	20,0	3,4	1,3			0,005	0,2	0,1	0,001		0,04 7			0,08		2,0				

\* Outros poucos compostos não listados aqui foram utilizados em alguns estudos.

### 3.6 Biorreatores utilizados na Fermentação do Glicerol

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

Para a fermentação do glicerol, a grande maioria dos trabalhos relata o uso de reatores descontínuos, em modo de operação em batelada, devido à facilidade de operação e controle dos mesmos. Como exemplo, Ito et al. (2005) avaliaram o efeito da concentração de glicerol na produção de  $H_2$ , EtOH e outros metabólitos, utilizando *Enterobacter aerogenes HU-101*. Os autores alcançaram um rendimento de  $H_2$  superior ao rendimento máximo teórico, correspondente a 1,12 mol/mol glicerol, ao utilizarem 1,7 g/L do substrato. Os outros subprodutos da fermentação também apresentaram um rendimento expressivo: 0,96 mol EtOH/mol glicerol, 0,2 mol acetato/mol glicerol, 0,2 mol 1,3-PD/mol glicerol e 0,14 mol formato/mol glicerol.

Embora a fermentação em batelada apareça como uma estratégia simples para a fermentação do metabólito desejado, esta sofre de problemas de limitação de substrato ao final da fermentação, juntamente com a inibição de produtos que são intrinsicamente envolvidos no processo de produção do metabólito de interesse. Assim, esse processo requer o uso de melhores estratégias de cultivo que proporcionam condições não-limitativas e não-inibidoras, melhorando a produtividade global da fermentação.

A relação inversa entre a concentração inicial de substrato e alta taxa de crescimento do microrganismo indica cultivo em batelada alimentada e pode ser utilizado de modo a alcançar uma elevada concentração e/ou produtividade do metabólito de interesse e minimizar problemas como a inibição do substrato.

Cheng et al. (2007) foram os pioneiros em reportar a produção de 1,3-Propanodiol, utilizando *K. pneumoniae*, em escala piloto. Os autores utilizaram um fermentador de três estágios e volume de 5000L para a produção de 1,3-PD em batelada alimentada. Os melhores resultados para esse sistema foram alcançados levando a uma produção de 58,8 g/L de 1,3-PD com um rendimento equivalente a 0,53 mol/mol Glicerol e produtividade de 0,92 g/L/h.

A abordagem usual para a eliminação da inibição do produto é a remoção do produto inibitório do caldo de fermentação por qualquer Reator Tubular Ideal (Plug Flow Reactor) ou Reator Contínuo de Mistura Perfeita (CSTR). Culturas contínuas oferecem uma vantagem distinta de alta produtividade, mas, geralmente, concentrações não muito elevadas de produtos são obtidas, principalmente, devido as elevadas taxas de alimentação e de retirada, o que torna o processamento posterior dificultado (KAUR et al., 2012).

Sistemas com crescimento bacteriano disperso, ou seja, sem imobilização de células, têm sido constantemente estudados por diversos autores, os quais relatam a aplicação de reatores anaeróbios de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB), de leito granular expandido (EGSB) e reator anaeróbio de agitação contínua (CSTR).

Chookaew et al. (2014) avaliaram a produção de hidrogênio a partir de glicerol bruto utilizando *Klebsiella* sp. TR17 em um Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente e Manta de Lodo (UASB). O reator foi operado em 40°C e pH entre 6,5 e 7,0. As variáveis do processo foram os diferentes tempos de detenção hidráulica (2 – 12h) e a concentração de glicerol (10, 20 e 30 g/L).

A diminuição do tempo de detenção hidráulica acarretou num aumento da taxa de produção e rendimento de H<sub>2</sub>. A máxima taxa de produção de 242,15 mmol H<sub>2</sub>/L/d e rendimento de 44,27 mmol H<sub>2</sub>/g glicerol consumido, foram alcançados no TDH de 4h e concentração de glicerol de 30 e 20 g/L, respectivamente. O principal metabólito obtido foi o 1,3-propanodiol no TDH de 12h para todas as concentrações de glicerol testadas no experimento, e o valor máximo obtido foi de 9,0 g/L na concentração de 20,0 g/L de glicerol.

Gallardo et al. (2014) produziram 1,3-Propanodiol a partir de glicerol residual em três reatores granulares de leito expandido (EGSB). O reator R1 foi inoculado com lodo granular, o R2 com lodo granular tratado termicamente e o R3 foi preenchido com lodo granular fragmentado. Os reatores foram operados a 37°C, pH ajustado a 6,8 e concentração de glicerol de 25,0 g/L. Avaliou-se a aplicação de diferentes TDH, iniciando em 24h e variando em 20, 12, 6 e 3h.

Como resultados, observou-se a conversão de glicerol em 1,3-PD em todos os reatores. Acetato e butirato foram constatados em baixas concentrações (<1,0 g/L), exceto no R2 no TDH de 12h (até 4,0 g/L) e no R1 no TDH de 6h (1,8 g/L). O

rendimento máximo (0,59 mol/mol) e produtividade (82 g/L/d) foram atingidos no R1 no tempo de detenção hidráulica de 12 e 3h, respectivamente.

Outra estratégia de operação considerada industrialmente importante é a imobilização de células. Ela oferece várias vantagens, como reutilização do biocatalisador, fácil processamento de produtos no efluente e operação contínua com alta densidade celular e altas taxas de reação resultantes, levando a altas produtividades (KAUR et al., 2012). Os reatores Anaeróbios de Leito Fixo e Leito Fluidificado, são considerados bons exemplos de sistemas com crescimento bacteriano aderido, e estão sendo bastante utilizados na fermentação do glicerol e de outras águas residuárias industriais.

Gonen et al. (2012) avaliaram o efeito de três diferentes meios suportes, espuma de poliuretano (PUF), esferas de vidro (GB) e pedra-pomes (PS), na imobilização de *Klebsiella pneumoniae* para a fermentação de glicerol bruto, em Reator Anaeróbio de Leito Fixo. Todos os biorreatores foram operados continuamente em diferentes TDH, variando entre 0,5 e 16h. Visando reforçar a imobilização da biomassa no meio suporte, o meio de cultura foi continuamente reciclado no reator durante uma semana, com uma taxa de diluição de  $0,05 \text{ h}^{-1}$  e temperatura fixa de  $37^{\circ}\text{C}$ .

A concentração máxima de 1,3-PD obtida (19,7 g/L) foi alcançada utilizando espuma de poliuretano no TDH de 8h. Por outro lado, os reatores que utilizaram esferas de vidro e pedra-pomes como meio suporte, obtiveram resultados semelhantes no TDH 50% menor. Observou-se ainda que a concentração de 1,3-Propanodiol aumentou (19,7; 18,4 e 19,0 g/L para PUF, PS e GB respectivamente) à medida que o TDH aumentava (4, 6 e 8h, respectivamente).

Estudos relacionados a aplicação de reatores Anaeróbios de Leito Fluidificado (RALF) no tratamento de águas residuárias sintéticas (AMORIM, 2009; BARROS & SILVA, 2012), águas residuárias complexas (SANTOS, 2014a; SANTOS, 2014b; SANTOS, 2014c; ROSA, 2014a; ROSA, 2014b; ROSA, 2014c), incluindo o glicerol (FERREIRA, 2014, NAZARETH, 2015) foram amplamente relatados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Controle Ambiental II do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos (LCAII/DEQ/UFSCar), os quais serão melhor pormenorizados no tópico subsequente.

### 3.7 Processos Fermentativos em Reator Anaeróbio de Leito Fluidificado

O Reator Anaeróbio de Leito Fluidificado (RALF) tem sido amplamente utilizado para o tratamento de águas residuárias e produção de biogás, devido a capacidade de favorecer a transferência de massa entre o meio e o biofilme. Além disso, possuem elevadas eficiências de remoção da matéria orgânica alcançadas com TDH relativamente baixos (SHIDA, 2008).

Os RALF são sistemas de tratamento que utilizam o princípio da fluidização para promover adequada transferência de massa entre o líquido a ser tratado e os microrganismos que atuarão na degradação da matéria orgânica. Consiste de um vaso cilíndrico contendo meio suporte inorgânico de pequeno tamanho, como areia, poliestireno, pneu triturado, cinasita, entre outros. Tais sistemas se caracterizam pela capacidade em reter grandes quantidades de biomassa. Portanto, mesmo com a aplicação de elevadas cargas hidráulicas no sistema, é possível manter um elevado tempo de retenção de sólidos. Dessa forma, o RALF é compacto, com volume bastante inferior ao reator anaeróbio de crescimento suspenso, mantendo-se, no entanto, com elevado grau de estabilização do lodo. Nesse tipo de reator, o meio é fluidificado pela velocidade ascendente do líquido criada pelas taxas de escoamento de alimentação e recirculação. A eficácia de separação do líquido, biogás e sólido, é garantida pela presença de um separador no topo do reator (BARROS, 2009).

Estudos envolvendo a produção de hidrogênio em reatores anaeróbios de leito fluidificado, utilizando água residuária sintética, foram reportados pelo grupo de pesquisa do LCAII/DEQ/UFSCar em anos anteriores. Amorim et al. (2009) avaliaram o efeito da adição de alcalinidade, da concentração da glicose e da taxa de carregamento orgânico na produção de  $H_2$  e ácidos orgânicos em RALF, utilizando argila expandida como material suporte. Os reatores foram inoculados com lodo anaeróbio pré-tratado termicamente, com TDH decrescente de 8h a 1h. A temperatura foi mantida constante em 30°C. A produção máxima de hidrogênio foi de 2,49 mol  $H_2$ / mol glicose no TDH de 2 horas.

Barros e Silva (2012) avaliaram a influência de diferentes materiais suportes – poliestireno (PS), pneu triturado e polietileno tereftalato (PET) – na produção de hidrogênio e etanol utilizando reatores anaeróbios de leito fluidificado e glicose como

substrato. Os reatores foram inoculados com lodo anaeróbio pré-tratado termicamente, com TDH decrescente de 8h a 1h, temperatura constante de  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$  e pH em cerca de 5,0 no afluente e 3,5 no efluente. A maior produção de  $\text{H}_2$  foi obtida utilizando-se o pneu triturado como material suporte (2,11 mols  $\text{H}_2$ / mol glicose) e, para o etanol, o PET se mostrou o material suporte mais adequado ( $1941,78 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

O sucesso com a água residuária sintética motivou o grupo a avaliar a produção de hidrogênio e outros metabólitos a partir de água residuária complexa, como exemplo vinhaça de cana-de-açúcar, soro de leite e manipueira.

Santos et al. (2014a) avaliaram o efeito da taxa de carreamento orgânico na produção de  $\text{H}_2$ , utilizando vinhaça como substrato, em dois reatores anaeróbios de leito fluidificado (RALF<sub>1</sub>: 15000 mg/L DQO; RALF<sub>2</sub>: 20000 mg/L DQO). A temperatura foi mantida constante em  $55^{\circ}\text{C}$  e o TDH variou decrescentemente de 6h a 1h. A máxima produção de  $\text{H}_2$  foi  $2,23 \text{ mmol } \text{H}_2 / \text{g DQO}$ , observada no reator contendo menor taxa de carreamento orgânico (TCO).

Santos et al. (2014b) avaliaram a produção de hidrogênio em RALF termofílico ( $55^{\circ}$ ), utilizando misturas de vinhaça e glicose com, aproximadamente, 5000 – 5300 mg/L DQO. Nesse estudo, o TDH variou de 8h a 1h. O rendimento máximo de  $\text{H}_2$  ( $5,73 \text{ mmol} / \text{g DQO}$ ) foi obtido no TDH de 4h, com TCO igual a  $52,7 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ . A máxima produção volumétrica de  $\text{H}_2$  ( $0,78 \text{ L } \text{H}_2 \text{ h}^{-1} \text{ L}^{-1}$ ) foi atingida ao utilizar somente vinhaça como fonte de carbono.

Santos et al. (2014c) avaliaram a produção de  $\text{H}_2$  em dois RALFs termofílicos ( $55^{\circ}\text{C}$ ), ao utilizar vinhaça diluída e vinhaça bruta como substratos (RALF<sub>1</sub>: 10000 mg/L DQO; RALF<sub>2</sub>: 30000 mg/L DQO). Ambos os reatores apresentaram resultados efetivos na produção de hidrogênio, no entanto, o reator contendo vinhaça diluída apresentou os melhores resultados ( $2,86 \text{ mmol } \text{H}_2 / \text{g DQO}$ ), em um TDH de 6h e uma TCO de  $40,0 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ .

Rosa et al. (2014a) avaliaram a produção de  $\text{H}_2$  e etanol, em diferentes proporções das fontes de carbono, ao utilizar glicose e soro de leite como substratos, em RALF mesofílico. A temperatura, o TDH e a concentração de substrato foram mantidos constantes em  $30^{\circ}\text{C}$ , 6 h e  $5,0 \text{ g DQO L}^{-1}$ , respectivamente. A máxima produção dos

metabólitos foi de 1,7 mmol H<sub>2</sub>/ g DQO e 3,45 mmol EtOH/ g DQO, utilizando soro de leite como único substrato.

Rosa et al. (2014b) avaliaram o efeito do tempo de detenção hidráulica (TDH) na produção de hidrogênio e etanol, utilizando soro de leite como substrato (5000 mg DQO / L), em RALF mesofílico. A temperatura foi mantida constante em 30°C e o TDH variou de 4h a 1h. A máxima produção de hidrogênio (1,33 mol H<sub>2</sub> / mol lactose) e de etanol (1,22 mol EtOH / mol lactose) foram obtidos no TDH de 4h.

Rosa et al. (2014c) avaliaram o efeito do TDH e das fontes de inóculo, na produção de H<sub>2</sub> e etanol, utilizando uma mistura de 50% DQO de manipueira e 50% DQO de glicose, em dois RALFs. O TDH variou de 10h a 2h e a temperatura se manteve constante em 30°C. O lodo proveniente do reator UASB destinado ao tratamento do efluente de matadouro resultou nos melhores resultados: 1,0 mmol H<sub>2</sub> / g DQO (10h) e 3,0 mmol EtOH / g DQO (6h), enquanto que o lodo proveniente do reator UASB destinado ao tratamento de efluentes de suinocultura resultou em 0,65 mmol H<sub>2</sub> / g DQO (6h) e 2,1 mmol EtOH / g DQO (10 e 8h).

Trabalhos recentes do grupo de pesquisa locado no LCAII/DEQ/UFSCar relatam a potencial aplicação de RALF na fermentação do glicerol bruto. Ferreira (2014) avaliou a influência do tempo de detenção hidráulica na produção de H<sub>2</sub>, a partir de glicerol bruto, em RALF termofílico. O TDH variou de 14h a 1h, a concentração foi fixada em 5 g/L de DQO e a temperatura mantida em 55°C. Os resultados mostraram que o maior rendimento e produtividade de H<sub>2</sub> foram alcançados no TDH de 1h, correspondendo a 3 mol H<sub>2</sub>/mol glicerol e 1508,7 mL/L.h, respectivamente. Entre os TDH de 14 a 2h, houve a predominância dos metabólitos 1,3-PD, EtOH, HAc e H<sub>2</sub>Bu. No entanto, ao reduzir o TDH para 1h, a produção de etanol cessou e a produção de H<sub>2</sub>Pr foi favorecida.

Nazareth (2015) avaliou a produção de H<sub>2</sub>Pr, 1,3-PD e H<sub>2</sub>, em RALF mesofílico contendo pneu triturado como material suporte. O TDH variou entre 8h e 0,5h, a concentração de glicerol foi fixada em 5,0 g/L e a temperatura em 30°C. Os resultados obtidos mostram que os principais metabólitos produzidos foram o H<sub>2</sub>Pr e o 1,3-PD, com rendimentos máximos de 1,77 e 0,82 mol/mol glicerol, no TDH de 8h.

### 3.8 Considerações Preliminares

Diante do cenário atual, a produção brasileira de biodiesel está cada vez mais promissora. Essa situação pode acarretar no acúmulo de glicerol no meio ambiente, se nenhuma providência quanto à correta destinação for tomada. Dessa forma, a utilização do glicerol em processos fermentativos para a obtenção de produtos de interesse tem sido uma alternativa atrativa para o mesmo, visto que os processos de purificação desse resíduo possuem custos elevados.

Além disso, a aplicação do glicerol como substrato na fermentação resultaria em produtos de interesse mais baratos, uma vez que o aumento da oferta de glicerol seguida da baixa demanda do mercado já resultou na queda do preço desse resíduo. Sendo assim, novos usos para o glicerol são necessários para estabilizar o preço e a oferta de biodiesel e do seu subproduto, além de evitar o acúmulo de um material que possui um impacto ambiental negativo.

Diante disso, o presente trabalho consiste na aplicação do glicerol em processos fermentativos contínuos para produção de subprodutos de valor agregado, como solventes e intermediários químicos, além da co-geração de energia na forma de hidrogênio. No entanto, além de simplesmente aplicar esse resíduo em um processo, é necessário otimizar esse processo, de forma a futuramente reduzir o tempo e o custo de produção desses produtos.

A configuração do reator (RALF) e a utilização do inóculo proveniente de estação de tratamento de efluente de abatedouro de aves, bem como a aplicação de um resíduo abundante e de baixo custo, vão de acordo com a ideia de redução do custo de produção. De acordo com a literatura, o RALF apresenta um potencial elevado para a produção de metabólitos em processos fermentativos, além de conseguir acumular grande quantidade de biomassa no sistema e facilitar a transferência de massa entre o substrato e o microrganismo.

Frente à escassez de pesquisas envolvendo a otimização de produtos a partir da fermentação do glicerol em reatores contínuos, este trabalho tem o intuito de contribuir para o desenvolvimento de pesquisas relacionadas com a produção contínua e otimizada de álcoois, ácidos orgânicos e hidrogênio a partir desse resíduo.

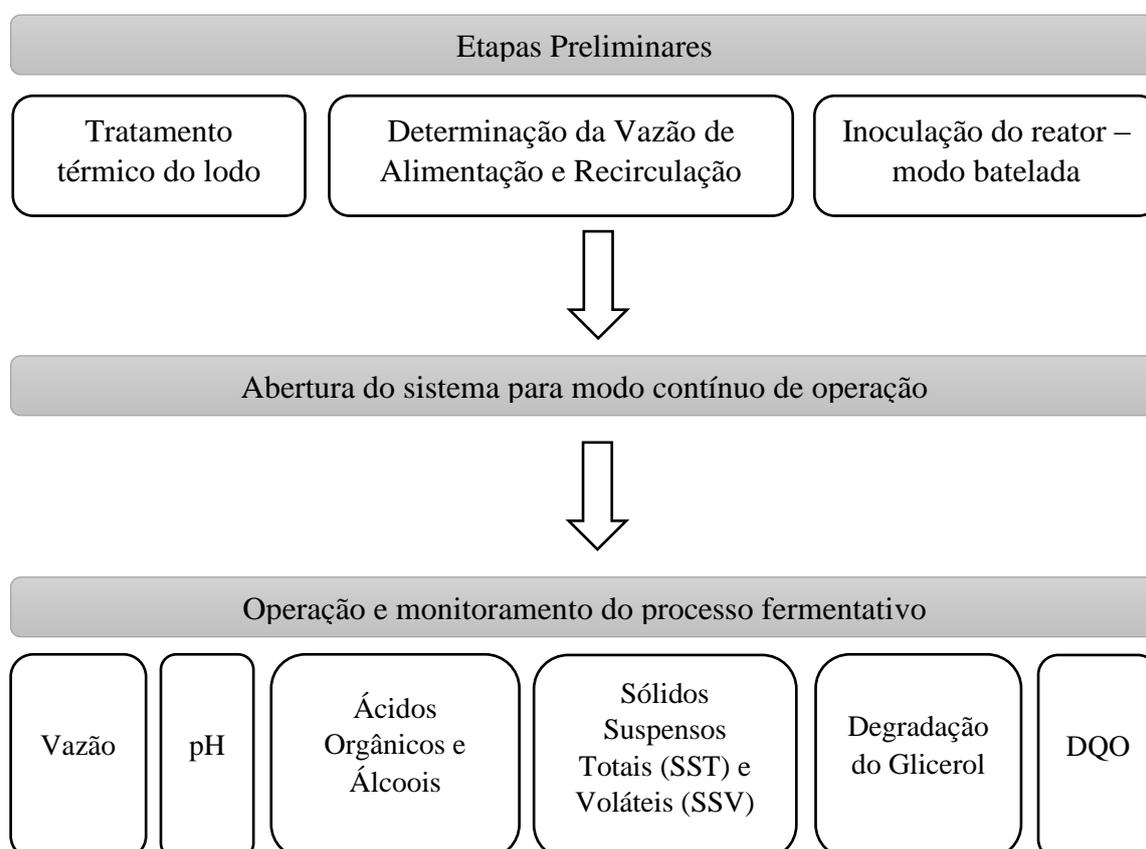
## CAPÍTULO 4

### MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo estão apresentadas todas as estratégias e metodologias utilizadas durante o desenvolvimento desse trabalho. A abordagem vai desde o planejamento experimental, confecção dos reatores, procedimento analítico, “layout” operacional, obtenção dos substratos até o preparo do afluente. São apresentadas também as etapas iniciais de operação dos reatores e variáveis analisadas em cada fase de operação. Na Figura 4.1 está apresentado um resumo do procedimento operacional dos reatores.

Objetivando-se otimizar a produção de hidrogênio, 1,3-propanodiol, etanol e ácido propiônico, os reatores foram operados em condições mesofílicas (30°C), tendo cinasita como material suporte para a adesão da biomassa e glicerol bruto ou glicerina pura como fonte de carbono. Lodo proveniente de um reator UASB utilizado para tratar efluente de abatedouro de aves foi aplicado como inóculo em todos os reatores.

**Figura 4.1:** Fluxograma das etapas operacionais dos reatores.



Para melhor entendimento e praticidade ao longo da apresentação da metodologia e discussão dos respectivos resultados, os reatores foram identificados por siglas, conforme é mostrado a seguir:

RM – Reator mesofílico alimentado com glicerol bruto para otimização do TDH e concentração de substrato.

RGB – Reator alimentado com glicerol bruto e meio de cultura otimizado.

RGP – Reator alimentado com glicerina pura e meio de cultura otimizado.

É importante salientar que para a melhor execução do trabalho proposto, o reator RM foi constituído por dois reatores idênticos, denominados RM1 e RM2. Essa divisão se fez necessária uma vez que o monitoramento de cada condição operacional do reator ocorre em um longo período de tempo, o que impossibilitaria a utilização de somente um reator. Dessa forma, a estratégia de operação adotada possibilitou a realização do trabalho em tempo hábil.

#### 4.1 Reator Anaeróbio de Leito Fluidificado (RALF)

Para a realização desse trabalho foram utilizados quatro Reatores Anaeróbios de Leito Fluidificado (RALF) confeccionados em acrílico transparente. As dimensões e respectivos volumes dos reatores é mostrada na Tabela 4.1.

**Tabela 4.1:** Dimensões e volumes dos RALFs utilizados.

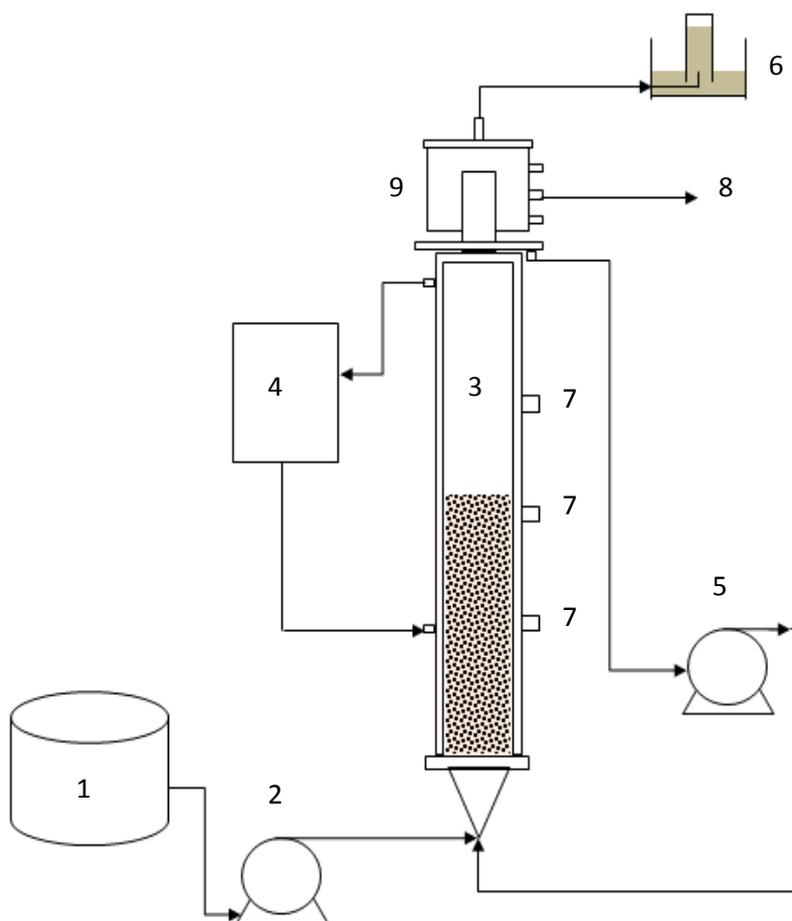
Reatores	Altura (cm)	Diâmetro (cm)	interno	Volume (cm <sup>3</sup> )
RM	191,0	5,0		3750,3
RGB	151,5	3,6		1542,1
RGP	151,5	3,4		1375,5

A temperatura de  $30^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$  foi mantida com o auxílio de banho termoestabilizado e encamisamento do reator. Na alimentação dos reatores foram utilizadas bombas

dosadoras e, para a recirculação, fez-se o uso de bomba diafragma, com vazão fixada em 1,3 vezes a velocidade de mínima fluidização ( $V_{mf}$ ) do material suporte.

A Figura 4.2, apresenta um esquema da composição do sistema fermentativo: (1) Tanque de água residuária (afluente), (2) bomba de alimentação do afluente, (3) reator de leito fluidificado, (4) banho termostatzado, (5) bomba de recirculação, (6) saída para medição e análise de gases (7) amostradores (8) saída do efluente (9) compartimento de separação gás-líquido.

**Figura 4.2:** Esquema do Reator Anaeróbico de Leito Fluidificado (RALF)



## 4.2 Material Suporte

O material suporte utilizado para garantir a adesão dos microrganismos dentro dos reatores foi a cinasita (argila expandida), mostrada na Figura 4.3. A justificativa para a escolha da cinasita como material suporte se dá pelas melhores características de superfície apresentadas por esse material para a fixação da biomassa. Na Tabela 4.2 encontram-se as características físicas da cinasita utilizada nos reatores.

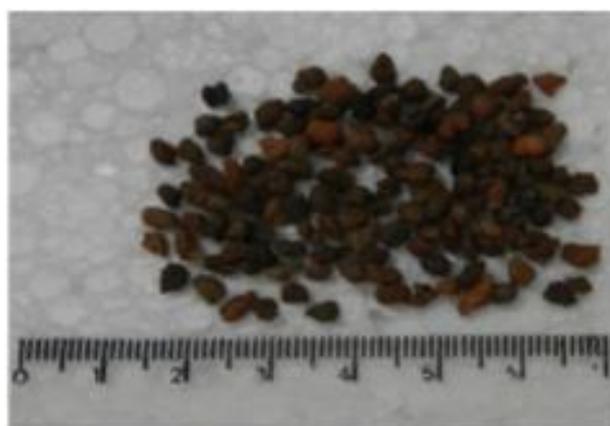
Além disso, trabalhos realizados pelo grupo de pesquisa do LCAII/DEQ/UFSCar (BARROS et al., 2010 e BARROS & SILVA, 2012) relataram alto rendimento de hidrogênio e maior quantidade de biomassa aderida, ao utilizar argila expandida, quando comparado com outros tipos de materiais suporte, como poliestireno, polietileno e pneu triturado, por exemplo.

**Tabela 4.2:** Propriedades da cinasita

Dimensão (mm)	Densidade (g.cm <sup>3</sup> )	Porosidade	V <sub>mf</sub> (cm.s <sup>-1</sup> )
2,8 – 3,35	1,50	23%	1,24

Fonte: Amorim et al. (2009)

**Figura 4.3:** Material suporte (cinasita).



Fonte: Ferreira (2014)

### 4.3 Meio Nutricional

Durante toda a operação dos reatores, o sistema foi alimentado com água residuária sintética composta por glicerol, cujas concentrações serão detalhadas posteriormente, meio nutricional proposto por Barbirato et al. (1995) e solução de elementos traços SL7, proposta por Biebl & Pfennig (1981), na concentração de 2mL SL7 / L afluente. Os componentes do meio nutricional estão listados na Tabela 4.3 e a solução SL7 é apresentada na Tabela 4.4.

**Tabela 4.3:** Composição do meio nutricional

<b>Composto</b>	<b>Concentração (g.L<sup>-1</sup>)</b>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O	3,4
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,3
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,0
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,02
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,005

Fonte: Barbirato et al. (1995)

**Tabela 4.4:** Composição da Solução de Elementos Traços SL7

<b>Composto</b>	<b>Concentração (mg.L<sup>-1</sup>)</b>
ZnCl <sub>2</sub>	70,0
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	100,0
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	60,0
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	200,0
CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	20,0
NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	20,0
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	40,0
HCl (25%, v/v)	1 mL

Fonte: Biebl & Pfennig (1981)

#### 4.4 Água Residuária

O substrato utilizado nesta pesquisa é o glicerol bruto bidestilado e a glicerina pura. O resíduo é proveniente da indústria Biobrotas Oleoquímica, localizada na cidade de Brotas / SP. As características das soluções preparadas de glicerol bruto e da glicerina pura, utilizadas no presente trabalho, são mostradas nas Tabela 4.5.

**Tabela 4.5:** Caracterização das soluções de glicerol bruto e glicerina pura (~5,0 g/L).

Parâmetros	Valores (mg/L)	
	Glicerol Bruto	Glicerina Pura
Teor de Glicerol (%)	82,6	91,5
DQO	5330,0	4610,0
Carbono Orgânico Total	ND	ND
Cobre	0,005	ND
Zinco	0,2	ND
Magnésio	0,3	ND
Cálcio	363,3	ND
Potássio	3,0	ND
Fosfato	2,5	ND
Metanol	33,6	ND
Nitrogênio Kjeldahl	73,0	ND

ND: Não detectado

As concentrações de glicerol e as respectivas modificações no afluente aplicadas aos reatores serão melhor pormenorizadas nos tópicos subsequentes.

#### 4.5 Inóculo

Todos os reatores utilizados nesse trabalho foram inoculados com lodo proveniente de reator mesofílico anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB) utilizado para tratamento de efluente de abatedouro de aves (Avícola Dakar

S/A, Tietê/SP). De acordo com Delforno (2014) este lodo apresenta uma extensa diversidade microbiana, o que possibilita o seu uso com diferentes substratos, por exemplo, soro de queijo (ROSA et al., 2014), vinhaça (LÁZARO et al., 2014), água de lavanderia (DELFORNO, 2014), glicerol (NAZARETH, 2015), dentre outros.

Para inibir o desenvolvimento das bactérias metanogênicas consumidoras de hidrogênio, o lodo passou por um tratamento térmico que, de acordo com Kim et al. (2006), consiste no aquecimento do mesmo a uma temperatura de 90°C durante dez minutos, seguido de choque térmico até atingir 25°C. Com esse tratamento, garantiu-se um inóculo propício para a produção de hidrogênio.

#### **4.6 Procedimento de partida dos Reatores**

A partida, start up, de todos os reatores aconteceu de maneira similar. Os barriletes contendo o afluente foram constituídos do glicerol e do meio nutricional em concentrações previamente estabelecidas, e do lodo tratado na concentração 7% (v/v).

Após o preparo dos barriletes, o pH foi ajustado a 4,5 adicionando pequenas alíquotas de HCl 30%. Além disso, gás nitrogênio foi adicionado no barrilete e no topo do reator durante 10 minutos, afim de remover o oxigênio dissolvido no líquido e garantir a anaerobiose do sistema.

Após a conexão dos barriletes aos respectivos reatores, estes foram operados inicialmente em modo batelada com recirculação do efluente. Este procedimento inicial se fez necessário para garantir a adesão da biomassa ao material suporte bem como a ambientação da cultura ao substrato empregado. Durante o período de recirculação, a concentração de glicerol foi periodicamente monitorada e o pH foi medido de maneira intermitente, para assegurá-lo em faixa imprópria ao desenvolvimento das bactérias metanogênicas. Após notar a adaptação da biomassa ao substrato empregado e verificar o consumo de glicerol no barrilete, o sistema foi aberto, passando então a operar em modo contínuo.

## 4.7 Condições Operacionais

Neste tópico serão detalhadas todas as metodologias referentes ao planejamento experimental utilizado, bem como as condições impostas aos reatores para alcançar os objetivos propostos. Para facilitar o entendimento do leitor, esse tópico foi dividido entre os dois estudos desenvolvidos e descritos nessa dissertação. O primeiro deles – Estudo A – aborda a otimização do meio de cultura e posterior aplicação em reatores contínuos e, o segundo – Estudo B – aborda a otimização de parâmetros operacionais do sistema, como concentração de glicerol e TDH.

A avaliação das respostas se deu por intermédio de aspectos operacionais, como TDH ou concentração de substrato ou ambos. O período em que determinado aspecto operacional era avaliado se denominava como fase. A mudança de uma fase para outra era executada quando fosse percebida uma certa estabilidade nos parâmetros de interesse, como produção de  $H_2$  e consumo de substrato.

### 4.7.1 *Estudo A: Otimização do meio de cultura e aplicação em reatores contínuos*

Nos reatores contínuos RGB e RGP foi aplicado o meio de cultura otimizado que melhor favoreceu a produção de hidrogênio. Para tanto, foi realizado um estudo preliminar de otimização desse meio de cultura, que consistiu em experimentos em batelada, traçados por um Delineamento Experimental.

O planejamento experimental foi desenvolvido segundo Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) e analisados através do software Statística 10.0 (StatSoft Inc. 2010, USA). O desenvolvimento da metodologia referida acima e as etapas do planejamento experimental são explicitados no item 4.7.1.1. A aplicação do meio de cultura otimizado nos reatores contínuos RGB e RGP se deu conforme as condições operacionais descritas no item 4.7.1.2.

Todos os experimentos realizados para otimização da produção dos metabólitos foram conduzidos em batelada. Para tanto, foram utilizadas garrafas de vidro (Duran®) de 136mm de diâmetro, volume total de 2,0 L e volume útil de 1,0 L, contendo 100,0 mL do meio de cultura e inóculo, e 900,0 mL da solução de glicerol bruto na

concentração previamente determinada. Gás nitrogênio foi purgado no interior dos frascos para assegurar as condições anaeróbias. Em todos os frascos o pH foi ajustado em  $6,72 \pm 0,02$ , com o auxílio de solução de HCl 30% e/ou solução de NaOH 6M. Os frascos foram mantidos em uma incubadora de temperatura controlada a 37°C sob agitação de 200 rpm por 168 horas. A cada 24h, as análises descritas no item 4.8 foram realizadas para monitoramento do crescimento da população microbiana e consequente produção de metabólitos.

#### 4.7.1.1 Planejamento Experimental aplicado na otimização do Meio de Cultura

##### 4.7.1.1.1 Delineamento Plackett - Burman (PB)

O delineamento Plackett - Burman foi utilizado para selecionar e identificar as variáveis que possuem uma influência significativa na bioconversão do glicerol bruto em H<sub>2</sub>. O Planejamento do tipo Plackett-Burman é baseado em uma equação polinomial de primeira ordem, como mostrada pela equação (12).

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i \quad (12)$$

Em que Y representa a resposta,  $\beta_0$  a constante,  $\beta_i$  o coeficiente do efeito linear e  $x_i$  é o nível codificado da variável  $X_i$ .

As variáveis testadas foram codificadas de acordo com a equação (13):

$$x_i = \left( \frac{X_i - X_0}{\Delta X_i} \right) \quad (13)$$

Em que  $x_i$  é o valor codificado e  $X_i$  é o valor real da variável independente,  $X_0$  é o valor real do ponto central e  $\Delta X_i$  é o valor da diferença entre os pontos.

Nesse estudo, quatro variáveis ( $X_1$  – Glicerol;  $X_2$  – KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>;  $X_3$  – Extrato de Levedura;  $X_4$  – Vitamina B12) foram investigadas em 8 experimentos e 4 repetições no ponto central. Baseado no delineamento Plackett-Burman, cada variável é representada por dois níveis, sendo (-1) o menor nível e (+1) o maior. O intervalo e o nível das respectivas variáveis independentes do processo são mostrados na Tabela 4.6. A

resposta avaliada para essa etapa foi a Produção Acumulada de Hidrogênio (PAH<sub>2</sub>), dada em mL H<sub>2</sub> / L. Variáveis com níveis maiores de 90% de confiança foram consideradas significativas na produção de H<sub>2</sub>. Os critérios empregados para a escolha das mesmas, e seus respectivos valores, foram os estudos prévios na literatura.

**Tabela 4.6:** Valores das variáveis do planejamento do tipo Plackett-Burman e seus respectivos níveis codificados.

<b>Código</b>	<b>Variáveis</b>	<b>(-1) (g/L)</b>	<b>(0) (g/L)</b>	<b>(+1) (g/L)</b>
X <sub>1</sub>	Glicerol	5,0	15,0	25,0
X <sub>2</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5	1,0	1,5
X <sub>3</sub>	Extrato de Levedura	0,5	1,5	2,5
X <sub>4</sub>	Vitamina B12	0,0	0,0025	0,005

#### 4.7.1.1.2 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Após seleção das três variáveis significativas pelo delineamento Plackett-Burman, aplicou-se o DCCR como etapa de otimização do processo. Para tanto, foi realizado um fatorial 2<sup>3</sup>, incluindo os 6 pontos axiais e 2 repetições no ponto central, totalizando 16 ensaios experimentais.

A Tabela 4.7 apresenta os níveis das respectivas variáveis independentes do processo: X<sub>1</sub> – Glicerol; X<sub>2</sub> – KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e X<sub>3</sub> – Vitamina B12. O intervalo e os valores escolhidos no DCCR basearam-se nas condições que resultaram em maiores produções de hidrogênio obtidas pelo delineamento PB. As respostas avaliadas foram: HY – Rendimento de H<sub>2</sub> (mmol H<sub>2</sub> / mol glicerol consumido) e EtOHY – Rendimento de Etanol (mmol Etanol / mol glicerol consumido).

**Tabela 4.7:** Valores das variáveis do planejamento do tipo DCCR e seus respectivos níveis codificados.

<b>Código</b>	<b>Variáveis</b>	<b>-1,682</b>	<b>-1</b>	<b>0</b>	<b>+1</b>	<b>+1,682</b>
X <sub>1</sub>	Glicerol (g.L <sup>-1</sup> )	19,28	22,00	26,00	30,00	32,72
X <sub>2</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g.L <sup>-1</sup> )	1,33	1,50	1,75	2,00	2,17
X <sub>3</sub>	B12 (g.L <sup>-1</sup> )	0,0066	0,0070	0,0075	0,0080	0,0083

O planejamento do tipo DCCR é baseado em uma equação polinomial de segunda ordem para as variáveis estudadas, como apresentado pela equação (14):

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ij} x_i x_j + \sum \beta_{ii} x_i^2 \quad (14)$$

Em que Y representa a resposta,  $\beta_0$  a constante,  $\beta_i$  o coeficiente do efeito linear,  $\beta_{ii}$  o coeficiente do efeito quadrático,  $\beta_{ij}$  o coeficiente da interação dos efeitos,  $x_i$  e  $x_j$  o nível codificado das variáveis  $X_i$  e  $X_j$ . A equação quadrática (6) foi usada para grafar as superfícies de resposta para as variáveis. As variáveis testadas foram codificadas de acordo com a equação (13), descrita no item anterior.

#### 4.7.1.2 Aplicação do meio de cultura otimizado aos reatores contínuos RGB e RGP

Após otimização do meio de cultura, objetivou-se potencializar a produção de H<sub>2</sub> em reatores contínuos. Dessa forma, a produção de hidrogênio e metabólitos foi avaliada em quatro TDHs diferentes, variando de 36h a 12h.

O reator RGB foi alimentado com glicerol bruto na concentração definida pelo Planejamento Experimental (26,45 g/L). O reator RGP, por sua vez, foi alimentado com glicerina pura, na concentração de 13,22 g/L, correspondente à metade daquela definida pelo Planejamento Experimental. Diferente do proposto pelo presente trabalho, a estratégia de reduzir pela metade a concentração inicial de glicerina no reator RGP, se fez necessária uma vez que o mesmo não apresentou consumo de substrato na concentração definida de 26,45 g/L.

O meio nutriente utilizado baseou-se no proposto por Barbirato et al. (1995) e foi adaptado de acordo com as concentrações estabelecidas pelo planejamento experimental descrito no item 4.7.1.1. O pH do afluente foi ajustado em 5,0. A Tabela 4.8 apresenta os aspectos operacionais avaliados nestes reatores.

**Tabela 4.8:** Condições operacionais do RGB e RGP.

Reator	Fase	Glicerol (g.L <sup>-1</sup> )	TDH (h)	TCO teórica (kg.m <sup>-3</sup> .dia <sup>-1</sup> )
<b>RGB</b>	1	26,45*	36	17,6
	2	26,45*	28	22,7
	3	26,45*	20	31,7
	4	26,45*	12	52,9
<b>RGP</b>	1	13,22	36	8,8
	2	13,22	28	11,3
	3	13,22	20	15,9
	4	13,22	12	26,4

\*Concentração de Glicerol definida no Planejamento Experimental.

#### 4.7.2 *Estudo B: Otimização de parâmetros operacionais em reator contínuo RALF.*

No reator contínuo RM foi realizado um estudo de otimização da concentração de Glicerol e do TDH que resultam no máximo consumo de substrato, rendimento e conteúdo de Hidrogênio. Para tanto, o planejamento experimental baseou-se na Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) com Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). Os resultados foram analisados com auxílio do software Statistica 10.0 (StatSoft Inc. 2010, USA).

O intervalo e nível das respectivas variáveis independentes do processo, Concentração de Glicerol ( $X_1$ ) e TDH ( $X_2$ ), são mostrados na Tabela 4.9. As respostas avaliadas serão:  $Y_1$  – Consumo de Glicerol (CG), dado em %;  $Y_2$  – Carga Orgânica Volumétrica Removida (COVR), dado em g/L.h;  $Y_3$  – Conteúdo de  $H_2$  no biogás (% $H_2$ ), dado em %; e  $Y_4$  - Rendimento de  $H_2$  (HY), dado em mol  $H_2$  / mol glicerol consumido.

A influência das variáveis no processo de produção de H<sub>2</sub> e metabólitos foi avaliada utilizando-se Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) constituído por um fatorial 2<sup>2</sup>, incluindo 4 pontos axiais e 2 pontos centrais, totalizando 10 ensaios.

**Tabela 4.9:** Valores das variáveis do planejamento do tipo DCCR, aplicado ao reator RM, e seus respectivos níveis codificados.

<b>Código</b>	<b>Variáveis</b>	<b>-1,414</b>	<b>-1</b>	<b>0</b>	<b>+1</b>	<b>+1,414</b>
X <sub>1</sub>	Glicerol (g.L <sup>-1</sup> )	2,9	5,0	10,0	15,0	17,1
X <sub>2</sub>	TDH (h)	0,76	2	5	8	9,24

A equação polinomial de 2<sup>a</sup> ordem (Equação 14), descrita no item 4.7.1.1.2 deste capítulo, foi usada para grafar as superfícies de resposta para as variáveis. As variáveis testadas foram codificadas de acordo com a equação (13), descrita no item 4.7.1.1.1.

Os 10 ensaios experimentais propostas pelo DCCR estão apresentados na Tabela 4.10. O afluente do reator RM teve a concentração de glicerol e o TDH variando entre 2,9 e 17,1 g.L<sup>-1</sup> e 0,76 e 9,24h, respectivamente, conforme exposto na Tabela 4.6. O pH de entrada esteve em torno de 6,0 para os dois reatores.

Ressalta-se novamente, que para a melhor execução do trabalho proposto em tempo hábil, os 10 ensaios experimentais definidos pela matriz do DCCR apresentada na Tabela 4.10, foram subdivididos entre os reatores idênticos RM1 e RM2. Essa divisão se fez necessária uma vez que o monitoramento das fases do reator ocorre em um longo período de tempo, o que impossibilitaria a utilização de somente um reator. Sendo assim, cada reator passou a operar em 5 fases, ou 5 condições operacionais, conforme apresentado na Tabela 4.11.

**Tabela 4.10:** Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Ensaio	Glicerol (g.L <sup>-1</sup> )		TDH (h)	
	X <sub>1</sub> (g.L <sup>-1</sup> )	x <sub>1</sub>	X <sub>2</sub> (h)	x <sub>2</sub>
1	5,0	-1	2	-1
2	15,0	1	2	-1
3	5,0	-1	8	1
4	15,0	1	8	1
5	2,9	-1,414	5	0
6	17,1	1,414	5	0
7	10,0	0	0,76	-1,414
8	10,0	0	9,24	1,414
9	10,0	0	5	0
10	10,0	0	5	0

**Tabela 4.11:** Condições operacionais dos reatores RM1 e RM2.

Reator	Fase	Ensaio	Glicerol (g.L <sup>-1</sup> )	TDH (h)	TCO teórica (kg.m <sup>-3</sup> .dia <sup>-1</sup> )
RM1	1	9	10,0	5	48,00
	2	3	5,0	8	15,00
	3	5	2,90	5	13,92
	4	1	5,0	2	60,00
	5	7	10,0	0,76	315,00
RM2	1	6	17,1	5	82,08
	2	4	15,0	8	45,00
	3	10	10,0	5	48,00
	4	8	10,0	9,24	25,97
	5	2	15,0	2	180,00

## 4.8 Métodos Analíticos

### 4.8.1 *Composição do Biogás*

A análise de composição do biogás produzido foi realizada por Cromatografia Gasosa. Para tanto, utilizou-se uma seringa *gas tight* para retirar 1,0 mL de amostra da fase gasosa no topo do reator. O gás coletado foi analisado em cromatógrafo marca Shimadzu modelo GC-2010 equipado com detector de condutividade térmica (TCD) e coluna capilar Carboxen 1010 PLOT (30 m x 0,53 mm) Sigma-Aldrich. As temperaturas do injetor, coluna e detector foram mantidas em 220°, 130° e 230°C, respectivamente. O gás de arraste utilizado foi o argônio, com vazão de 5,66 mL.min<sup>-1</sup>.

### 4.8.2 *Determinação da Concentração de Glicerol*

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

### 4.8.3 *Análises Físico-Químicas*

A Demanda Química de Oxigênio (DQO), Sólidos Suspensos Voláteis (SSV) e Totais (SST) e pH, foram analisados com base no Standart Methods for Examination of Water and Wastewater (1998).

### 4.8.4 *Medida de produção volumétrica do biogás*

A produção volumétrica do biogás gerado foi realizada de acordo com Walker et al. (2009), em que a contabilização é de acordo com o deslocamento da coluna de líquido contendo solução salina acidificada.

#### 4.8.5 Determinação de Álcoois e Ácidos Orgânicos Voláteis

A determinação e quantificação de álcoois e ácidos orgânicos voláteis foi realizada através de Cromatografia Gasosa, segundo método por *headspace*, com sistema acoplado amostrador automático de injeção de amostras. O gás coletado do *headspace* foi analisado em cromatógrafo marca Shimadzu modelo GC-17A equipado com detector de ionização de chama (FID, *Flame Ionization Detector*) e coluna capilar DB-WAX, de 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, com Hidrogênio como gás de arraste.

As condições cromatográficas utilizadas foram as seguintes:

- Rampa de Temperatura: 35°C (0') 2°C/min 42°C (0') 20°C/min 75°C (0') 35°C/min 120°C (1') 10°C/min 170°C (2').
- Temperatura do Injetor / Detector: 250°C / 280°C
- Razão de Split: 10,0
- Vazão do gás de arraste (H<sub>2</sub>): 50 mL/min
- Vazão do make-up ou gás auxiliar (N<sub>2</sub>): 35 mL/min
- Vazão do gás de chama (Ar sintético): 500 mL/min
- Vazão da coluna: 1,56 mL/min
- Velocidade linear: 34,3 cm/s

#### 4.9 Frequência das Análises

O reator RM foi monitorado por 251 dias de operação, enquanto que o RGB e RGP foram operados durante 51 dias. Os experimentos em batelada tiveram duração de 7 dias (168h) cada, sendo diariamente monitorados. A Tabela 4.12 mostra a frequência das análises realizadas durante esses períodos para os RALFs e para os ensaios em batelada.

**Tabela 4.12:** Frequência de análise de monitoramento dos reatores e dos ensaios em batelada.

Análise	Frequência		Metodologia
	RALF	Batelada	
pH	Diária	Diária	Standard Methods (1998)
Vazão	Diária	-	-
Glicerol bruto	3x/semana	Diária	Bondioli e DellaBella (2005)
DQO	3x/semana	Diária	Standard Methods (1998)
Ácidos Orgânicos Voláteis	3x/semana	Diária	Shimadzu GC-17A
Conteúdo do biogás (H <sub>2</sub> e CO <sub>2</sub> )	3x/semana	Diária	Shimadzu GC-2010
Produção de H <sub>2</sub>	3x/semana	Diária	Walker et al. (2009)
ST, SST, SSV	3x/semana	-	Standard Methods (1998)

## CAPÍTULO 5

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 5.1 Estudo A: Otimização do meio de cultura e aplicação em reatores contínuos

Neste tópico foram abordados os resultados do planejamento experimental proposto para otimização do meio de cultura, bem como a aplicação do meio fermentativo otimizado em reatores anaeróbios de leite fluidificado operados em modo contínuo. Dessa forma, a divisão do tópico entre essas duas partes supracitadas se fez necessário para o melhor entendimento do leitor.

##### 5.1.1 *Otimização do Meio de Cultura*

###### 5.1.1.1 Delineamento Plackett-Burman

O meio de cultura desempenha um papel fundamental no crescimento celular microbiano e na bioconversão do substrato. A relativa significância de quatro componentes do meio de cultura – glicerol,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , extrato de levedura e vitamina B12 – na bioconversão do glicerol bruto em  $\text{H}_2$  foi elucidada utilizando delineamento Plackett-Burman. A Tabela 5.1 demonstra a matriz experimental construída pelo delineamento Plackett-Burman para os 11 experimentos e a correspondente Produção Acumulada de Hidrogênio ( $\text{PAH}_2$ ), em  $\text{mL H}_2/\text{L}$ , para cada ensaio. A Tabela 5.2 apresenta os detalhes do modelo linear obtido utilizando-se essa metodologia.

É possível notar, por meio da Tabela 5.1, que a máxima resposta foi obtida no ensaio 7, atingindo a produção acumulada correspondente a  $23,13 \text{ mL H}_2/\text{L}$ , ao final de 168h de fermentação. A grande variação na resposta,  $0,64 \text{ mL H}_2 / \text{L}$  a  $23,13 \text{ mL H}_2 / \text{L}$ , reflete a necessidade de se otimizar os ensaios para alcançar maiores produções de hidrogênio.

A Tabela 5.2 mostra as análises estatísticas das variáveis testadas para a produção de hidrogênio. Ressalta-se que, quando o efeito da variável tiver sinal positivo, a sua influência na resposta analisada é maior em um nível elevado (+1), no entanto, quando o efeito for negativo, a variável no seu menor nível (-1) terá mais importância na resposta. Para este trabalho, variáveis com níveis maiores de 90% de confiança ( $P < 0,1$ ) foram consideradas significativas na produção de  $\text{H}_2$ .

**Tabela 5.1:** Matriz PB com as quatro variáveis independentes e a respectiva resposta, Produção Acumulada de Hidrogênio – PAH<sub>2</sub> (mL H<sub>2</sub> / L)

Ensaio	Glicerol		KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		Extrato de Levedura		Vitamina B12		PAH <sub>2</sub> (mL H <sub>2</sub> / L)
	X <sub>1</sub> (g/L)	x <sub>1</sub>	X <sub>2</sub> (g/L)	x <sub>2</sub>	X <sub>3</sub> (g/L)	x <sub>3</sub>	X <sub>4</sub> (g/L)	x <sub>4</sub>	
1	25,00	1	1,50	1	2,50	1	0,000	-1	1,37
2	5,00	-1	1,50	1	2,50	1	0,005	1	1,62
3	5,00	-1	0,50	-1	2,50	1	0,005	1	0,87
4	25,00	1	0,50	-1	0,50	-1	0,005	1	0,72
5	5,00	-1	1,50	1	0,50	-1	0,000	-1	0,94
6	25,00	1	0,50	-1	2,50	1	0,000	-1	0,68
7	25,00	1	1,50	1	0,50	-1	0,005	1	23,13
8	5,00	-1	0,50	-1	0,50	-1	0,000	-1	0,64
9 (PC)	15,00	0	1,00	0	1,50	0	0,0025	0	7,00
10 (PC)	15,00	0	1,00	0	1,50	0	0,0025	0	11,76
11 (PC)	15,00	0	1,00	0	1,50	0	0,0025	0	9,41

**Tabela 5.2:** Detalhes do modelo linear construído utilizando delineamento PB.

<b>Código</b>	<b>Variável</b>	<b>Menor Nível (g/L)</b>	<b>Maior Nível (g/L)</b>	<b>Efeito</b>	<b>Coefficiente</b>	<b>Valor F</b>	<b>p-valor (Prob &gt; F)</b>
<b>X<sub>1</sub></b>	Glicerol	5,00	25,00	5,45750	2,72875	10,51576	0,083375
<b>X<sub>2</sub></b>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,50	1,50	6,03750	3,01875	12,86967	0,069679
<b>X<sub>3</sub></b>	Extrato Levedura	0,50	2,50	-5,22250	-2,61125	9,62964	0,090041
<b>X<sub>4</sub></b>	Vitamina B12	0,00	0,005	5,67750	2,83875	11,38066	0,077758

Diante dos resultados obtidos na Análise de Variância – ANOVA (Tabela 5.2) verifica-se que todas as quatro variáveis testadas tiveram efeito significativo na resposta, demonstrando um  $p\text{-valor} < 0,10$ . Como indicado pelos coeficientes do modelo, nota-se que as variáveis Glicerol, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e Vitamina B12 apresentaram um efeito positivo na produção de H<sub>2</sub>, enquanto que o Extrato de Levedura possui um efeito negativo na resposta. Por esse motivo, os três componentes do meio de cultura foram selecionados e o Extrato de Levedura foi mantido em seu menor nível (0,5 g/L) nos experimentos subsequentes.

O glicerol é a variável mais importante estudada. No presente trabalho, o glicerol apresentou um efeito positivo na produção de H<sub>2</sub> no intervalo de 5,0 g/L a 25,0 g/L. Seu efeito positivo é esperado por ser o substrato para o crescimento microbiano, bem como para a bioconversão em hidrogênio. No entanto, o efeito na resposta, positivo ou negativo, depende do intervalo testado, das condições operacionais, do tipo de inóculo, dentre outros fatores. Liu & Fang (2007), ao trabalharem com glicerol residual e cultura pura *Klebsiella pneumoniae*, reportaram um efeito positivo na produção de H<sub>2</sub>, ao variarem a concentração de glicerol entre 10 g/L e 12,5 g/L em um delineamento PB. Por outro lado, Varrone et al. (2012), utilizando glicerol residual e cultura mista, mencionaram um efeito negativo na produção de H<sub>2</sub>, ao variá-lo entre 5 g/L e 15 g/L.

As fontes de fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) são necessárias para a manutenção da capacidade tamponante do meio, o que é essencial para o crescimento celular e produção de metabólitos, além da sua contribuição acerca do balanço bioenergético da célula (KAÛR et al., 2012). No presente estudo, foi avaliado o efeito de apenas uma fonte de fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) na produção de  $\text{H}_2$ , enquanto que a outra ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) foi mantida na concentração constante descrita na Tabela 4.3 do item 4.3.

Observou-se que, dentre o intervalo estudado (0,50 g/L a 1,50 g/L), o componente  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  apresentou efeito positivo na resposta. Resultados semelhantes foram reportados por Chookaew et al. (2014), que abrangeram o intervalo de 1,00g/L a 3,00g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , utilizando glicerol residual e cultura *Klebsiella* sp. TR17 e, por Mangayil et al. (2015), que investigaram o intervalo de 0,10g/L a 1,00g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , utilizando glicerol residual e consórcio microbiano definido.

As fontes de nitrogênio apresentam grande importância como componentes no meio de cultura, pois auxiliam na síntese de proteínas, ácidos nucleicos e enzimas, significativas para o crescimento celular e para a atividade da enzima hidrogenase (SITTIJUNDA & REUNGSANG, 2012). Apesar de extensivamente utilizado em meios fermentativos para a produção de  $\text{H}_2$  (ITO et al., 2005; NGO et al., 2011; KIVISTO et al., 2011; REUGSANG et al., 2013, entre outros), o Extrato de Levedura apresentou um efeito negativo, apesar de significativo, dentre o intervalo estudado (0,50 g/L a 2,50g/L).

Isso pode ser explicado pelo fato de já haver uma fonte de nitrogênio no meio de cultura, correspondente ao  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , na concentração constante de 2,0 g/L (Tabela 4.3). Resultados semelhantes corroboram para essa justificativa. Varrone et al. (2012) e Chookaew et al. (2014) reportaram a variável Extrato de Levedura como não significativa na produção de hidrogênio, ao estudarem o intervalo de 0,5g/L a 1,5g/L e 1,00g/L a 4,00g/L, respectivamente. Em ambos os casos, o meio nutriente utilizado pelos autores possuía outra fonte de nitrogênio em concentrações relativamente altas.

A vitamina B12 desempenha um papel importante em diversas reações do metabolismo do glicerol, sendo fundamental na atividade de uma série de enzimas (ROTH, LAWRENCE & BOBIK, 1996). Por esse motivo, justifica-se o efeito positivo dessa variável na produção de  $\text{H}_2$ .

### 5.1.1.2 Delineamento Composto Central Rotacional

O Delineamento Composto Central Rotacional foi posteriormente explorado para a otimização das três variáveis selecionadas na maximização da produção de H<sub>2</sub> e Etanol. A Tabela 5.3 apresenta a matriz experimental para as três variáveis com 16 experimentos no total, incluindo duas repetições no ponto central e as respectivas variáveis resposta, Rendimento de Hidrogênio (HY), dado em mmol H<sub>2</sub> / mol glicerol consumido e Rendimento de Etanol (EtOHY), dado em mmol EtOH / mol glicerol consumido. A otimização e análise de cada variável resposta foram discutidos nos tópicos subsequentes.

5.1.1.2.1. Efeito da concentração de glicerol bruto, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e vitamina B12, no rendimento de H<sub>2</sub>, por cultura mista.

Na Tabela 5.3, é possível perceber que o rendimento de H<sub>2</sub> variou de 0,00 a 6,612 mmol H<sub>2</sub> / mol glicerol consumido, após 168h de fermentação, atingindo o seu valor máximo no ensaio 15. Nota-se ainda, que os pontos centrais apresentaram uma pequena variação ( $\sigma = 0,1775$ ), indicando uma boa reprodutibilidade do processo.

Diante dos resultados obtidos, foi possível determinar os coeficientes do modelo que estão apresentados da Tabela 5.4. Excetuando-se os termos quadráticos das três variáveis de estudo, todos os outros parâmetros do modelo foram não-significativos a um intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ). Dessa forma, o modelo polinomial de 2ª ordem, para as variáveis codificadas e significativas, é apresentado na Equação 15.

$$Y = 6,44314 - 1,59255x_1^2 - 1,43699x_2^2 - 0,96305x_3^2 \quad (15)$$

Em que Y representa o valor previsto do rendimento de H<sub>2</sub>, e x<sub>1</sub>, x<sub>2</sub> e x<sub>3</sub> são os valores codificados para as variáveis Glicerol, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e Vitamina B12, respectivamente.

O coeficiente de regressão obtido ( $R^2=0,6416$ ) indica que 64,16% da variabilidade pode ser explicada pelo modelo.

**Tabela 5.3:** Matriz DCCR para as três variáveis selecionadas e as respectivas respostas, HY e EtOHY.

Ensaio	Glicerol		KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		Vitamina B12		HY (mmol H <sub>2</sub> / mol glicerol consumido)	EtOHY (mmol EtOH / mol glicerol consumido)
	X <sub>1</sub> (g/L)	x <sub>1</sub>	X <sub>2</sub> (g/L)	x <sub>2</sub>	X <sub>3</sub> (g/L)	x <sub>3</sub>		
1	22,00	-1	1,50	-1	0,0070	-1	3,917	38,247
2	30,00	1	1,50	-1	0,0070	-1	2,710	48,441
3	22,00	-1	2,00	1	0,0070	-1	0,611	29,739
4	30,00	1	2,00	1	0,0070	-1	3,381	18,795
5	22,00	-1	1,50	-1	0,0080	1	0,000	32,126
6	30,00	1	1,50	-1	0,0080	1	4,373	130,036
7	22,00	-1	2,00	1	0,0080	1	4,775	30,987
8	30,00	1	2,00	1	0,0080	1	1,267	51,273
9	19,28	-1,682	1,75	0	0,0075	0	0,941	46,355
10	32,72	1,682	1,75	0	0,0075	0	2,431	175,091
11	26,00	0	1,33	-1,682	0,0075	0	1,777	106,646
12	26,00	0	2,17	1,682	0,0075	0	2,475	99,335
13	26,00	0	1,75	0	0,0066	-1,682	2,087	39,592
14	26,00	0	1,75	0	0,0083	1,682	4,846	40,172
15	26,00	0	1,75	0	0,0075	0	6,612	292,942
16	26,00	0	1,75	0	0,0075	0	6,361	239,177

**Tabela 5.4:** Coeficientes de regressão para a resposta HY.

Fatores	Coeficientes de Regressão	Erro padrão	t(1)	p-valor (Prob > F)
Média	6,44314	0,125132	51,4907	0,012362*
x <sub>1</sub> (L)	0,36127	0,096054	7,5224	0,084137
x <sub>1</sub> (Q)	-1,59255	0,116624	-27,3110	0,023300*
x <sub>2</sub> (L)	0,01522	0,096054	0,3170	0,804595
x <sub>2</sub> (Q)	-1,43699	0,116624	-24,6432	0,025819*
x <sub>3</sub> (L)	0,32482	0,096054	6,7634	0,093450
x <sub>3</sub> (Q)	-0,96305	0,116624	-16,5155	0,038500*
x <sub>1</sub> x <sub>2</sub>	-0,48800	0,125500	-7,7769	0,081414
x <sub>1</sub> x <sub>3</sub>	-0,08725	0,125500	-1,3904	0,396929
x <sub>2</sub> x <sub>3</sub>	0,53800	0,125500	8,5737	0,073919

$R^2 = 0,6416$ ,  $p < 0,05$ , Erro puro = 0,03150

\*Efeitos significativos a 95% de confiança

Diante dos resultados obtidos na Análise de Variância (ANOVA) e descritos na Tabela 5.5, ressalta-se que, apesar do baixo valor de  $R^2$ , o modelo apresentou um valor de F calculado (7,17) maior que o valor de F tabelado (3,49), refletindo a significância estatística da equação obtida.

A Tabela 5.6 apresenta os valores experimentais obtidos e os valores previstos pelo modelo para o rendimento de H<sub>2</sub> (HY), em mmol H<sub>2</sub>/mol glicérol consumido, bem como a % Ajuste do modelo. É importante observar que na região ótima – região dos pontos centrais - a % Ajuste do modelo ultrapassa 97%, indicando a confiabilidade do modelo construído nessa região.

**Tabela 5.5:** ANOVA para a resposta HY.

<b>Fonte de Variação</b>	<b>Soma Quadrática</b>	<b>Graus de Liberdade</b>	<b>Média Quadrática</b>	<b>Fcalculado</b>	<b>Ftabelado</b>
Regressão	51,2179	3	17,0726	7,1758	3,49
Resíduos	28,5505	12	2,3792		
Falta de Ajuste	28,5190	11	2,5926		
Erro Puro	0,0315	1	0,0315		
Total	79,7684	15			

**Tabela 5.6:** Valores Previstos pelo modelo e respectiva %Ajuste – HY

<b>Ensaio</b>	<b>x<sub>1</sub></b>	<b>x<sub>2</sub></b>	<b>x<sub>3</sub></b>	<b>HY Experimental</b>	<b>HY Previstos</b>	<b>%Ajuste</b>
1	-1	-1	-1	3,917	2,451	62,56
2	1	-1	-1	2,710	2,451	90,43
3	-1	1	-1	0,611	2,451	-201,07
4	1	1	-1	3,381	2,451	72,48
5	-1	-1	1	0,000	2,451	0,00
6	1	-1	1	4,373	2,451	56,04
7	-1	1	1	4,775	2,451	51,32
8	1	1	1	1,267	2,451	6,59
9	-1,682	0	0	0,941	1,948	-7,05
10	1,682	0	0	2,431	1,948	80,15
11	0	-1,682	0	1,777	2,387	65,65
12	0	1,682	0	2,475	2,387	96,46
13	0	0	-1,682	2,087	3,725	21,51
14	0	0	1,682	4,846	3,725	76,87
15 (PC)	0	0	0	6,612	6,443	97,45
16 (PC)	0	0	0	6,361	6,443	98,71

O Delineamento Composto Central Rotacional, utilizado nesse trabalho, possibilitou a construção de um modelo para o Rendimento de Hidrogênio que forneceu regiões ótimas bem definidas, nas condições operacionais avaliadas. Por meio da análise das superfícies de resposta obtidas (Figuras 5.1, 5.2 e 5.3) é possível inferir as concentrações ótimas das variáveis testadas. Com o auxílio de métodos matemáticos aplicados à equação do modelo, tem-se que os pontos ótimos obtidos correspondem às concentrações de 26,45 g/L de glicerol, 1,75 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 0,00758 g/L de B12.

5.1.1.2.2. Efeito da concentração de glicerol bruto,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e vitamina B12, no rendimento de Etanol, por cultura mista.

De modo semelhante ao tópico anterior, é possível observar na Tabela 5.3, que o rendimento de etanol variou de 18,795 a 292,942 mmol EtOH / mol glicerol consumido, após 168h de fermentação, atingindo o seu valor máximo também no ensaio 15. Vale ressaltar a boa reprodutibilidade do processo, uma vez que os pontos centrais apresentaram uma pequena variação de acordo com os resultados obtidos ( $\sigma = 38,0176$ ).

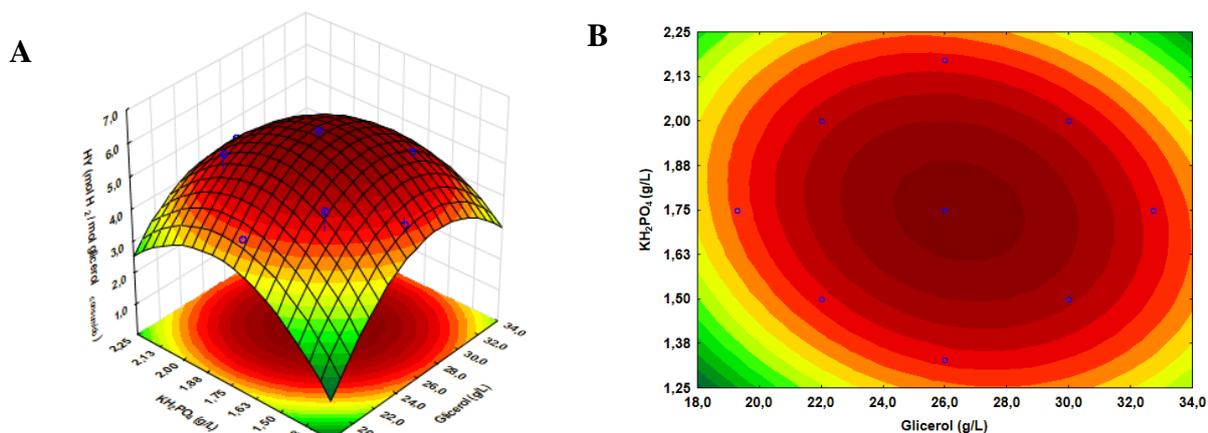
A Tabela 5.7 apresenta os detalhes do modelo polinomial de segunda ordem construído utilizando o DCCR, para a resposta Rendimento de Etanol. Excetuando-se o termo linear da variável Glicerol ( $x_1$ ) e os termos quadráticos das três variáveis de estudo, todos os outros parâmetros do modelo foram não-significativos a um intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ). Dessa forma, o modelo polinomial de segunda ordem, para as variáveis codificadas e significativas, é apresentado na Equação 16.

$$Y = 268,5744 + 24,4532x_1 - 60,9914x_1^2 - 63,7252x_2^2 - 86,0374x_3^2 \quad (16)$$

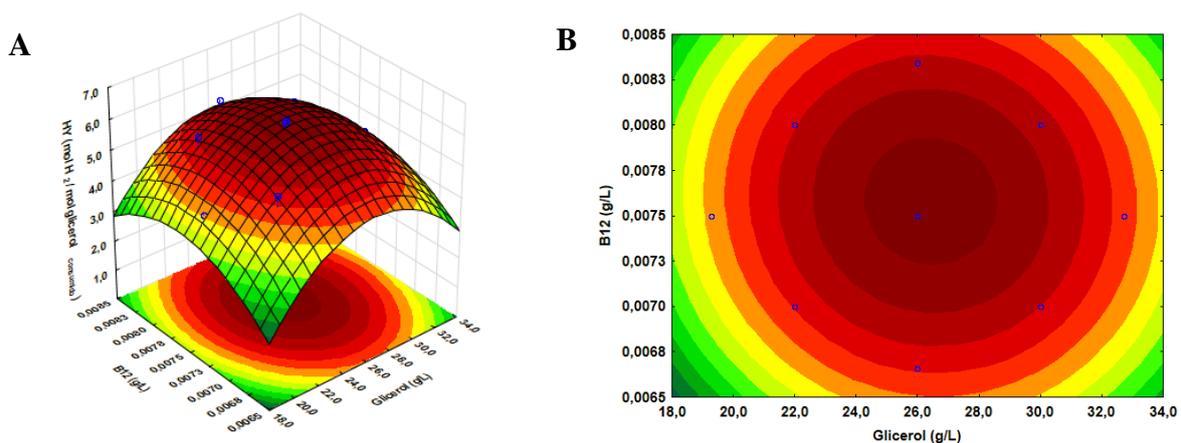
Em que Y representa o valor previsto do rendimento de Etanol, e  $x_1$ ,  $x_2$  e  $x_3$  são os valores codificados para as variáveis Glicerol,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e Vitamina B12, respectivamente.

O coeficiente de regressão obtido ( $R^2=0,9309$ ) indica que 93,09% da variabilidade pode ser explicada pelo modelo.

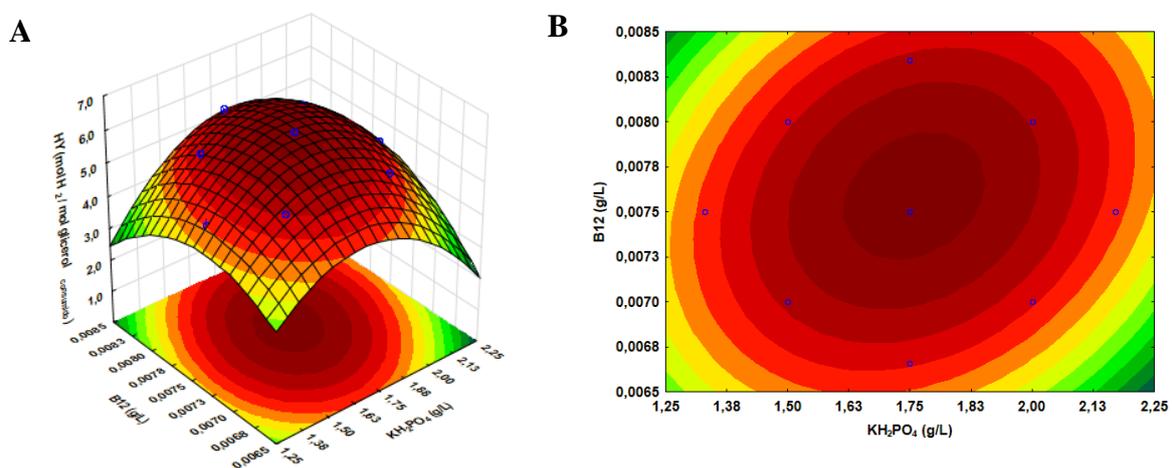
**Figura 5.1:** Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para HY – interação entre  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  x Glicerol.



**Figura 5.2:** Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para HY – interação entre B12 x Glicerol.



**Figura 5.3:** Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para HY – interação entre B12 x  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .



**Tabela 5.7:** Coeficientes de regressão para a resposta EtOHY.

Fatores	Coeficientes de Regressão	Erro padrão	t(6)	p-valor (Prob > F)
Média	268,5744	24,04110	11,17147	0,000031*
x <sub>1</sub> (L)	24,4532	18,45435	2,65012	0,038022*
x <sub>1</sub> (Q)	-60,9914	22,40637	-5,44411	0,001596*
x <sub>2</sub> (L)	-9,5448	18,45435	-1,03442	0,340820
x <sub>2</sub> (Q)	-63,7252	22,40637	-5,68813	0,001274*
x <sub>3</sub> (L)	8,0674	18,45435	0,87431	0,415570
x <sub>3</sub> (Q)	-86,0374	22,40637	-7,67973	0,000255*
x <sub>1</sub> x <sub>2</sub>	-12,3453	24,11177	-1,02400	0,345334
x <sub>1</sub> x <sub>3</sub>	-14,8683	24,11177	1,23328	0,263593
x <sub>2</sub> x <sub>3</sub>	-5,2185	24,11177	-0,43286	0,680244

$R^2 = 0,9309$ ,  $p < 0,05$ , Erro residual = 1162,755

\*Efeitos significativos a 95% de confiança

Diante dos resultados obtidos na Análise de Variância (ANOVA) e descritos na Tabela 5.8, observa-se que, além do alto valor de  $R^2$ , o modelo apresentou um valor de F calculado (33,23) quase 10 vezes maior que o valor de F tabelado (3,6), refletindo a significância estatística da equação obtida.

A Tabela 5.9 apresenta os valores experimentais obtidos e os valores previstos pelo modelo para o rendimento de Etanol (EtOHY), em mmol EtOH/mol glicerol consumido, bem como a % Ajuste do modelo. Ressalta-se que, diferentemente do modelo obtido para o Rendimento de H<sub>2</sub>, a % Ajuste do modelo para o Rendimento de Etanol ultrapassa 80% na grande maioria dos ensaios experimentais, o que indica a confiabilidade do modelo construído.

O DCCR, utilizado nesse trabalho, possibilitou a construção de um modelo para o Rendimento de Etanol que forneceu regiões ótimas bem definidas, nas condições operacionais avaliadas. A análise das superfícies de resposta mostradas nas Figuras 5.4,

5.5 e 5.6, permitiu inferir as concentrações ótimas das variáveis testadas. Dessa forma, os valores ótimos obtidos, na otimização do rendimento de Etanol, correspondem às concentrações de 27,60 g/L de glicerol, 1,71 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 0,00755 g/L de B12.

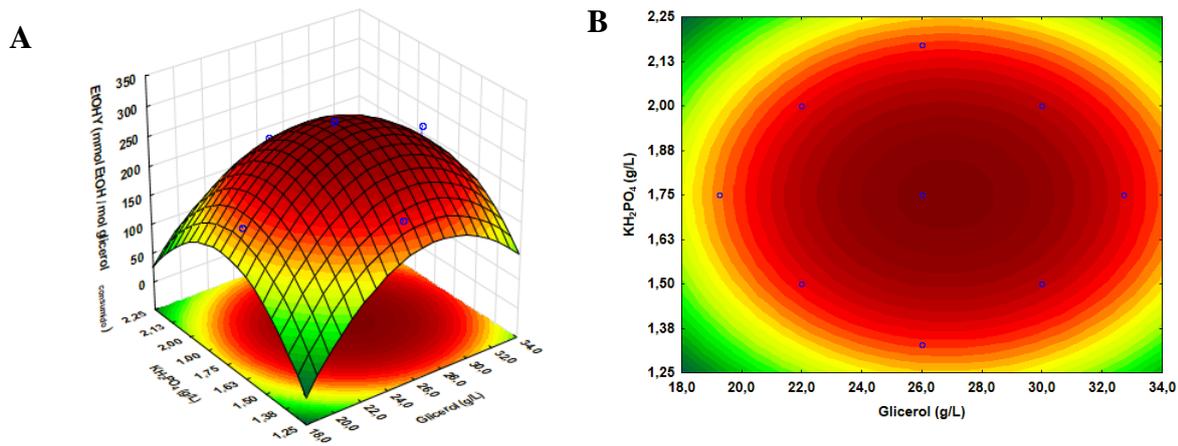
**Tabela 5.8:** ANOVA para a resposta EtOHY.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Fcalculado	Ftabelado
Regressão	148826,3	4	37206,6	33,2332	3,36
Resíduos	12315,2	11	1119,6		
Total	161141,5	15			

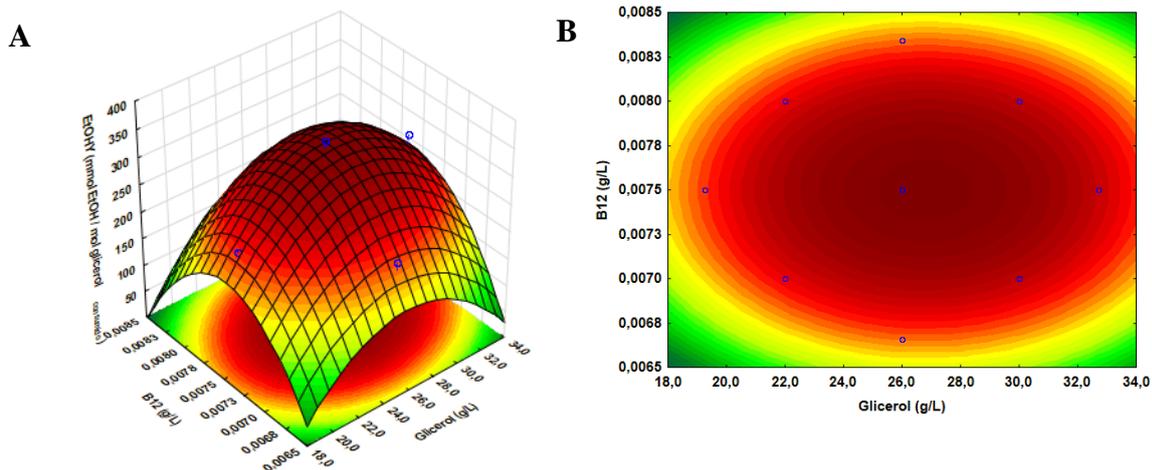
**Tabela 5.9:** Valores Previstos pelo modelo e respectiva %Ajuste – EtOHY

Ensaio	$x_1$	$x_2$	$x_3$	EtOHY Experimental	EtOHY Previstos	%Ajuste
1	-1	-1	-1	38,247	33,367	87,241
2	1	-1	-1	48,441	82,274	30,157
3	-1	1	-1	29,739	33,367	87,800
4	1	1	-1	18,795	82,274	-237,742
5	-1	-1	1	32,126	33,367	96,136
6	1	-1	1	130,036	82,274	63,270
7	-1	1	1	30,987	33,367	92,319
8	1	1	1	51,273	82,274	39,538
9	-1,682	0	0	46,355	55,351	80,593
10	1,682	0	0	175,091	137,514	78,538
11	0	-1,682	0	106,646	88,716	83,188
12	0	1,682	0	99,335	88,716	89,310
13	0	0	-1,682	39,592	25,742	65,019
14	0	0	1,682	40,172	25,742	64,081
15 (PC)	0	0	0	292,942	268,574	91,682
16 (PC)	0	0	0	239,177	268,574	87,709

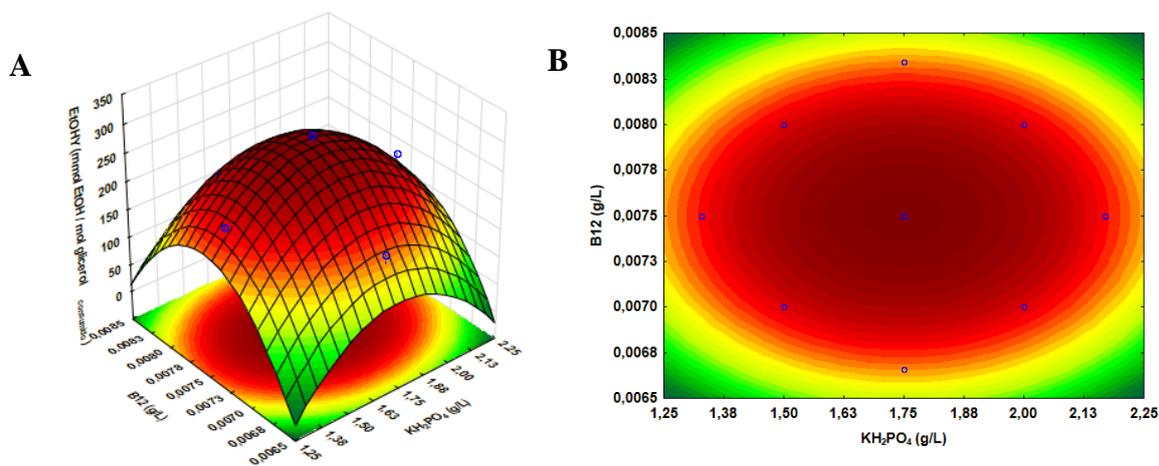
**Figura 5.4:** Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para EtOHY – interação entre  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  x Glicerol.



**Figura 5.5:** Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para EtOHY – interação entre B12 x Glicerol.



**Figura 5.6:** Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para EtOHY – interação entre B12 x  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .



### 5.1.1.2.3. Metabólitos solúveis produzidos

Os principais metabólitos obtidos nos 16 ensaios experimentais do DCCR, realizados em batelada, foram: 1,3-propanodiol (1,3-PD), ácido butírico (HBu), etanol (EtOH), ácido acético (HAc), metanol (MetOH) e butanol (ButOH). Na Tabela 5.10 estão apresentadas as concentrações, em mg/L, desses produtos.

**Tabela 5.10:** Concentração (mg/L) dos metabólitos solúveis produzidos nos 16 ensaios.

Ensaio	1,3-PD	MetOH	EtOH	ButOH	HAc	HBu
1	597,14	41,98	288,94	31,99	57,41	974,37
2	529,72	66,39	415,19	ND	15,08	1046,54
3	848,35	40,27	216,80	195,55	24,01	952,36
4	667,24	45,53	169,27	ND	41,54	1232,17
5	12908,43	38,96	156,89	ND	325,08	44,77
6	22165,91	58,52	917,15	33,11	98,37	764,11
7	1640,60	38,50	270,85	ND	11,47	745,96
8	460,19	53,93	378,12	86,86	45,97	1098,43
9	1965,11	43,23	355,50	46,06	160,52	915,62
10	720,17	81,64	1177,33	234,92	67,87	1388,95
11	521,25	65,58	584,58	18,85	24,33	1224,52
12	395,05	56,75	445,28	ND	16,23	1362,02
13	296,51	64,41	323,59	ND	36,69	1489,48
14	394,47	42,24	227,31	ND	98,54	970,40
15 (PC)	310,90	47,00	205,40	ND	53,64	1079,67
16 (PC)	356,59	71,13	425,17	1,45	42,43	1315,83

1,3-PD: 1,3-propanodiol; MetOH: metanol; EtOH: etanol; ButOH: butanol; HAc: ácido acético; HBu: ácido butírico; ND: não detectado; PC: ponto central

Diante da Tabela 5.10, observa-se que houve um predomínio de 1,3-propanodiol, etanol e ácido butírico na grande maioria dos ensaios experimentais. As máximas concentrações obtidas destes compostos foram de 22,17 g/L de 1,3-PD (ensaio 6), 1,18 g/L de EtOH (ensaio 10) e de 1,49 g/L de HBu (ensaio 13). Baixas concentrações de ácido acético e metanol foram verificadas. Além disso, salienta-se que

butanol foi produzido em apenas alguns ensaios experimentais. Diferente do ocorrido no Estudo A desta dissertação, ácido propiônico foi produzido em concentrações desprezíveis em todos os ensaios experimentais, motivo pelo qual os valores correspondentes não foram apresentados nesse tópico.

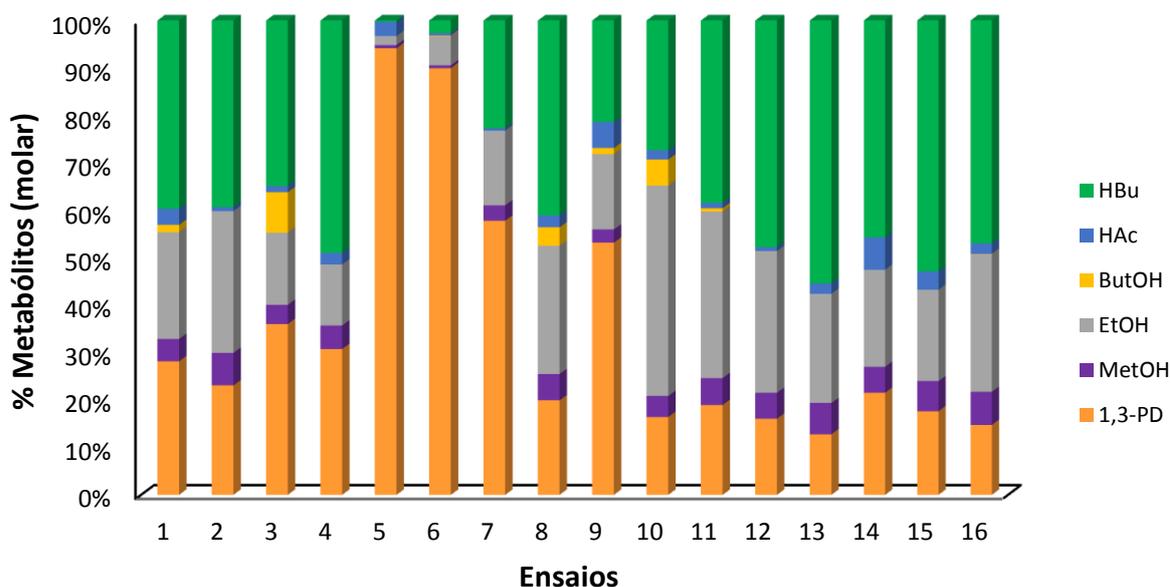
Na Tabela 5.11 e na Figura 5.7 destacam-se a porcentagem molar dos metabólitos em cada um dos 16 ensaios experimentais realizados em batelada. Nota-se que o máximo percentual de 1,3-propanodiol alcançado foi de 93,96%, no ensaio 5, 34,61% para o etanol, no ensaio 11 e 54,01% para o ácido butírico, no ensaio 13.

**Tabela 5.11:** Porcentagem molar dos metabólitos produzidos nos 16 ensaios experimentais.

Ensaio	1,3-PD	MetOH	EtOH	ButOH	HAc	HBu
1	27,53	4,60	22,00	1,51	3,35	38,80
2	22,44	6,68	29,04	0,00	0,81	38,28
3	35,19	3,97	14,85	8,33	1,26	34,11
4	30,17	4,89	12,62	0,00	2,38	48,12
5	93,96	0,67	1,89	0,00	3,00	0,28
6	89,67	0,56	6,13	0,14	0,50	2,67
7	56,87	3,17	15,51	0,00	0,50	22,33
8	19,65	5,47	26,67	3,81	2,49	40,51
9	51,05	2,67	15,25	1,23	5,28	20,54
10	16,26	4,38	43,92	5,45	1,94	27,09
11	18,68	5,58	34,61	0,69	1,11	37,91
12	15,64	5,34	29,12	0,00	0,81	46,56
13	12,45	6,42	22,44	0,00	2,11	54,01
14	20,82	5,30	19,82	0,00	6,59	44,24
15(PC)	17,28	6,20	18,86	0,00	3,78	51,83
16 (PC)	14,48	6,86	28,52	0,06	2,18	46,15

1,3-PD: 1,3-propanodiol; MetOH: metanol; EtOH: etanol; ButOH: butanol; HAc: ácido acético; HBu: ácido butírico; ND: não detectado; PC: ponto central

**Figura 5.7:** Porcentagem molar dos metabólitos produzidos nos 16 ensaios experimentais.



Trabalhos que visaram a produção de hidrogênio e etanol a partir de glicerol também relatam a presença de 1,3-propanodiol, etanol e ácido butírico dentre os principais produtos da fermentação. Como, por exemplo, pode-se destacar os trabalhos de Sittijunda & Reungsang (2012), Varrone et al. (2012) e Magayil et al. (2015).

Sittijunda & Reungsang (2012) investigaram quais componentes no meio nutricional afetam a produção termofílica de biohidrogênio, a partir do glicerol bruto (20,33 g/L), por cultura anaeróbia mista. Para tanto, utilizou-se a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) e o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). Ao final do experimento de validação, os autores verificaram que os principais metabólitos produzidos foram 1,3-propanodiol (3,46 g/L) e etanol (3,01 g/L). Ácido acético, butírico, fórmico, láctico e propiônico foram produzidos em menores quantidades. Diferente do obtido no presente trabalho, não se observou a produção de n-butanol em nenhum ensaio experimental.

Varrone et al. (2012), utilizando metodologia semelhante a Sittijunda & Reungsang (2012), objetivou maximizar a produção de hidrogênio e etanol, a partir de glicerol bruto (15,0 g/L), por cultura anaeróbia mista. Para tanto, estudou-se a influência de cinco variáveis: glicerol (g/L), pH inicial, temperatura, extrato de levedura (g/L) e

triptona. No entanto, utilizando a metodologia de seleção Plackett-Burman, apenas as três primeiras foram consideradas significativas. Os autores relataram que os principais metabólitos produzidos foram, além do etanol (7,9 g/L), lactato, 1,3-propanodiol, acetato, succinato e formato.

Mangayil et al. (2015) estudaram a maximização da produção de hidrogênio, a partir de glicerol bruto (1,0 g/L), utilizando uma cultura microbiana enriquecida principalmente, por espécies *Clostridium*. O delineamento Plackett-Burman identificou as variáveis  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  e KCl com efeito negativo na produção de hidrogênio, e selecionou  $NH_4Cl$ ,  $K_2HPO_4$  e  $KH_2PO_4$  como variáveis significativas, que posteriormente foram avaliadas pelo DCCR. Ao final do experimento de validação, os autores relataram que acetato, etanol e butirato foram os metabólitos majoritários produzidos.

Utilizando inóculos puros, Jitrwung & Yargeau (2011), Reungsang et al. (2013) e Chookaew et al. (2014), realizaram estudos similares. Os autores avaliaram a maximização da produção de hidrogênio, a partir de glicerol bruto, por *E. aerogenes* ATCC 35029, *E. aerogenes* KKU-S1 e *Klebsiella* sp. TR17, respectivamente.

Jitrwung & Yargeau (2011), como citado anteriormente, avaliou os efeitos das seguintes variáveis: nível de  $O_2$  no gás usado para transferência do inóculo, volume do inóculo,  $Na_2HPO_4$ ,  $NH_4NO_3$  e  $FeSO_4$ , além da concentração de glicerol. Os autores verificaram a presença dos metabólitos piruvato, acetato, lactato, etanol e metanol, ao final do experimento com 18,0 g/L de glicerol.

Reungsang et al. (2013) avaliaram a influência do pH, temperatura e da concentração de glicerol, vitaminas e extrato de levedura, na fermentação do glicerol bruto à  $H_2$  e etanol. Ao final da fermentação com 31,0 g/L de glicerol, os autores obtiveram como principais metabólitos: etanol (5,52 g/L), 1,3-propanodiol (64,7 mg/L), ácido acético (852 mg/L) e ácido propiônico (1,63 g/L). Outros produtos como 1-propanol, n-butanol, ácido fórmico, ácido butírico e valérico foram detectados em baixas concentrações.

Chookaew et al. (2014), por sua vez, investigaram a influência da concentração de glicerol,  $KH_2PO_4$  e  $NH_4Cl$ , na produção simultânea de  $H_2$  e EtOH, a partir de glicerol bruto. Com 11,14 g/L de glicerol, os autores obtiveram como produtos majoritários da fermentação etanol, 1,3-propanodiol e 2,3-butanodiol.

### 5.1.1.3. Ensaio de Validação

A fim de confirmar as condições ótimas previstas pelos modelos, foram realizados ensaios de validação em batelada. Para tanto, o meio otimizado composto de 26,534 g/L glicerol; 1,75 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,0076 g/L B12; 0,5 g/L Extrato de Levedura; 3,4 g/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ; 2,0 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,2 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,02 g/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,005 g/L  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e 2,0 mL/L SL7, foi preparado. O pH inicial foi ajustado em  $6,70 \pm 0,03$  e a temperatura de cultivo foi  $37^\circ\text{C}$ . Os experimentos em batelada foram conduzidos em triplicata e a média foi calculada para o resultado obtido.

Sob as condições ótimas, os rendimentos previstos de Hidrogênio e Etanol correspondem a 6,395 mmols  $\text{H}_2$  / mol glicerol consumido e 266,388 mmols EtOH / mol glicerol consumido, respectivamente. Os atuais resultados obtidos nos ensaios de validação são  $6,165 \pm 0,41$  mmol  $\text{H}_2$  / mol glicerol consumido e  $291,782 \pm 76,92$  mmol EtOH / mol glicerol consumido, indicando uma boa correlação entre os valores previstos e experimentais. O ensaio de validação revelou apenas 3,6% de diferença entre o valor previsto pelo modelo de  $\text{H}_2$  e o resultado experimental, enquanto que para o modelo de etanol a diferença foi de 8,7%. Ao final do experimento, os principais metabólitos produzidos foram: 1,3-propanodiol ( $0,30 \pm 0,05$  g/L), etanol ( $1,23 \pm 0,028$  g/L) e ácido butírico ( $1,01 \pm 0,15$  g/L). Ácido acético, metanol e butanol também foram produzidos em baixas concentrações.

### 5.1.1.4. Análise comparativa com os resultados reportados na literatura

A Tabela 5.12 sintetiza e compara os principais trabalhos na literatura relacionados à produção de hidrogênio e etanol realizados em batelada. Apesar do planejamento experimental desenvolvido ter fornecido regiões ótimas bem definidas para os modelos de rendimento de  $\text{H}_2$  e etanol, os resultados obtidos ainda foram inferiores aos observados em outros estudos. Todavia, é válido ressaltar que a comparação direta é impossível devido aos diferentes parâmetros operacionais, inóculos, composição do glicerol bruto, concentração de substrato e uso adicional de suplementos no meio nutritivo.

Poucos estudos científicos têm focado na otimização estatística para melhoria da produção mesofílica e simultânea de biohidrogênio e etanol por culturas anaeróbias

mistas, como é o caso dos trabalhos de Sittijunda & Reungsang (2012) e Varrone et al. (2012). Sittijunda & Reungsang (2012) reportaram um rendimento de  $H_2$  e etanol de, respectivamente, 0,30 e 0,24 mol / mol glicerol consumido, a partir de 20,33 g/L de glicerol, utilizando um meio nutriente otimizado que continha 0,16 g/L de uréia, 3,97 g/L de  $Na_2HPO_4$  e 0,20 mL/L de solução Endo-nutriente. Varrone et al. (2012), por sua vez, observaram que o máximo rendimento de  $H_2$  (0,96 mol  $H_2$  / mol glicerol consumido) ocorreu na temperatura de 37°C, pH inicial de 7,9 e concentração de glicerol de 15,0 g/L, enquanto que o máximo rendimento de etanol (1,0 mol EtOH / mol glicerol consumido) foi observado com 37,3°C, pH 8,0 e 15,2 g/L de glicerol.

No entanto, para culturas puras, mais estudos têm sido conduzidos. Um dos primeiros estudos que abordou a otimização estatística do meio de cultivo para maximizar a produção de hidrogênio, a partir de glicerol bruto, foi reportado por Liu & Fang (2007) utilizando *Klebsiella pneumoniae DSM 2026*. Os autores reportaram um rendimento de  $H_2$  igual a 0,40 mol  $H_2$  / mol glicerol consumido, a partir de 20,4 g/L de glicerol, com um meio otimizado contendo 5,7 g/L KCl, 13,8 g/L  $NH_4Cl$  e 1,5 g/L  $CaCl_2$ , suplementado com 3,0 g/L de extrato de levedura.

Ainda aplicando culturas puras, estudos como o de Jitrwung & Yargeau (2011), Reungsang et al. (2013) e Chookaew et al. (2014), investigaram a maximização da produção simultânea de hidrogênio e etanol. Jitrwung & Yargeau, por exemplo, utilizando *Enterobacter aerogenes*, otimizaram os componentes do meio nutriente usando delineamento de Box-Benken e metodologia de superfície de resposta. Os autores reportaram rendimentos de 0,85 mol  $H_2$  / mol glicerol consumido e 0,85 mol EtOH / mol glicerol consumido, utilizando 18,0 g/L de glicerol, 8,0 g/L de  $Na_2HPO_4$ , 0,00625 g/L de  $FeSO_4$ , 1,5 g/L de  $NH_4NO_3$ , 9,4 mL do inóculo e 7,5% de oxigênio.

Reungsang et al. (2013) obtiveram os máximos rendimentos de 0,12 mol  $H_2$  / mol glicerol consumido e 0,83 mol EtOH / mol glicerol consumido, utilizando *Enterobacter aerogenes* KKU-S1, com 37 g/L de glicerol, 1,0 g/L extrato de levedura, pH inicial 8,14 e temperatura de 37°C. Diferente do presente trabalho, as vitaminas avaliadas pelos autores não foram significativas no processo. Chookaew et al. (2014), por sua vez, obtiveram 0,26 mol  $H_2$  / mol glicerol consumido e 0,58 mol EtOH / mol glicerol consumido, utilizando *Klebsiella* sp. TR17, com 11,14 g/L de glicerol, 2,47  $KH_2PO_4$  e 6,03 g/L  $NH_4Cl$ .

**Tabela 5.12:** Estudo comparativo do rendimento de hidrogênio e etanol, entre o trabalho atual e os reportados na literatura (em batelada).

Substrato	Concentração (g/L)	Inóculo	Rendimento (mol metabólito / mol glicerol consumido)		Referência
			HY	EtOHY	
Glicerol bruto	20,4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,40	NI	LIU & FANG et al. (2007)
Glicerol bruto	18,0	<i>Enterobacter aerogenes</i>	0,85	0,85	JITRWUNG et al. (2011)
Glicerina pura	2,5	<i>H. saccharolyticum subsp. Saccharolyticum</i>	2,16	NI	KIVISTÖ et al. (2011)
Glicerol bruto	20,33	Misto	0,30	0,24	SITTIJUNDA & REUNGSANG (2012)
Glicerol bruto	15,0	Misto	0,96	1,00	VARRONE et al. (2012)
Glicerol bruto	7,0	Misto	0,76	0,70	LIU et al (2013)
Glicerol bruto	31,0	<i>Enterobacter aerogenes</i>	0,12	0,83	REUNGSANG et al. (2013)
Glicerol bruto	11,14	<i>Klebsiella sp.</i>	0,26	0,58	CHOOKAEW et al. (2014)
Glicerol bruto	1,0	Misto	1,42	NI	MANGAYIL et al. (2015)
Glicerol bruto	26,45	Misto	0,006	0,29	Este estudo

HY: Rendimento de H<sub>2</sub>; EtOHY: rendimento de etanol; NI: não informado.

### 5.1.2 Aplicação do meio de cultura otimizado em reatores contínuos

Neste item serão apresentados os resultados obtidos com a aplicação do meio de cultura otimizado, descrito no item 5.1.1.3 deste capítulo, em reatores anaeróbios de leito fluidificado. Para tanto, utilizou-se dois reatores mesofílicos denominados de RGB – reator alimentado com glicerol bruto e, RGP – reator alimentado com glicerina pura.

De acordo com o objetivo proposto, cada reator seria alimentado exatamente com as concentrações de substrato e nutrientes definidas pelo planejamento experimental (26,534 g/L glicerol; 1,75 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,0076 g/L B12; 0,5 g/L Extrato de Levedura; 3,4 g/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ; 2,0 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,2 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,02 g/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,005 g/L  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e 2,0 mL/L SL7), bem como a temperatura utilizada (30°C) e pH efluente (~4,5). De forma que a única modificação seria a alteração do modo não-contínuo (batelada) para o modo contínuo de operação, além da comparação dos resultados entre dois tipos de glicerol, puro e bruto.

No entanto, ao alimentar o reator RGP (glicerina pura) com a concentração pré-estabelecida de glicerina (26,5 g/L), o mesmo não apresentou respostas quanto ao consumo de glicerol. Diante disso, a estratégia adotada foi reduzir à metade apenas a concentração de glicerol (~13,25 g/L), permanecendo os outros componentes como o definido. Tal estratégia obteve sucesso e possibilitou seguir com a operação.

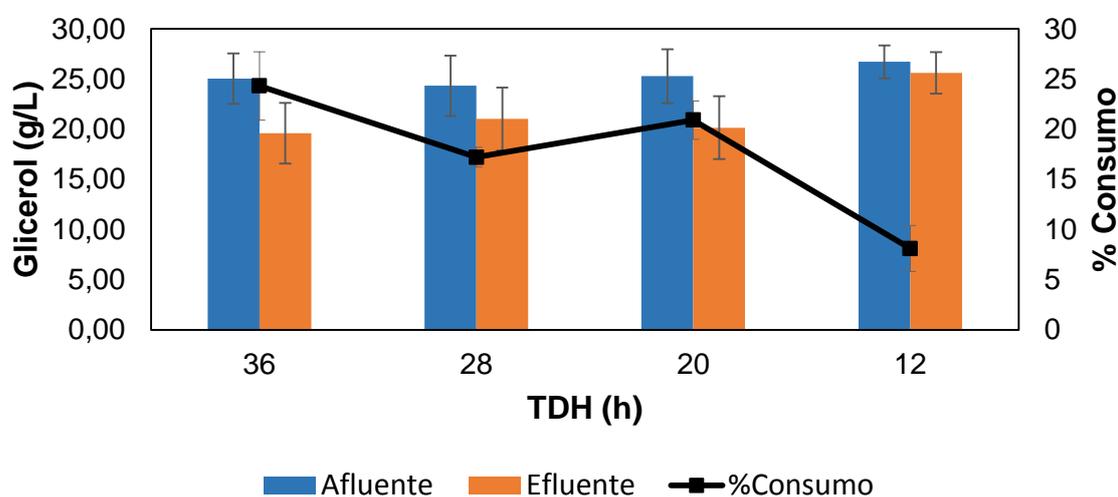
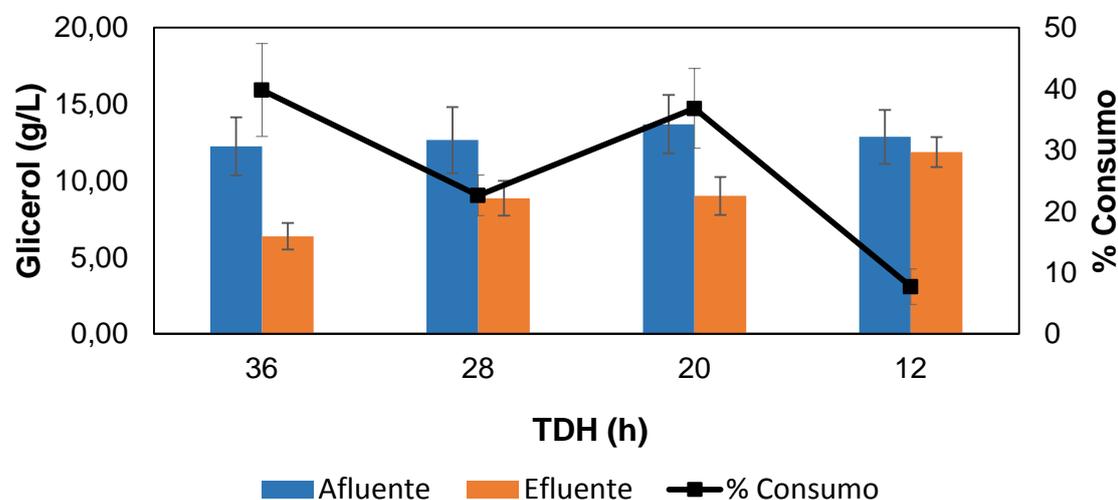
#### 5.1.2.1 Consumo de glicerol

As conversões médias de cada fase operacional dos reatores RGB e RGP são apresentadas na Tabela 5.13 e nas Figuras 5.8 e 5.9. De acordo com a Figura 5.8 é possível observar que houve uma estabilidade no consumo nas três primeiras fases de operação do reator RGB, seguido por um declínio no TDH de 12h.

O reator RGP apresentou um comportamento semelhante, no entanto, o consumo de substrato obtido nas três primeiras fases de operação foi maior que o observado no reator RGB. Da mesma forma, houve um declínio no consumo na última fase de operação (TDH 12h).

**Tabela 5.13:** Consumo e concentrações afluente e efluente para o RGB e RGP.

TDH (h)	RGB			RGP		
	Consumo (%)	Afluente (mg/L)	Efluente (mg/L)	Consumo (%)	Afluente (mg/L)	Efluente (mg/L)
36	24,3 ± 3,4	25,0 ± 2,5	19,6 ± 3,0	39,8 ± 7,6	12,2 ± 1,9	6,4 ± 0,9
28	17,2 ± 1,0	24,3 ± 3,0	21,0 ± 3,1	22,6 ± 3,3	12,7 ± 2,2	8,9 ± 1,1
20	20,9 ± 1,9	25,3 ± 2,7	21,1 ± 3,1	36,8 ± 6,5	13,7 ± 1,9	9,0 ± 1,2
12	8,1 ± 2,3	26,7 ± 1,6	25,6 ± 2,1	7,7 ± 2,9	12,9 ± 1,8	11,9 ± 1,0

**Figura 5.8:** Consumo de substrato no RGB.**Figura 5.9:** Consumo de substrato no RGP.

Fazendo um paralelo com o Estudo B descrito nesta dissertação, observou-se que em altas concentrações de glicerol, a conversão de substrato é muito baixa. Diante disso, adotou-se como estratégia de operação a utilização de elevados tempos de detenção hidráulica, possibilitando um maior contato entre o microrganismo e o substrato. É notável que em TDHs mais altos (36h a 20h) o consumo é razoável, no entanto, a partir do TDH de 12h, o consumo é muito baixo, o que obviamente, impossibilitou a operação do reator em TDHs menores que 12h.

A possível explicação para o comportamento dos reatores é o efeito denominado inibição pelo substrato e, como consequência, inibição por retroalimentação (ou *feedback*) do produto. De acordo com Edwards (1970), uma quantidade excessiva de substrato pode desequilibrar o metabolismo da célula, causando, talvez, um excesso de produção de um produto resultante de uma via metabólica e bloqueando uma segunda via relacionada. Por outro lado, quando a concentração deste produto se eleva, a tendência é que este metabólito aja como um inibidor alostérico, diminuindo a velocidade da via e a sua própria produção. Esse mecanismo é denominado inibição por retroalimentação ou *feedback*.

Segundo Walter & Frieden (1963), quando o produto derivado de uma reação enzimática acumula, é possível que ocorra um sistema de regulação biológica. A quantidade de produto formada pode ser controlada pela quantidade de produto e substrato presentes no meio. No equilíbrio, nenhum produto é sintetizado, a não ser que mais substrato seja adicionado ao meio e/ou produto seja removido. Isso regularia a concentração de produto formado mesmo que nenhum produto seja removido por outros mecanismos. A inibição pelo produto, portanto, pode ser vista como uma proteção contra os extremos biológicos (WALTER & FRIEDEN, 1963).

De forma prática, pode-se observar nesse trabalho, que a alta concentração de glicerol aplicada no reator RGB dificultou o seu consumo, permanecendo em torno de 20% nas três primeiras fases de operação. Entretanto, ao diminuir estrategicamente a concentração de glicerina no reator RGP, observa-se um consumo em torno de 35% nas três primeiras fases. Soma-se a isso a grande produção de 1,3-propanodiol em todas as fases de operação de ambos os reatores (dados mostrados no próximo item), além da mínima produção de hidrogênio e outros metabólitos oriundos da vida oxidativa. Tais fatos corroboram como argumentos para a explicação descrita anteriormente.

### 5.1.2.2 Hidrogênio e metabólitos solúveis produzidos

Na Tabela 5.14 estão apresentados os resultados referentes ao rendimento e produtividade de hidrogênio, etanol e 1,3-propanodiol nos quatro TDHs aplicados no reator RGB. É possível observar que não houve produção de hidrogênio em nenhuma fase de operação do reator.

A produção de etanol teve seu máximo no TDH de 36h e decresceu à medida que diminuía o TDH. A máxima concentração, rendimento e produção volumétrica de etanol obtidos foram de 365,4 mg/L, 0,12 mol etanol / mol glicerol consumido e 0,010 g/L.h, respectivamente, no TDH de 36h. Para o 1,3-propanodiol, houve um aumento do rendimento até o TDH de 28h, seguido por uma diminuição até o TDH de 12h. A máxima concentração (1310,0 mg/L) e produtividade (0,066 g/L.h) de 1,3-propanodiol foram obtidos no TDH de 20h, enquanto o máximo rendimento alcançado (0,38 mol 1,3-PD/mol glicerol consumido) ocorreu no TDH de 28h.

A Figura 5.10 mostra o comportamento dos rendimentos de H<sub>2</sub>, etanol e 1,3-propanodiol. É possível verificar que no TDH de 36h, os rendimentos de etanol e 1,3-propanodiol eram muito semelhantes. Soma-se a isso, o fato de que a porcentagem de 1,3-propanodiol e etanol dentre os metabólitos solúveis produzidos eram de, respectivamente, 58,5% e 40,9%. No entanto, a partir do TDH de 28h, houve um favorecimento da via redutiva da fermentação do glicerol, priorizando a produção de 1,3-propanodiol, que constituía mais de 90% dos metabólitos solúveis produzidos. Um possível colapso do reator pode ser verificado no TDH de 12h, em que os rendimentos dos metabólitos produzidos atingem valores desprezíveis, além do baixo consumo alcançado nesta fase.

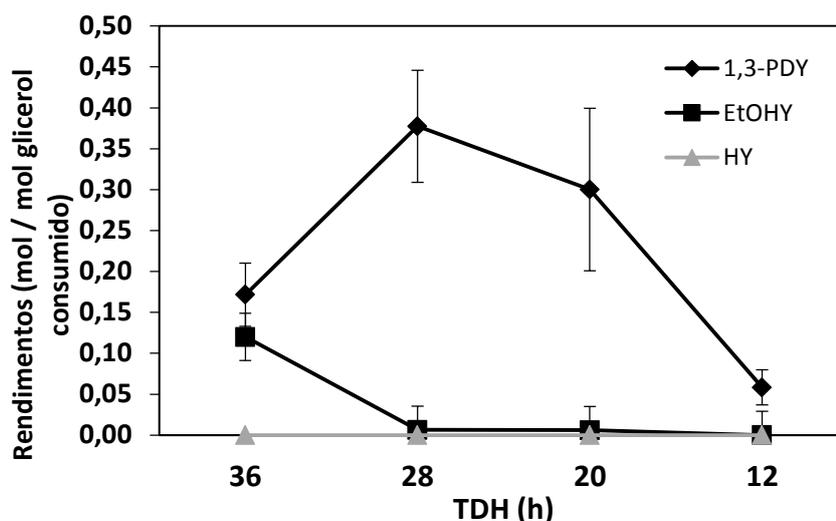
**Tabela 5.14:** Produção de H<sub>2</sub>, etanol e 1,3-propanodiol no reator RGB.

TDH (h)	%H <sub>2</sub>	HY	PVH	EtOHY	PVEtOH	1,3-PDY	PV1,3-PD
36	0,00	0,00	0,00	0,12	0,010	0,17	0,024
28	0,00	0,00	0,00	0,01	0,000	0,38	0,047
20	0,00	0,00	0,00	0,01	0,001	0,30	0,066
12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,000	0,06	0,009

HY, EtOHY e 1,3-PDY: rendimentos de H<sub>2</sub>, etanol e 1,3-propanodiol (mol/mol glicerol consumido)

PVH, PVEtOH, PV1,3-PD: produção volumétrica de H<sub>2</sub> (mmol H<sub>2</sub>/L.h), etanol e 1,3-propanodiol (g/L.h)

**Figura 5.10:** Rendimentos de H<sub>2</sub>, etanol e 1,3-propanodiol no reator RGB.



Da mesma forma, na Tabela 5.15 estão apresentados os resultados referentes ao rendimento e produtividade de H<sub>2</sub>, etanol e 1,3-propanodiol no reator RGP. Diferentemente do apresentado pelo reator alimentado com glicerol bruto, no reator RGP houve produção de H<sub>2</sub> em duas fases de operação, sendo que a máxima produção foi obtida no TDH de 20h (0,078 mol H<sub>2</sub>/ mol glicerol consumido e 0,078 g/L.h).

A produção de etanol também apresentou o seu máximo no TDH de 36h e decresceu à medida que diminuía o TDH. A máxima concentração, rendimento e produtividade atingidos foram de, respectivamente, 408,7 mg/L, 0,17 mol etanol / mol glicerol consumido e 0,011 g/L.h. Para o 1,3-propanodiol, houve um aumento do rendimento até o TDH de 20h, seguido por um decréscimo. A máxima concentração, rendimento e produtividade de 1,3-propanodiol, foram atingidos no TDH de 20h e correspondem à, respectivamente, 1776,0 mg/L, 0,43 mol 1,3-PD/mol glicerol consumido e 0,089 g/L.h.

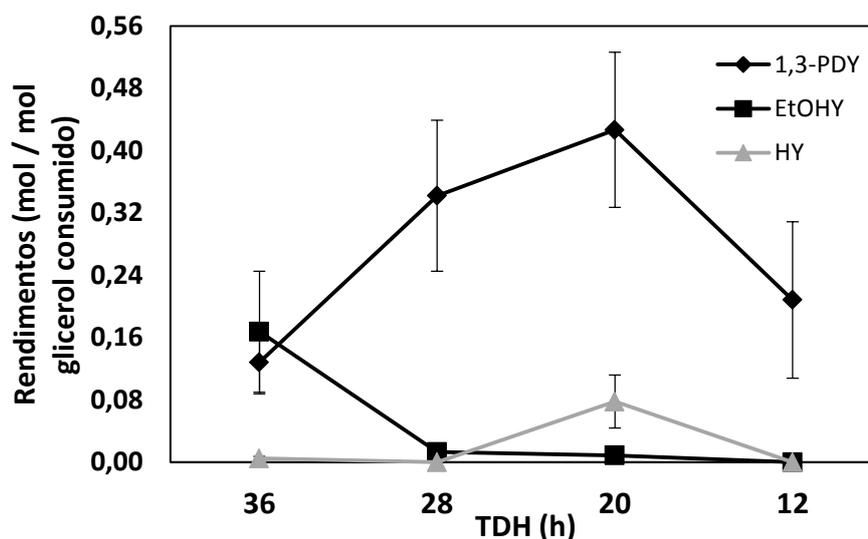
Comportamento muito semelhante ao reator RGB em relação aos rendimentos, também foi verificado no reator RGP, conforme é mostrado pela Figura 5.11. Observa-se que a via redutiva da fermentação do glicerol foi favorecida a partir do TDH de 28h, apresentando uma porcentagem de 1,3-propanodiol superior a 90% dentre os metabólitos solúveis produzidos. No entanto, no TDH de 36h, os metabólitos foram constituídos de 43% de 1,3-propanodiol e 56% de etanol, fato contrário apresentado pelo reator RGB.

**Tabela 5.15:** Produção de H<sub>2</sub>, etanol e 1,3-propanodiol no reator RGP.

TDH (h)	%H <sub>2</sub>	HY	PVH	EtOHY	PVEtOH	1,3-PDY	PV1,3-PD
36	7,30	0,005	0,02	0,17	0,011	0,13	0,014
28	0,00	0,000	0,00	0,01	0,001	0,34	0,029
20	34,20	0,078	0,57	0,01	0,002	0,43	0,089
12	0,00	0,000	0,00	0,00	0,000	0,21	0,028

HY, EtOHY e 1,3-PDY: rendimentos de H<sub>2</sub>, etanol e 1,3-propanodiol (mol/mol glicerol consumido)

PVH, PVEtOH, PV1,3-PD: produção volumétrica de H<sub>2</sub> (mmol H<sub>2</sub>/L.h), etanol e 1,3-propanodiol (g/L.h)

**Figura 5.11:** Rendimentos de H<sub>2</sub>, etanol e 1,3-propanodiol no reator RGP.

De maneira geral, os metabólitos solúveis produzidos foram constituídos apenas por 1,3-propanodiol e etanol. Concentrações desprezíveis de ácido propiônico e butírico foram verificadas.

O grande favorecimento da via redutiva da fermentação do glicerol e consequente produção de 1,3-propanodiol, pode ser atribuído ao efeito de inibição do substrato gerado pela elevada concentração de glicerol aplicada aos reatores, como explicado no item anterior, e também, pela adição de vitamina B12 ao meio nutriente.

Segundo Biebl et al. (1999), a maioria dos microrganismos produtores de 1,3-propanodiol são dependentes de vitamina B12, uma vez que a enzima *glicerol desidratase*, incluída na primeira etapa de produção do 1,3-propanodiol, requer a vitamina B12 como uma coenzima para funcionamento ativo. Autores como Kivistö et al. (2011) e Pflügl et al. (2012) alcançaram, respectivamente, 0,58 e 0,84 mol 1,3-PD/mol glicerol consumido, ao utilizarem inóculos puros e meios nutrientes suplementados com vitamina B12, em batelada.

#### 5.1.2.3. Comparação entre os resultados obtidos no reator batelada e no reator contínuo

A Tabela 5.16 resume os rendimentos máximos obtidos de H<sub>2</sub>, etanol e 1,3-propanodiol no reator em batelada e no reator contínuo. Ressalta-se que, como foi necessário diminuir pela metade a concentração de glicerol no reator alimentado com glicerina pura (RGP), o reator utilizado para fins de comparação foi o reator RGB, operado nas condições determinadas pelo planejamento experimental prévio.

É possível observar que a alteração no modo de operação, ao utilizar as mesmas concentrações de glicerol e nutrientes, não resultou no esperado, uma vez que foi verificado uma diminuição do rendimento de H<sub>2</sub> e etanol. No entanto, ocasionou o aumento, de aproximadamente 5x, no rendimento de 1,3-propanodiol, passando de 0,08 no reator em batelada, para 0,38 mol de 1,3-PD/mol glicerol consumido no reator contínuo. Tal fato pode ser atribuído ao favorecimento da via redutiva da fermentação do glicerol ocasionado pela elevada concentração de substrato e utilização da vitamina B12, como explicado nos itens anteriores.

**Tabela 5.16:** Comparação dos rendimentos máximos obtidos no reator em batelada e no reator contínuo.

Tipo de reator	Glicerol (g/L)	Rendimento (mol / mol glicerol consumido)		
		HY	EtOHY	1,3-PDY
Batelada*	26,45	0,006	0,291	0,077
Contínuo	26,45	0,00	0,12	0,38

\*Resultados obtidos no ensaio de validação.

## 5.2 Estudo B: Otimização de parâmetros operacionais em reatores contínuos

O Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) foi explorado visando definir a melhor combinação das variáveis  $X_1$  = concentração de glicerol (g/L) e  $X_2$  = TDH (h), que resulta na maximização das respostas  $Y_1$  = consumo de glicerol - CG (%),  $Y_2$  = carga orgânica volumétrica removida – COVR (g/L.h)  $Y_3$  = conteúdo de  $H_2$  no biogás –  $H_2$  (%) e  $Y_4$  = rendimento de  $H_2$  – HY (mol  $H_2$  / mol glicerol consumido). A Tabela 4.9 do Capítulo 4, apresenta a matriz experimental do DCCR para as duas variáveis, totalizando 10 ensaios experimentais. Como explicado anteriormente, cada ensaio experimental correspondeu a uma fase de operação do reator RM, cujas condições de concentração do substrato e TDH foram definidos pela matriz.

O desempenho do reator RM em cada um dos 10 ensaios experimentais está apresentada na Tabela 5.17. A otimização e análise de cada variável resposta foram discutidos nos tópicos subsequentes.

**Tabela 5.17:** Desempenho do reator RM nos 10 ensaios experimentais

Ensaio	TCO medida (kg/m <sup>3</sup> .dia)	CG (%)	COVR (g/L.h)	$H_2$ (%)	HY (mol $H_2$ / mol glicerol consumido)	HPR (mmol $H_2$ /L.h)
1	54,13	83,4 ± 4,4	2,09	0,0 ± 0,0	0,000 ± 0,000	0,00 ± 0,00
2	160,60	33,0 ± 4,1	2,48	27,3 ± 9,8	0,006 ± 0,005	0,41 ± 0,26
3	13,92	91,8 ± 4,7	0,57	0,0 ± 0,0	0,000 ± 0,000	0,00 ± 0,00
4	40,10	34,4 ± 4,1	0,65	82,7 ± 3,8	0,111 ± 0,038	1,84 ± 0,52
5	14,82	98,4 ± 2,7	0,57	0,0 ± 0,0	0,000 ± 0,000	0,00 ± 0,00
6	89,86	20,2 ± 3,7	0,69	73,1 ± 7,1	0,170 ± 0,057	3,61 ± 0,97
7	260,41	41,9 ± 9,2	5,51	78,4 ± 7,6	0,069 ± 0,027	9,74 ± 2,78
8	23,62	53,0 ± 4,5	0,57	0,0 ± 0,0	0,000 ± 0,000	0,00 ± 0,00
9 (PC)	47,36	38,7 ± 6,8	0,77	87,4 ± 3,9	0,068 ± 0,029	0,98 ± 0,55
10 (PC)	47,35	48,9 ± 4,1	0,98	79,1 ± 13,9	0,051 ± 0,035	1,45 ± 0,95

GC = Consumo de glicerol (%); COVR = Carga Orgânica Volumétrica Removida;  $H_2$  = Conteúdo de  $H_2$  no biogás (%); HY = Rendimento de  $H_2$  (mol  $H_2$ /mol glicerol consumido); PVH = Produção volumétrica de  $H_2$  (L/L.d); PC = Ponto central.

*5.2.1 Efeito da concentração de glicerol bruto e do TDH na conversão do substrato e na carga orgânica volumétrica removida.*

É possível notar, na Tabela 5.17, que o consumo de glicerol variou de  $20,2\% \pm 3,7\%$  a  $98,4\% \pm 2,7\%$ , atingindo o seu valor máximo no ensaio 5. Nota-se ainda, que os pontos centrais apresentaram uma variação relativamente baixa ( $\sigma = 7,1983$ ), indicando uma boa reprodutibilidade do processo.

Diante dos resultados obtidos, foi possível determinar os coeficientes do modelo, que estão apresentados na Tabela 5.18. Excetuando-se o termo linear e quadrático da variável Glicerol ( $X_1$ ), todos os outros parâmetros do modelo foram não-significativos a um intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ). Dessa forma, o modelo polinomial de 2ª ordem, para as variáveis codificadas e significativas, é apresentado na Equação (17).

$$Y_1 = 43,8000 - 27,2989x_1 + 9,5688x_1^2 \quad (17)$$

Em que,  $Y_1$  representa o valor previsto do consumo de glicerol, e  $x_1$  e  $x_2$  são os valores codificados para as variáveis Glicerol e TDH, respectivamente.

**Tabela 5.18:** Coeficientes de regressão para a resposta CG.

Fatores	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão	t(4)	p-valor (Prob > F)
Média	43,8000	4,51654	9,6977	0,000633*
$x_1$ (L)	-27,2989	2,25827	-12,0884	0,000269*
$x_1$ (Q)	9,5688	2,98741	3,2030	0,032806*
$x_2$ (L)	3,1872	2,25817	1,4114	0,230979
$x_2$ (Q)	3,6438	2,98741	1,2197	0,289575
$x_1x_2$	-1,7500	3,19368	-0,5480	0,612864

$R^2 = 0,9754$ ,  $p < 0,05$ , Erro residual = 40,798

\*Efeitos significativos a 95% de confiança

O coeficiente de regressão obtido ( $R^2 = 0,9754$ ) indica que 97,54% da variabilidade pode ser explicada pelo modelo.

Diante dos resultados obtidos pela Análise de Variância (ANOVA) e descritos na Tabela 5.19, observa-se que, além do alto valor de  $R^2$ , o modelo construído para o Consumo de Glicerol apresentou um valor de F calculado (69,70) quase 15 vezes maior que o valor de F tabelado (4,74), refletindo a significância estatística da equação obtida.

**Tabela 5.19:** ANOVA para a resposta CG.

<b>Fonte de Variação</b>	<b>Soma Quadrática</b>	<b>Graus de Liberdade</b>	<b>Média Quadrática</b>	<b>Fcalculado</b>	<b>Ftabelado</b>
Regressão	6320,9	2	3160,4	69,7001	4,74
Resíduos	317,4	7	45,3		
Total	6638,3	9			

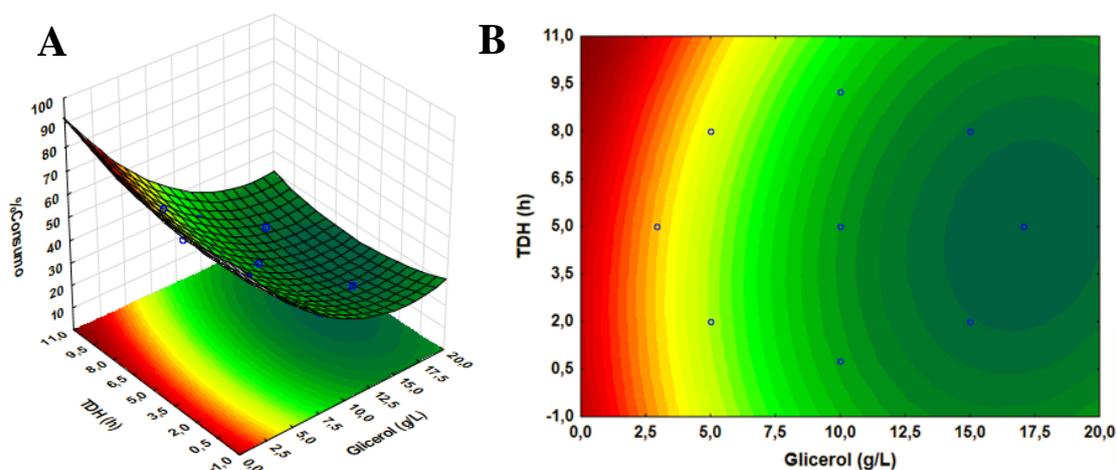
A Tabela 5.20 apresenta os valores experimentais obtidos e os valores previstos pelo modelo para o Consumo de Glicerol (CG), em porcentagem, bem como a %Ajuste do modelo. É possível observar que a %Ajuste para o modelo do Consumo de Glicerol ultrapassa 85% na grande maioria dos ensaios experimentais, o que indica a confiabilidade do modelo construído.

O DCCR, utilizado nesse trabalho, possibilitou a construção de um modelo para o Consumo de Glicerol que forneceu regiões ótimas bem definidas, nas condições operacionais exploradas. A análise da superfície de resposta, mostrada na Figura 5.12, permitiu inferir uma região de maximização da resposta avaliada. Observa-se que, diante dos resultados obtidos, a resposta CG independe da variável TDH ( $X_2$ ), sendo fortemente dependente da variável Concentração de Glicerol ( $X_1$ ). Dessa forma, alto Consumo de Glicerol foi obtido em concentrações de substrato abaixo de 5,0 g/L, em qualquer um dos TDHs testados.

**Tabela 5.20:** Valores previstos pelo modelo e a respectiva %Ajuste – CG.

Ensaio	$x_1$	$x_2$	CG	CG	%Ajuste
			Experimental	previsto	
1	-1	-1	83,4	85,7	97,2
2	1	-1	33,0	34,6	95,0
3	-1	1	91,8	89,2	97,2
4	1	1	34,4	31,1	90,6
5	-1,414	0	98,4	101,5	96,8
6	1,414	0	20,2	24,3	79,5
7	0	-1,414	41,9	57,5	62,9
8	0	1,414	53,0	57,5	91,6
9 (PC)	0	0	38,7	43,8	86,8
10 (PC)	0	0	48,9	43,8	89,5

PC: Ponto central

**Figura 5.12:** Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para %CG.

Apesar de ser estatisticamente preciso - como indica o valor do coeficiente de regressão obtido para este modelo (0,9754) - o resultado acima não condiz com os trabalhos relatados na literatura (Zhao et al., 2008), uma vez que a análise dos efeitos exercidos pelos parâmetros Glicerol e TDH na resposta %Conversão de substrato mostra independência do parâmetro TDH na resposta avaliada.

Por esse motivo, e de forma a complementar e compreender a análise de favorecimento das vias metabólicas da fermentação do glicerol, analisou-se também, o efeito dos parâmetros concentração de glicerol e TDH na carga orgânica volumétrica removida (COVR).

A carga orgânica volumétrica removida (COVR) é definida como a quantidade de matéria orgânica removida pelo reator, por unidade de tempo e por volume de meio do reator, conforme demonstrado na Equação (18):

$$COVR = \frac{v_0}{V_R} C_{A0} X_A \quad (18)$$

Em que  $v_0$  é o volume de água residuária alimentado por unidade de tempo (vazão – L/h),  $V_R$  é o volume do reator (L),  $C_{A0}$  é a concentração alimentada de afluente (g/L) e  $X_A$  é a conversão ou consumo do substrato. Para reatores operados em modo contínuo, como é o caso do reator RM utilizado neste estudo, o termo  $v_0 / V_R$  equivale ao tempo de detenção hidráulica (TDH) e a Equação (18) pode ser resumida pela Equação (19):

$$COVR = \frac{C_{A0} X_A}{TDH} \quad (19)$$

Ainda diante da Tabela 5.17, é possível observar que a carga orgânica volumétrica removida (COVR) variou de 0,57 a 5,51 g/L.h, atingindo o seu valor máximo no ensaio 7. Assim como para a resposta %Conversão de Glicerol, os pontos centrais apresentaram uma variação relativamente baixa ( $\sigma = 0,14397$ ), indicando uma boa reprodutibilidade do processo.

Analisando o efeito da concentração de glicerol bruto e do TDH na carga orgânica removida, foi possível determinar os coeficientes do modelo que estão apresentados na Tabela 5.21. Excetuando-se o termo linear e quadrático da variável TDH ( $X_2$ ), todos os outros parâmetros do modelo foram não-significativos a um

intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ). Dessa forma, o modelo polinomial de segunda ordem, para as variáveis codificadas e significativas, é apresentado na Equação (20):

$$Y_2 = 0,875 - 1,295x_2 + 0,988x_2^2 \quad (20)$$

Em que,  $Y_2$  representa o valor previsto do consumo de glicerol, e  $x_1$  e  $x_2$  são os valores codificados para as variáveis Glicerol e TDH, respectivamente.

**Tabela 5.21:** Coeficientes de regressão para a resposta COVR.

Fatores	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão	t(4)	p-valor (Prob > F)
Média	0,87500	0,49409	1,77095	0,15127
$x_1$ (L)	0,07996	0,49409	0,32368	0,76240
$x_1$ (Q)	-0,21688	0,65351	-0,66362	0,54323
$x_2$ (L)	-1,29453	0,49409	-5,24010	0,00634*
$x_2$ (Q)	0,98813	0,65351	3,02358	0,03903*
$x_1x_2$	-0,08250	0,69874	-0,23614	0,82492

$R^2 = 0,9120$ ,  $p < 0,05$ , Erro residual = 0,4882

\*Efeitos significativos a 95% de confiança

O coeficiente de regressão obtido ( $R^2 = 0,9120$ ) indica que 91,20% da variabilidade pode ser explicada pelo modelo.

Diante dos resultados obtidos pela Análise de Variância (ANOVA) e descritos na Tabela 5.22, observa-se que, além do alto valor de  $R^2$ , o modelo construído para a COVR apresentou um valor de  $F_{\text{calculado}}$  (31,09) quase 7 vezes maior que o valor de  $F$  tabelado (4,74), refletindo a significância estatística da equação obtida.

**Tabela 5.22:** ANOVA para a resposta COVR.

<b>Fonte de Variação</b>	<b>Soma Quadrática</b>	<b>Graus de Liberdade</b>	<b>Média Quadrática</b>	<b>Fcalculado</b>	<b>Ftabelado</b>
Regressão	20,00	2	10,00	31,0854	4,74
Resíduos	2,45	7	0,30		
Total	33,45	9			

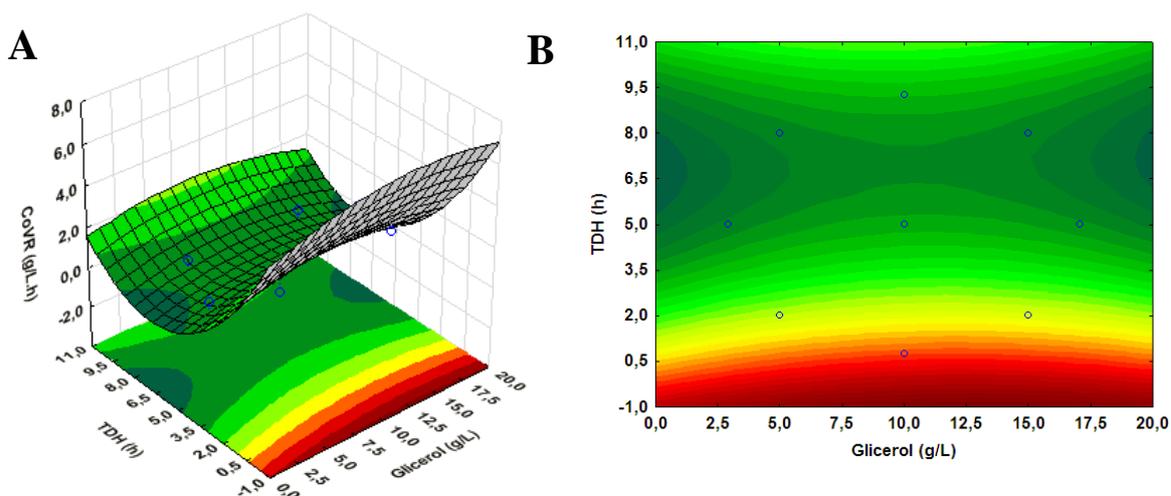
A Tabela 5.23 apresenta os valores experimentais obtidos e os valores previstos pelo modelo para a COVR, em g/L.h, bem como a %Ajuste do modelo. O DCCR, utilizado nesse trabalho, possibilitou a construção de um modelo para a Carga Orgânica Volumétrica Removida que forneceu regiões ótimas bem definidas, nas condições operacionais exploradas. A análise da superfície de resposta, mostrada na Figura 5.13, permitiu inferir uma região de maximização da resposta avaliada. De maneira oposta ao demonstrado pela resposta %CG, observa-se ainda que a resposta COVR é independente da variável Concentração de Glicerol ( $X_1$ ), se mostrando fortemente dependente da variável TDH ( $X_2$ ). Dessa forma, alta COVR foi obtida em TDHs abaixo de 2h, para qualquer concentração afluenta testada.

**Tabela 5.23:** Valores previstos pelo modelo e a respectiva %Ajuste – COVR.

<b>Ensaio</b>	<b><math>x_1</math></b>	<b><math>x_2</math></b>	<b>COVR Experimental</b>	<b>COVR previsto</b>	<b>%Ajuste</b>
1	-1	-1	2,09	0,57	27,21
2	1	-1	2,48	0,57	22,93
3	-1	1	0,58	0,57	98,03
4	1	1	0,65	0,57	87,48
5	-1,414	0	0,57	0,87	46,49
6	1,414	0	0,69	0,87	73,19
7	0	-1,414	5,51	0,26	4,76
8	0	1,414	0,57	0,26	46,03
9 (PC)	0	0	0,77	0,87	86,36
10 (PC)	0	0	0,98	0,87	89,28

PC: Ponto central

**Figura 5.13:** Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para COVR.



Na Tabela 5.20 é possível observar que as mais elevadas conversões de substrato foram obtidas nos ensaios 1 (83,4%), 3 (91,8%) e 5 (98,4%), que correspondem às concentrações de glicerol de 5,0, 5,0 e 2,9 g/L, respectivamente. Entretanto, diante da Tabela 5.23, nota-se que as mais elevadas COVRs ocorreram nos ensaios 1 (2,09), 2 (2,48) e 7 (5,51), que correspondem aos TDHs de 2h, 2h e 0,76h, respectivamente.

A carga orgânica volumétrica removida (COVR) está relacionada com a velocidade da biorreação, conforme mostrado na Equação (y). Vale destacar que essa biorreação é global, uma vez que é formada por muitas reações intermediárias referentes às rotas metabólicas (Figura 3.5), explicitadas no tópico 3.4 desta Dissertação.

Sendo assim, é possível afirmar que a influência do TDH indica uma mudança na velocidade da biorreação global em função do tempo disponibilizado para que as muitas reações intermediárias ocorram. Essas reações, por sua vez, mantêm um equilíbrio entre as rotas metabólicas quando o reator está em regime contínuo ou descontínuo.

Diante do resultado obtido na análise estatística, verifica-se que esse equilíbrio entre as rotas metabólicas depende unicamente do TDH, e que a disponibilidade de substrato não exerce a mesma influência, uma vez que as velocidades das biorreações se mantêm no mesmo equilíbrio em relação à concentração afluente. Neste último caso, com o equilíbrio se mantendo constante, pode-se afirmar que não ocorre mudança no “modelo cinético global”, o que indica que as velocidades estão sendo aumentadas proporcionalmente às quantidades alimentadas de substrato.

Dessa forma, diferentemente da resposta %Conversão de Glicerol, a análise dos parâmetros Glicerol e TDH na carga orgânica volumétrica removida apresentou resultados coerentes. É importante salientar que, apesar da variável %Conversão de Glicerol ser amplamente avaliada por diversos fatores, é necessário uma análise crítica a respeito do que pretende ser avaliado. No caso da presente Dissertação, a resposta %Conversão de Glicerol não apresentou resultados satisfatórios para a análise da rota metabólica, o que exigiu a análise de outra variável resposta.

A análise detalhada a respeito da influência da COVR nos rendimentos de H<sub>2</sub>, 1,3-propanodiol e ácido propiônico é mostrada no item 5.2.6.

### 5.2.2 Efeito da concentração de glicerol bruto e do TDH no conteúdo de H<sub>2</sub> no biogás

A Tabela 5.17 mostra que o conteúdo de H<sub>2</sub> no biogás variou de 0,0 a 87,4% ± 3,9%, atingindo o seu valor máximo no ensaio 9. Considerando os erros, observa-se que os pontos centrais obtiveram resultados muito semelhantes ( $\sigma = 5,8689$ ), indicando uma boa reprodutibilidade do processo.

Diante dos resultados obtidos, foi possível determinar os coeficientes do modelo, que estão apresentados na Tabela 5.24. Excetuando-se o termo linear e quadrático da variável Glicerol ( $X_1$ ) e o termo quadrático da variável TDH ( $X_2$ ), todos os outros parâmetros do modelo foram não-significativos a um intervalo de confiança de 90% ( $p < 0,10$ ). Dessa forma, o modelo polinomial de segunda ordem, para as variáveis codificadas e significativas, é apresentado na Equação (21):

$$Y_3 = 83,2500 + 26,6724x_1 - 25,9438x_1^2 - 24,6188x_2^2 \quad (21)$$

Em que,  $Y_3$  representa o valor previsto do conteúdo de H<sub>2</sub> no biogás, e  $x_1$  e  $x_2$  são os valores codificados para as variáveis glicerol e TDH, respectivamente.

**Tabela 5.24:** Coeficientes de regressão para a resposta %H<sub>2</sub>.

Fatores	Coefficientes de Regressão	Erro Padrão	t(1)	p-valor (Prob > F)
Média	83,2500	4,1500	20,0602	0,031709*
x <sub>1</sub> (L)	26,6724	2,0750	12,8542	0,049427*
x <sub>1</sub> (Q)	-25,9438	2,7450	-9,4514	0,067108*
x <sub>2</sub> (L)	-6,9343	2,0750	-3,3418	0,185102
x <sub>2</sub> (Q)	-24,6188	2,7450	-8,9687	0,070691*
x <sub>1</sub> x <sub>2</sub>	13,8500	2,9345	4,7197	0,132919

R<sup>2</sup> = 0,7467, p < 0,10, Erro residual = 810,511

\*Efeitos significativos a 90% de confiança

O coeficiente de regressão obtido (R<sup>2</sup> = 0,7467) indica que 74,67% da variabilidade pode ser explicada pelo modelo.

Diante dos resultados obtidos na Análise de Variância (ANOVA) e descritos na Tabela 5.25, observa-se que, além do razoável valor de R<sup>2</sup>, o modelo construído para o conteúdo de H<sub>2</sub> no biogás apresentou um valor de F calculado (4,75) maior que o valor de F tabelado (3,29), refletindo a significância estatística da equação obtida.

**Tabela 5.25:** ANOVA para a resposta %H<sub>2</sub>.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Fcalculado	Ftabelado
Regressão	11538,9	3	3846,3	4,7455	3,29
Resíduos	4863,1	6	810,5		
Total	16402,0	9			

A Tabela 5.26 apresenta os valores experimentais obtidos e os valores previstos pelo modelo para o conteúdo de H<sub>2</sub> no biogás (%H<sub>2</sub>), em porcentagem, bem como a %Ajuste do modelo. É possível observar que na região ótima – região dos pontos

centrais - a %Ajuste do modelo é de aproximadamente 95%, o que indica a confiabilidade do modelo construído.

O DCCR, utilizado nesse trabalho, possibilitou a construção de um modelo para o conteúdo de  $H_2$  no biogás que forneceu regiões ótimas bem definidas, nas condições operacionais exploradas. A análise da superfície de resposta, mostrada na Figura 5.14, permitiu inferir uma região de maximização da resposta avaliada. Com o auxílio de métodos matemáticos aplicados à equação do modelo, tem-se que os pontos ótimos obtidos correspondem à concentração de 12,57 g/L de glicerol e TDH de 5,01 horas.

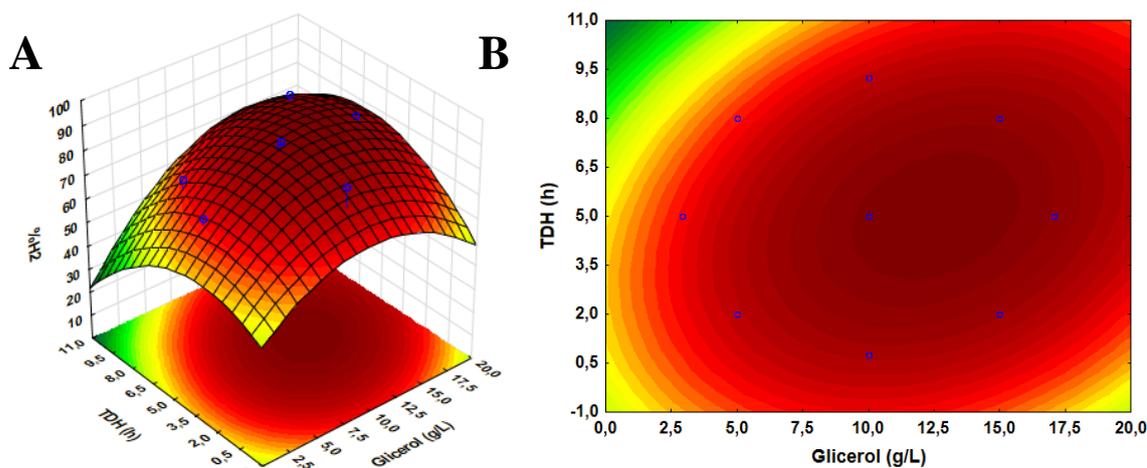
É importante ressaltar que o biogás produzido no reator RM foi composto apenas de  $H_2$  e  $CO_2$ , não sendo detectada a ocorrência de metano em nenhum momento durante a operação do reator. Este fato pode ser atribuído ao sucesso no tratamento térmico do inóculo utilizado no reator, o que propiciou a eliminação das arqueas metanogênicas.

**Tabela 5.26:** Valores previstos pelo modelo e a respectiva %Ajuste – % $H_2$ .

Ensaio	$x_1$	$x_2$	% $H_2$		%Ajuste
			Experimental	previsto	
1	-1	-1	0,0	12,9	0,0
2	1	-1	27,3	38,6	58,7
3	-1	1	0,0	-14,8	0,0
4	1	1	82,7	66,3	80,1
5	-1,414	0	0,0	-6,3	0,0
6	1,414	0	73,1	69,1	94,5
7	0	-1,414	78,4	20,2	25,7
8	0	1,414	0,0	20,2	0,0
9 (PC)	0	0	87,4	83,3	95,3
10 (PC)	0	0	79,1	83,3	94,8

PC: Ponto central

**Figura 5.14:** Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para %H<sub>2</sub>.



De acordo com a Tabela 5.26, é possível observar que houve uma grande variação do conteúdo percentual de hidrogênio no biogás produzido. Excetuando-se o ensaio 8 (10,0 g/L), observa-se que as porcentagens de hidrogênio nulas ocorreram nas condições de menor concentração de substrato, correspondentes aos ensaios 1 (5,0 g/L), 3 (5,0 g/L) e 5 (2,9 g/L).

No presente trabalho, o baixo conteúdo de hidrogênio constatado nestes ensaios experimentais pode ser justificado pelo favorecimento da rota de produção do ácido propiônico e/ou via redutiva da fermentação do glicerol, com produção de 1,3-propanodiol, visto que estes compostos foram obtidos em concentrações elevadas nesses ensaios experimentais (descrição detalhada no item 5.2.4. deste capítulo).

De forma a argumentar o resultado obtido, ressalta-se que para a formação de 1 mol de 1,3-propanodiol, 1 mol de H<sub>2</sub> é consumido (Equação 9 – Capítulo 3) e que os maiores rendimentos de produção de hidrogênio estão associados com a geração de ácido acético e butírico, o que não é o caso dos ensaios analisados anteriormente. Destaca-se ainda que, de acordo com Koskinen et al. (2007), a comunidade microbiana presente no biofilme pode se tornar, ao longo do tempo, enriquecida com produtores de propionato, uma vez que eles possuem melhores propriedades de adesão que os produtores de H<sub>2</sub>. Essa peculiaridade ocasiona a redução da produção de hidrogênio e o favorecimento da produção de ácido propiônico.

Por outro lado, alto percentual de hidrogênio no biogás foi obtido ao utilizar concentração de glicerol acima de 10,0 g/L, exceto nos ensaios 2 e 8. Alguns pesquisadores reportaram resultados semelhantes ao presente trabalho.

Selembo et al. (2009) compararam a produção de H<sub>2</sub> e 1,3-Propanodiol a partir de glicerol puro e bruto, ambos na concentração de 3,0 g/L, em ensaios em batelada utilizando inóculo misto proveniente de solo de trigo tratado termicamente. Os experimentos foram conduzidos em temperatura mesofílica de 30°C e o pH ajustado para 7,0. Os autores verificaram que o maior percentual de H<sub>2</sub> no biogás foi obtido com o glicerol bruto do que com a glicerina pura (61% vs. 53%), após 18h de fermentação.

Lo et al. (2013), citado anteriormente, produziram H<sub>2</sub> utilizando cultura pura de microrganismos (*C. pasteurianum*) em um reator de tanque agitado mesofílico. A concentração de glicerol e o TDH foram fixados em 10,0 g/L e 12h. Em tais condições, o percentual de H<sub>2</sub> obtido foi em torno de 75%. O elevado percentual de H<sub>2</sub> atingido, ainda menor que os obtidos em alguns ensaios experimentais deste trabalho, pode ser justificado pelas condições operacionais adotadas, já que, para os autores, estas foram condições ótimas para a produção de hidrogênio.

Reungsang et al. (2013a) avaliaram a produção de hidrogênio em reator UASB por meio *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, utilizando glicerol bruto e puro (25,0 g/L) como substrato. Com o intuito de maximizar a taxa de produção de H<sub>2</sub>, a TCO variou de 25,0 a 75,0 kg/m<sup>3</sup>.dia, para os testes com glicerol puro, e de 37,5 a 62,5 kg/m<sup>3</sup>.dia ao utilizar glicerol bruto. Os autores observaram que tanto nos menores valores de TCO, quanto nos maiores, o percentual de H<sub>2</sub> foi reduzido. A condição ótima de TCO encontrada foi de 50,0 kg/m<sup>3</sup>.dia, gerando um conteúdo de H<sub>2</sub> máximo de 37,1% para o glicerol puro e de 24,2% para o glicerol bruto.

Chookaew et al. (2014) avaliaram a produção de H<sub>2</sub> em reator UASB, por meio de *Klebsiella sp.* TR17, utilizando glicerol bruto como substrato. Os autores avaliaram a influência das diferentes concentrações de glicerol empregadas (10, 20 e 30 g/L) em diferentes TDHs (12, 10, 8, 6, 4 e 2h). Nas concentrações de 10 g/L e 30 g/L, o conteúdo de H<sub>2</sub> apresenta um comportamento semelhante, permanecendo em torno de 25% nos TDHs de 12 e 10h. Porém, entre os TDHs de 8 e 2h, o percentual de H<sub>2</sub> se mantém constante em, aproximadamente, 45%.

Poucos trabalhos na literatura relatam a produção de hidrogênio em reatores contínuos. Menor ainda é a quantidade de trabalhos que abordam esse assunto utilizando reatores anaeróbios de leito fluidificado (RALF). Como exemplos deste último caso, pode-se citar os trabalhos desenvolvidos pelo grupo de pesquisa do LCAII/DEQ/UFSCar, mais especificamente por Ferreira (2014) e Nazareth (2015).

Ferreira (2014) e Nazareth (2015) trabalharam com sistemas bastante parecidos. Ambas as autoras avaliaram a produção de hidrogênio, álcoois e ácidos orgânicos em reatores anaeróbios de leito fluidificado, utilizando glicerol bruto (5,0 g/L) como substrato na fermentação. Ferreira (2014) trabalhou em condições termofílicas (55°C), TDH variando de 14h a 1h e cinasita como material suporte. A autora relata estabilidade do conteúdo de H<sub>2</sub> no biogás, em torno de 60%, em todas as fases de operação do reator, tendo o seu ponto mínimo no TDH de 10h (50%) e o ponto máximo no TDH de 1h (70%). Nazareth (2015), por sua vez, trabalhou em condições mesofílicas (30°C), TDH variando de 8h a 0,5h e pneu triturado como material suporte. A autora relata um aumento do conteúdo de H<sub>2</sub> com a diminuição do TDH, atingindo o seu valor mínimo no TDH de 6h (12,4%) e o valor máximo no TDH de 0,5h (81,2%).

### *5.2.3 Efeito da concentração de glicerol e do TDH no rendimento de H<sub>2</sub>.*

É possível notar, na Tabela 5.17, que o rendimento de H<sub>2</sub> variou de 0,000 a  $0,170 \pm 0,057$  mol H<sub>2</sub> / mol glicerol consumido, atingindo o seu valor máximo no ensaio 6. De maneira semelhante aos outros modelos construídos, os pontos centrais do modelo de rendimento de H<sub>2</sub> apresentaram uma pequena variação ( $\sigma = 0,0120$ ), indicando uma boa reprodutibilidade do processo.

Diante dos resultados obtidos, foi possível determinar os coeficientes do modelo, que estão apresentados na Tabela 5.27. Observa-se que, excetuando-se o termo linear da variável Glicerol (X<sub>1</sub>), todos os outros parâmetros do modelo foram não-significativos a um intervalo de confiança de 90% ( $p < 0,10$ ). No entanto, de modo grosseiro, é possível notar que o termo quadrático da variável TDH (X<sub>2</sub>) e o termo de interação entre as duas variáveis, possuem p-valor próximo ao limite ( $p < 0,10$ ), o que confere à superfície do modelo uma ligeira curvatura. Dessa forma, o modelo polinomial de segunda ordem completo, para as variáveis codificadas, é apresentado na Equação (22):

$$Y_4 = 0,0595 + 0,0447x_1 + 0,0051x_1^2 + 0,0009x_2 - 0,0201x_2^2 + 0,0263x_1x_2 \quad (22)$$

Em que,  $Y_4$  representa o valor previsto do rendimento de  $H_2$ , e  $x_1$  e  $x_2$  são os valores codificados para as variáveis Glicerol e TDH, respectivamente.

**Tabela 5.27:** Coeficientes de regressão para a resposta HY.

Fatores	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão	t(1)	p-valor (Prob > F)
Média	0,0595	0,0085	7,0000	0,090334*
$x_1$ (L)	0,0447	0,0043	10,5122	0,060378*
$x_1$ (Q)	0,0051	0,0056	0,9116	0,529432
$x_2$ (L)	0,0009	0,0043	0,2182	0,863225
$x_2$ (Q)	-0,0201	0,0056	-3,5796	0,173428
$x_1x_2$	0,0263	0,0060	4,3674	0,143295

$R^2 = 0,7054$ ,  $p < 0,10$ , Erro residual = 0,00184

\*Efeitos significativos a 90% de confiança

O coeficiente de regressão obtido ( $R^2 = 0,7054$ ) indica que 70,54% da variabilidade pode ser explicada pelo modelo.

Diante dos resultados obtidos na Análise de Variância (ANOVA) e descritos na Tabela 5.28, observa-se que, além do razoável valor de  $R^2$ , o modelo construído para o conteúdo de  $H_2$  no biogás apresentou um valor de F calculado (8,68) maior que o valor de F tabelado (3,46), refletindo a significância estatística da equação obtida.

**Tabela 5.28:** ANOVA para a resposta HY.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Fcalculado	Ftabelado
Regressão	0,015968	1	0,015968	8,6830	3,46
Resíduos	0,014712	8	0,001839		
Total	0,030681	9			

A Tabela 5.29 apresenta os valores experimentais obtidos e os valores previstos pelo modelo para o rendimento de  $H_2$  (HY), em mol  $H_2$  / mol glicerol consumido, bem como a %Ajuste do modelo. É possível observar que na região ótima – região dos pontos centrais e região à direita da curva de contorno (Figura 5.15 B) - a %Ajuste do modelo é de aproximadamente 80%, o que indica a confiabilidade do modelo construído.

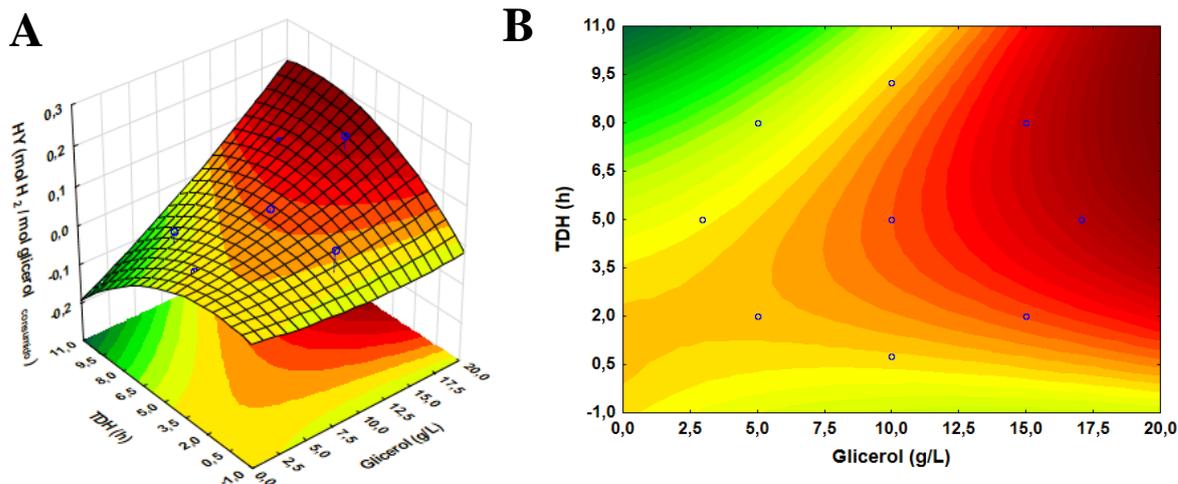
O DCCR, utilizado nesse trabalho, possibilitou a construção de um modelo para o rendimento de  $H_2$  que forneceu regiões ótimas bem definidas, nas condições operacionais exploradas. A análise da superfície de resposta, mostrada na Figura 5.15, permitiu inferir uma região de maximização da resposta avaliada. Dessa forma, a partir dos resultados obtidos, é possível observar que o máximo rendimento de hidrogênio pode ser alcançado utilizando concentrações de glicerol superiores a 10,0 g/L para TDHs maiores que 2 horas.

**Tabela 5.29:** Valores previstos pelo modelo e a respectiva %Ajuste – HY.

Ensaio	$x_1$	$x_2$	HY	HY	%Ajuste
			Experimental	previsto	
1	-1	-1	0,000	0,027	0,0
2	1	-1	0,006	0,064	-874,9
3	-1	1	0,000	-0,025	0,0
4	1	1	0,111	0,116	95,2
5	-1,414	0	0,000	0,007	0,0
6	1,414	0	0,170	0,133	78,2
7	0	-1,414	0,069	0,021	30,4
8	0	1,414	0,000	0,021	0,00
9 (PC)	0	0	0,068	0,060	87,5
10 (PC)	0	0	0,051	0,060	83,3

PC: Ponto central

**Figura 5.15:** Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para HY.



De forma similar ao discutido para o conteúdo de  $H_2$  no biogás, o rendimento de hidrogênio também apresentou bastante variação dentre as condições testadas. Observa-se na Tabela 5.29 que, excetuando-se os ensaios 2 e 8, os maiores rendimentos de hidrogênio foram obtidos em concentrações acima de 10,0 g/L.

Por outro lado, em concentrações baixas de substrato, não houve rendimento de hidrogênio, como é o caso dos ensaios 1, 3 e 5. A mesma justificativa acerca das elevadas concentrações de 1,3-propanodiol e ácido propiônico nestes ensaios, utilizada no item anterior, também se aplica a este caso.

Diante da Tabela 5.29 é possível notar que o maior rendimento de hidrogênio apresentado por este trabalho foi obtido no ensaio 6 e corresponde a 0,17 mol  $H_2$  / mol glicerol consumido. Salienta-se que o resultado obtido é muito baixo quando comparado com outros trabalhos que utilizaram reatores contínuos.

Reungsang et al. (2013a) trabalharam com reator UASB e utilizaram glicerina pura e buta na fermentação. Ao utilizarem glicerina pura como substrato, os autores observaram um aumento na produção volumétrica e no rendimento de  $H_2$  quando a TCO aumentou de 25,0 a 50 kg/m<sup>3</sup>.dia, onde alcançou a máxima produção volumétrica de 9,0 mmol  $H_2$ /L.h e o máximo rendimento de 0,41 mol  $H_2$ /mol glicerol consumido. No entanto, ao continuar aumentando a TCO até 75,0 kg/m<sup>3</sup>.dia, houve um declínio da produção volumétrica e do rendimento de  $H_2$ . Da mesma forma, utilizando glicerol bruto como substrato, os autores verificaram que, apesar do rendimento (0,324 mol  $H_2$  /

mol glicerol consumido) e da produção volumétrica (6,2 mmol H<sub>2</sub>/L.h) serem inferiores quando comparados com os observados a partir da glicerina pura, ambos os parâmetros apresentaram seu valor máximo na TCO de 50,0 kg/m<sup>3</sup>.dia, o que indica a ocorrência de uma TCO ótima na produção de H<sub>2</sub> por meio de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048.

Lo et al. (2013) avaliaram a produção contínua de hidrogênio em CSTR a partir de *C. pasteurianum* CH4, utilizando glicerol bruto e glicerina pura como fontes de carbono. Em ambos os casos, os autores utilizaram concentração inicial de glicerol de 10 g/L e TDH de 12h. Ao contrário de Reungsang et al. (2013a), os autores observaram melhores resultados de produção volumétrica e rendimento de hidrogênio ao utilizarem o glicerol bruto (3,98 L/L.d; 0,77 mol H<sub>2</sub> / mol glicerol consumido), quando comparado com a glicerina pura (2,47 L/L.d; 0,50 mol H<sub>2</sub> / mol glicerol consumido).

Ferreira (2014), como citado anteriormente, avaliou a produção de H<sub>2</sub> em RALF termofílico (55°C), utilizando glicerol bruto (5,0 g/L) como substrato e cinasita como material suporte. A autora observou que a produção volumétrica de hidrogênio aumentou com a diminuição do TDH e consequente aumento da TCO. A máxima PVH alcançada foi de 36,2 L/L.d (61,1 mmol H<sub>2</sub>/L.h) no TDH de 1h. O rendimento, por sua vez, se manteve praticamente constante durante os TDH de 14 a 2h. Entretanto, o máximo rendimento obtido, 3,0 mols H<sub>2</sub>/mol glicerol consumido, foi também observado no TDH de 1h.

A Tabela 5.30, mostrada na sequência, apresenta a performance de produção de hidrogênio do reator RM em comparação com outros trabalhos na literatura. É possível observar, por exemplo, que o conteúdo de hidrogênio obtido por este trabalho (87,4%) é o maior dentre os resultados compilados. No quesito produção volumétrica, o presente trabalho obteve resultados semelhantes aos de Lo et al. (2013) e Reungsang et al. (2013a). No entanto, o rendimento de H<sub>2</sub>, expressado em mol H<sub>2</sub> / mol glicerol consumido, não apresentou resultados expressivos.

**Tabela 5.30:** Comparação da performance de produção de hidrogênio entre o trabalho atual e os reportados na literatura.

Tipo de Reator	Glicerol (g/L)	TDH (h)	Inóculo	H <sub>2</sub> (%)	HY (mol / mol glicerol consumido)	HPR (mmol/L.h)	Referência
Leito Fixo	GP 10,0	NI	<i>E. aerogenes</i> HU-101	NI	NI	80,0	ITO et al. (2005)
	GB 10,0					30,0	
Batelada	GP 3,0	18	Misto	53,0	0,28	NI	SELEMBO et al. (2009)
	GB 3,0			61,0	0,31		
CSTR	GP 10,0	12	<i>C. pasteurianum</i>	78,3	0,50	4,07*	LO et al. (2013)
	GB 10,0			72,7	0,77	6,56*	
UASB	GP 25,0	12*	<i>E. aerogenes</i>	37,1	0,41	9,00	REUNGSANG et al. (2013a)
	GB 25,0		<i>ATCC 13048</i>	24,2	0,32	6,20	
UASB	GB 10 - 30	12 – 2	<i>Klebsiella sp. TR17</i>	45,0 (4h)	4,07* (4h)	10,1 (4h)	CHOOKAEW et al. (2014)
RALF (55°C)	GB 5,0	14 – 1	Misto	60,0	3,0 (1h)	61,1 (1)	FERREIRA (2014)
RALF (30°C)	GB 5,0	8 – 0,5	Misto	81,2 (0,5h)	NI	0,53* (1h)	NAZARETH (2015)
RALF	GB 2,9-17,1	9,24-0,75	Misto	87,4 (10 g/L; 5h)	0,17 (17,1 g/L; 5h)	9,74 (10 g/L; 0,75h)	Este estudo

GP: glicerina pura; GB: glicerol bruto; NI: não informado; \*calculado com base nas informações do artigo.

#### 5.2.4 Metabólitos solúveis produzidos no reator RM

Os principais metabólitos obtidos no presente trabalho foram: ácido propiônico (HPr), 1,3-propanodiol (1,3-PD), ácido butírico (HBu), ácido acético (HAc), Butanol (ButOH) e Etanol (EtOH). Na Tabela 5.31 estão apresentadas as concentrações dos principais metabólitos produzidos nos ensaios experimentais realizados no reator RM.

**Tabela 5.31:** Concentração ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) dos principais metabólitos produzidos no reator RM nos 10 ensaios experimentais.

Ensaio	1,3-PD	EtOH	ButOH	HAc	HPr	HBu
1	1843 $\pm$ 167,7	13 $\pm$ 8,2	ND	59 $\pm$ 20,4	1298 $\pm$ 331,8	27 $\pm$ 17,1
2	2070 $\pm$ 477,6	15 $\pm$ 4,7	ND	70 $\pm$ 16,8	2696 $\pm$ 278,3	81 $\pm$ 24,2
3	252 $\pm$ 44,5	6 $\pm$ 2,2	ND	27 $\pm$ 8,9	973 $\pm$ 20,7	15 $\pm$ 3,5
4	275 $\pm$ 36,8	7 $\pm$ 1,0	54 $\pm$ 7,2	133 $\pm$ 36,7	1673 $\pm$ 116,6	143 $\pm$ 18,0
5	1102 $\pm$ 234,0	ND	ND	45 $\pm$ 21,7	314 $\pm$ 55,6	13 $\pm$ 5,2
6	199 $\pm$ 61,9	12 $\pm$ 3,6	281 $\pm$ 90,4	114 $\pm$ 24,1	695 $\pm$ 37,8	149 $\pm$ 14,2
7	311 $\pm$ 170,8	7 $\pm$ 7,5	27 $\pm$ 3,3	51 $\pm$ 21,3	412 $\pm$ 55,4	123 $\pm$ 38,1
8	4475 $\pm$ 337,6	3 $\pm$ 4,0	ND	21 $\pm$ 39,0	964 $\pm$ 269,1	33 $\pm$ 5,9
9 (PC)	769 $\pm$ 84,6	11 $\pm$ 1,9	51 $\pm$ 8,2	97 $\pm$ 17,5	966 $\pm$ 87,4	99 $\pm$ 8,7
10 (PC)	719 $\pm$ 99,0	3 $\pm$ 1,1	ND	71 $\pm$ 6,2	1156 $\pm$ 99,6	39 $\pm$ 6,9

1,3-PD: 1,3-propanodiol; EtOH: etanol; ButOH: butanol; HAc: ácido acético; HPr: ácido propiônico, HBu: ácido butírico; ND: Não detectado; PC: ponto central

Diante da Tabela 5.31, observa-se que houve um predomínio de 1,3-propanodiol e ácido propiônico em todos os ensaios experimentais. As máximas concentrações obtidas destes compostos foram de 4,475 g/L de 1,3-PD (ensaio 8) e de 2,696 g/L de HPr (ensaio 2). Baixas concentrações de etanol, ácido acético e butírico foram verificadas. Além disso, salienta-se que butanol foi produzido em apenas alguns ensaios experimentais.

Na Tabela 5.32 e na Figura 5.16 destacam-se a porcentagem molar dos metabólitos em cada um dos 10 ensaios experimentais realizados no reator RM. Nota-se que o máximo

percentual de 1,3-propanodiol alcançado foi de 80,5%, no ensaio 8, e para o ácido propiônico, alcançou-se 74,1% no ensaio 3.

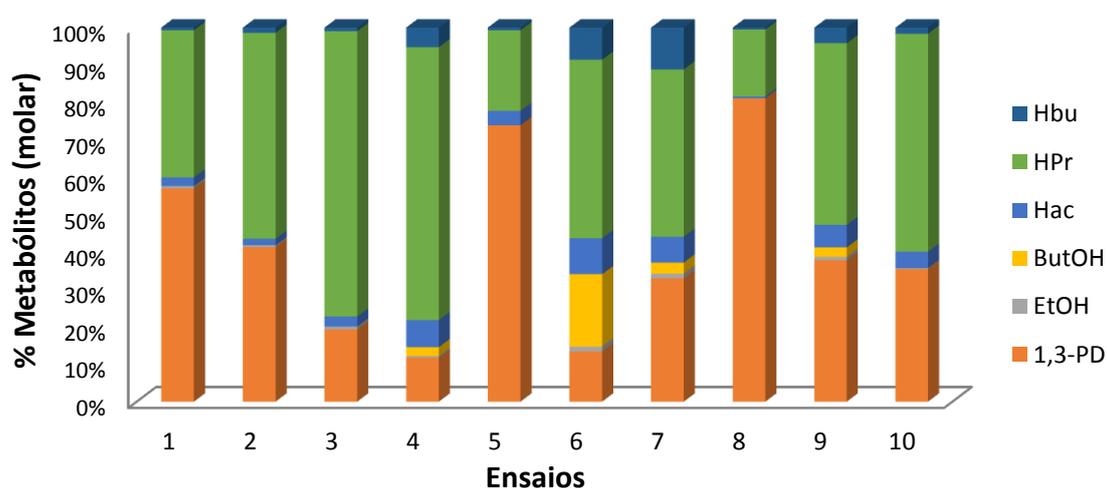
É importante ressaltar a reprodutibilidade dos resultados obtidos. Os pontos centrais do planejamento experimental proposto, compostos pelos ensaios 9 e 10, apresentaram resultados bastante semelhantes diante das mesmas condições operacionais aplicadas. Observa-se uma baixa variação nas concentrações e na fração molar dos metabólitos, especialmente para 1,3-propanodiol e ácido propiônico.

**Tabela 5.32:** Porcentagem molar dos principais metabólitos obtidos no reator RM nos 10 ensaios experimentais.

Ensaio	1,3-PD	EtOH	ButOH	HAc	HPr	HBu
1	55,2	0,6	0,0	2,2	38,2	0,7
2	40,0	0,5	0,0	1,7	53,5	1,4
3	18,7	0,8	0,0	2,6	74,1	0,9
4	11,5	0,5	2,3	7,0	71,7	5,2
5	71,1	0,0	0,0	3,7	20,8	0,7
6	13,4	1,3	19,4	9,7	48,0	8,7
7	32,0	1,2	2,9	6,7	43,6	10,9
8	80,5	0,1	0,0	0,5	17,8	0,5
9 (PC)	37,5	0,9	2,5	6,0	48,4	4,2
10 (PC)	35,0	0,2	0,0	4,4	57,8	1,6

1,3-PD: 1,3-propanodiol; EtOH: etanol; ButOH: butanol; HAc: ácido acético; HPr: ácido propiônico, HBu: ácido butírico; PC: ponto central.

**Figura 5.16:** Porcentagem molar dos principais metabólitos produzidos nos 10 ensaios experimentais.



Retomando os resultados obtidos acerca do rendimento e conteúdo de hidrogênio, discutidos anteriormente, é possível observar, com maior clareza, que nos ensaios 1, 5 e 8, em que não houve produção de hidrogênio, é verificada alta produção de 1,3-propanodiol. Sabe-se que, de acordo com a equação (9), apresentada por Zeng et al. (1993) e reescrita no tópico 3.4 do capítulo 3 desta dissertação, a formação de 1,3-propanodiol a partir do glicerol resulta no consumo de 1 mol de H<sub>2</sub> por mol de glicerol, o que justifica a produção nula de hidrogênio diante do alto teor de 1,3-propanodiol produzido.

Por outro lado, trabalhos que visaram a produção de hidrogênio, a partir do glicerol, reportaram o etanol, ácido acético, ácido butírico e ácido fórmico como principais produtos da fermentação. Como exemplo, pode-se citar o estudo de Ito et al. (2005) e de Sittijunda & Reungsang (2012) que avaliaram a produção de H<sub>2</sub> em ensaios em batelada. Esta condição também foi verificada no presente trabalho, uma vez que, nos ensaios com maiores rendimentos de hidrogênio (4, 6, 7, 9 e 10) também foram constatados teores significativos de ácido butírico e/ou acético.

Ao utilizar cultura *Enterobacter aerogenes* HU-101, Ito et al. (2005) verificaram alta produção de etanol, acetato e formato concomitante com o alto rendimento de H<sub>2</sub> obtido. No entanto, a maior produção de 1,3-propanodiol ocorreu na condição de menor rendimento de H<sub>2</sub>. Esse resultado foi observado nos testes utilizando tanto resíduo de glicerol (1,7 – 25 g/L) quanto com glicerina pura (5,0 – 25,0 g/L).

Sittijunda & Reungsang (2012), por sua vez, otimizaram a composição do meio de cultura que afetava a produção de biohidrogênio por culturas termofílicas, utilizando glicerol bruto (10 – 30 g/L) como substrato na fermentação. Os autores obtiveram como concentrações ótimas 20,33 g/L de glicerol bruto, 0,16 g/L de uréia, 3,97 g/L de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 0,20 mL/L de solução Endo-nutriente. O máximo rendimento de H<sub>2</sub> obtido foi de 0,30 mol H<sub>2</sub>/mol glicerol, no entanto, esse produto representa apenas 3,81% dos metabólitos produzidos. Os metabólitos gerados no processo foram 1,3-PD (24,83%), etanol (26,87%), ácido acético (9,87%), ácido butírico (9,41%) e ácidos láctico, fórmico e propiônico (<6,5%). Dessa forma, o baixo rendimento de H<sub>2</sub> obtido pode ser explicado pelo favorecimento da via redutiva em função da alta concentração de glicerol, o que refletiu com a majoritária produção de 1,3-PD (DABROCK et al., 1992).

Como exemplo de estudo desenvolvido em reatores contínuos, destaca-se o trabalho de Reungsang et al. (2013a), que avaliou a produção de H<sub>2</sub> em reator UASB, utilizando

glicerol bruto (25 g/L) como substrato, por meio de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048. Ao variar a TCO de 37,5 a 62,5 kg/m<sup>3</sup>.dia, os autores verificaram um aumento na concentração de metabólitos solúveis produzidos ao aumentar a TCO de 37,5 a 50,0, e um decréscimo quando a TCO ultrapassava 50,0 kg/m<sup>3</sup>.dia. A alta concentração de etanol (5067,7 mg/L), ácido acético (1122,9 mg/L) e fórmico (3061,0 mg/L) se correlaciona com o alto conteúdo e produtividade de H<sub>2</sub>, obtidos na TCO de 50,0 kg/m<sup>3</sup>.dia. Por outro lado, altas concentrações de 1,3-propanodiol (760,9 mg/L), ácido propiônico (1281,6 mg/L) e láctico (387,3 mg/L) foram observadas na TCO de 37,5 kg/m<sup>3</sup>.dia e estão correlacionadas com a baixa produção de H<sub>2</sub> nesta condição.

Chookaew et al. (2014) produziram hidrogênio a partir de glicerol bruto em UASB imobilizando a *Klebsiella sp. TR1*. Nas condições de 40°C e pH inicial de 8, o reator foi operado em seis TDHs diferentes, variando entre 12h e 2h. Nas três concentrações de glicerol adotadas (10, 20 e 30 g/L), houve a predominância de 1,3-propanodiol em todos os TDHs operados. O máximo teor de 1,3-propanodiol, como produto solúvel majoritário, foi alcançado no TDH de 12h, para todas as concentrações de glicerol testadas, e o máximo valor foi de 9,0 g/L para 20,0 g/L de glicerol. De maneira conjunta ácido acético, etanol e 2,3-butanodiol também foram produzidos, em menores concentrações.

Na Tabela 3.4 do capítulo 3 da presente dissertação, observa-se que o grau de redução do produto 1,3-propanodiol é superior ( $\gamma = 5,33$ ) ao do substrato glicerol ( $\gamma = 4,67$ ), ou seja, 1,3-propanodiol é mais reduzido que o glicerol, e a formação desse produto a partir desse substrato leva ao consumo de equivalentes redutores (NADH<sub>2</sub>). Entretanto, de acordo com Liu et al. (2011), o fornecimento insuficiente de equivalentes redutores, pode levar a um deslocamento da via metabólica para a formação de acetato ( $\gamma = 4,00$ ) e/ou produtos mais oxidados, como por exemplo, biomassa ( $\gamma = 4,29$ ). De fato, verificou-se um expressivo crescimento de biomassa na maioria das fases de operação do reator RM, além de uma significativa produção de ácido acético.

Dessa forma, a produção concomitante de acetato e biomassa é capaz de suprir a necessidade de equivalentes redutores para a formação de 1,3-propanodiol. Além disso, o adequado fornecimento de NADH<sub>2</sub>, pode levar a um deslocamento da via metabólica para a formação de ácido propiônico. Esse fato é justificado pela similaridade do grau de redução do glicerol e do ácido propiônico (ambos 4,67), o que exclui a necessidade de geração de outros metabólitos para equilibrar o balanço redox. Esses argumentos corroboram para a

explicação do perfil de metabólitos apresentados na Figura 5.15, em que é visível a presença predominante de 1,3-propanodiol e ácido propiônico.

Comportamento semelhante é verificado no trabalho de Ferreira (2014) e Nazareth (2015). Ambas as autoras operaram RALF, utilizando glicerol bruto (5,0 g/L) como substrato na fermentação e inóculo misto de microrganismos. Ferreira (2014) obteve majoritariamente 1,3-propanodiol, etanol, ácido acético, ácido butírico e ácido propiônico como subprodutos da fermentação termofílica. Entre os TDH de 14h a 2h, houve a predominância de 1,3-propanodiol, etanol, ácido acético e butírico. No entanto, ao reduzir o TDH para 1h, a autora verificou o favorecimento da produção de ácido propiônico, atingindo as frações molares, em porcentagem, de 56% de ácido propiônico, 30% de 1,3-propanodiol, 11% de ácido acético e 3% de outros produtos.

Nazareth (2015), por sua vez, reporta percentuais estáveis de HPr nos TDHs de 8 a 4h, variando entre 66,6 a 69,1%. O máximo percentual de HPr (96,9%) foi atingido no TDH de 0,5h. Da mesma forma, o percentual de 1,3-PD se manteve estável nos TDHs de 8 a 4h, variando entre 27,4 e 29,4%. No entanto, a diminuição do percentual nos TDHs de 2h (16,3%) e 1h (7,8%) também é atribuída ao favorecimento da rota oxidativa.

A produção concomitante de 1,3-propanodiol e butanol também foi relatada por Moon et al. (2011). Os autores realizaram um estudo de otimização de componentes do meio de cultura favorecendo a produção dos dois produtos citados, por meio de *Clostridium pasteurianum*, utilizando glicerina pura (20 g/L) como substrato. Testes envolvendo um meio de cultura similar ao utilizado no presente trabalho, MP2 medium (MOON et al., 2011), apresentaram resultados bastantes semelhantes aos obtidos no ensaio 6. Os autores obtiveram uma razão ButOH:1,3-PD igual a 4,73, enquanto que a obtida para esta fase foi de 1,41. No entanto, dentre os metabólitos produzidos, não houve produção de ácido propiônico no referido trabalho, o que certamente favoreceu a formação de butanol.

Diante do que foi abordado ao longo deste tópico, é possível observar claramente que, em cada ensaio experimental, em que foram atribuídas diferentes condições operacionais, houve o favorecimento de uma rota metabólica em detrimento da outra. Isso resultou, basicamente, em diferentes concentrações de 1,3-propanodiol e ácido propiônico, uma vez que esses foram os produtos majoritários em todas as fases de operação. De modo a direcionar a discussão apenas para estes dois produtos majoritários, os tópicos subsequentes abordam o rendimento e produtividade de cada um deles.

#### 5.2.4.1 Produção volumétrica e rendimento de 1,3-propanodiol.

A Tabela 5.33 ressalta a produção volumétrica (PV1,3-PD) e o rendimento (1,3-PDY) de 1,3-propanodiol obtido nos 10 ensaios experimentais.

**Tabela 5.33:** Produção volumétrica e rendimento de 1,3-PD obtidos nos 10 ensaios experimentais.

<b>Ensaio</b>	<b>PV1,3-PD (g/L/h)</b>	<b>1,3-PDY (mol 1,3-PD / mol glicerol consumido)</b>	<b>1,3-PDY (g 1,3-PD / g glicerol consumido)</b>
1	0,87 ± 0,14	0,52 ± 0,12	0,43 ± 0,10
2	1,04 ± 0,24	0,53 ± 0,15	0,44 ± 0,12
3	0,19 ± 0,06	0,07 ± 0,02	0,06 ± 0,02
4	0,03 ± 0,01	0,07 ± 0,02	0,05 ± 0,01
5	0,19 ± 0,06	0,46 ± 0,13	0,38 ± 0,11
6	0,04 ± 0,01	0,07 ± 0,02	0,05 ± 0,02
7	0,41 ± 0,23	0,11 ± 0,07	0,09 ± 0,05
8	0,48 ± 0,04	1,05 ± 0,24	0,87 ± 0,20
9 (PC)	0,15 ± 0,02	0,25 ± 0,07	0,20 ± 0,06
10 (PC)	0,14 ± 0,02	0,19 ± 0,05	0,16 ± 0,04

PC: Ponto central

É possível notar, por meio da Tabela 5.33, que a máxima produção volumétrica de 1,3-propanodiol (1,04 g/L/h – 24,96 g/L/d) ocorreu no ensaio 2, cujas condições foram 15,0 g/L de glicerol e TDH de 2h. Resultado semelhante foi encontrado por Cheng et al. (2007) e por Zhang et al. (2007). No quesito rendimento, o máximo resultado obtido ocorreu no ensaio 8 (1,05 mol 1,3-PD / mol glicerol consumido – 0,87 g 1,3-PD / g glicerol consumido), cujas condições foram 10,0 g/L de glicerol e TDH de 9,24h, no entanto, a produção volumétrica obtida nesse ensaio não é alta (0,48 g/L/h).

Alguns pesquisadores relataram significativas produções volumétricas de 1,3-propanodiol, apesar de terem obtido rendimentos inferiores ao do presente trabalho. Vale ressaltar que o tipo de inóculo, configuração do reator, bem como o meio nutricional

utilizado nesses trabalhos pode interferir na produção do subproduto. A Tabela 5.34 sintetiza e compara os principais estudos acerca da produção de 1,3-propanodiol.

González-Pajuelo et al. (2005), como citado anteriormente, utilizaram um CSTR para avaliar os efeitos da taxa de diluição ( $D$ ), que variou de 0,05 a 0,50  $\text{h}^{-1}$ , e da concentração de glicerol, 30, 60 ou 70 g/L, na fermentação contínua de glicerina pura a 1,3-propanodiol, por *Clostridium butyricum* VPI 3266. Os autores reportaram que produção volumétrica de 1,3-PD aumentou com o aumento da taxa de diluição. O maior valor de produtividade alcançado (10,3 g/L/h) ocorreu com  $D = 0,30 \text{ h}^{-1}$  e 60,0 g/L de glicerol. Nessa condição, o máximo rendimento obtido foi de 0,65 mol 1,3-PD / mol glicerol consumido.

Cheng et al. (2007) foram os pioneiros em reportar a produção de 1,3-Propanodiol, utilizando *K. pneumoniae*, em escala piloto. Os autores utilizaram um fermentador de três estágios e volumes de 5,0L, 50,0L e 5000,0L para a produção de 1,3-PD em batelada alimentada. Utilizando o fermentador de 5,0L e concentração inicial de glicerol de 50,0 g/L, observou-se estabilidade nos resultados de concentração (17,9 g/L), rendimento (0,36 g/g glicerol consumido) e produtividade (0,57 g/L/h) de 1,3-PD ao variar o tempo de incubação de 12h a 48h. Partindo para o fermentador de 50,0L e mantendo a concentração de glicerol no intervalo de 15-40 g/L, foram obtidos 51,8 g/L de 1,3-PD, com um rendimento de 0,52 mol/mol glicerol consumido. Em condições semelhantes às descritas acima, foram observados os melhores resultados no fermentador de 5000,0L, onde foi reportada uma produção de 58,8 g/L de 1,3-PD, com um rendimento equivalente a 0,53 mol/mol glicerol consumido e produtividade de 0,92 g/L/h.

Zhang et al. (2007) avaliaram a produção de 1,3-PD por *Klebsiella pneumoniae*, a partir de glicerina pura (20,0 g/L) e utilizando  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 6,0 g/L, como fonte de nitrogênio. Para as fermentações em batelada, os autores obtiveram 12,2 g/L de 1,3-PD, produtividade de 1,53 g/L/h e rendimento de 0,75 mol / mol glicerol consumido. No entanto, para as fermentações em batelada-alimentada, a concentração de 1,3-PD apresentou um máximo de 38,1 g/L, enquanto a produtividade e rendimento decresceram (0,79 g/L/h e 0,70 mol / mol glicerol consumido).

Gonen et al. (2012) avaliaram o efeito de três diferentes meios suportes, espuma de poliuretano (PUF), esferas de vidro (GB) e pedra-pomes (PS), na imobilização de *Klebsiella pneumoniae* para a fermentação de glicerol bruto (45 g/L), em Reator Anaeróbio

de Leito Fixo. Todos os biorreatores foram operados continuamente em diferentes TDH, variando entre 0,5 e 16h. Visando reforçar a imobilização da biomassa no meio suporte, o meio de cultura foi continuamente reciclado no reator durante uma semana, com uma taxa de diluição de  $0,05 \text{ h}^{-1}$  e temperatura fixa de  $37^\circ\text{C}$ . A concentração máxima de 1,3-PD obtida ( $19,7 \text{ g/L}$ ) foi alcançada utilizando espuma de poliuretano no TDH de 8h. Por outro lado, o reator imobilizado com pedra-pomes obteve os melhores resultados de produtividade ( $8,5 \text{ g/L/h}$  – TDH: 1h) e rendimento ( $0,45 \text{ g/g glicerol}_{\text{alimentado}}$  – TDH: 4h) quando comparado com os demais.

De maneira semelhante à Gonen et al. (2012), Gonen et al. (2013) avaliaram a produção de 1,3-Propanodiol, a partir de glicerol bruto ( $45 \text{ g/L}$ ), na imobilização de *Clostridium beijerinckii* NRRL B-593 em Reator Anaeróbio de Leito Fixo, utilizando esferas de vidro e anéis de Raschig como materiais suporte. Os biorreatores foram continuamente operados, variando o TDH de 1h a 16h. Os autores observaram que, para ambos os reatores, a concentração de 1,3-propanodiol atingiu o valor máximo no TDH de 8h, decrescendo, então, até o TDH de 16h. Entretanto, para a produtividade, os resultados mostram um aumento com a diminuição do TDH. Os valores máximos foram atingidos no TDH de 2h, correspondentes a  $6,4 \text{ g/L/h}$  e  $6,1 \text{ g/L/h}$ , ao utilizar anéis de Raschig e esferas de vidro, respectivamente. De maneira geral, o reator imobilizado com anéis de Raschig apresentou melhores rendimentos de 1,3-propanodiol que o reator com esferas de vidro. O máximo rendimento obtido foi verificado no TDH de 8h para o reator com anéis de Raschig ( $0,77 \text{ mol 1,3-PD / mol glicerol}_{\text{alimentado}}$ ) e no TDH de 12h para o reator com esferas de vidro ( $0,69 \text{ mol 1,3-PD / mol glicerol}_{\text{alimentado}}$ ).

Gallardo et al. (2014) produziram 1,3-Propanodiol a partir de glicerol residual ( $25,0 \text{ g/L}$ ) em três Reatores Granulares de Leito Expandido (EGSB). O reator R1 foi inoculado com lodo granular, o R2 com lodo granular tratado termicamente e o R3 foi preenchido com lodo granular fragmentado. Avaliou-se a aplicação de diferentes TDH, iniciando em 24h e variando em 20, 12, 6 e 3h. Como resultados, observou-se a conversão de glicerol em 1,3-PD em todos os reatores. O rendimento máximo ( $0,49 \text{ g/g glicerol}_{\text{consumido}}$  ou  $0,59 \text{ mol/mol glicerol}_{\text{consumido}}$ ) e produtividade ( $82 \text{ g/L/d}$ ) foram atingidos no R1 no tempo de detenção hidráulica de 12 e 3h, respectivamente.

**Tabela 5.34:** Comparação da performance de produção de 1,3-propanodiol entre o trabalho atual e os reportados na literatura.

Tipo de Reator	Glicerol (g/L)	TDH (h)	Inóculo	1,3-PD (g/L)	1,3-PDY (mol / mol glicerol consumido)	PV1,3-PD (g/l/h)	Referência
CSTR	GP 60,0	3	<i>C. butyricum</i> <i>VPI 3266</i>	30,9	0,65	10,30	GONZÁLEZ-PAJUELO et al. (2005)
Fermentador 3 estágios	GP 15-40 (5000L)	18	<i>K. pneumoniae</i> <i>M5al</i>	58,8	0,53	0,92	CHENG et al. (2007)
Batelada Batelada- Alimentada	GP 20,0	8	<i>K. pneumoniae</i>	12,2 38,1	0,75 0,70	1,53 0,79	ZHANG et al. (2007)
Leito Fixo	GB 45,0	16 – 0,5	<i>K. pneumoniae</i>	PU: 19,7(8h) PP: 18,4 (6h)	0,30 (6h)* 0,54 (4h)*	6,00 (1h) 8,50 (1h)	GONEN et al. (2012)
Leito Fixo	GB 45,0	16 – 1	<i>C. beijerinckii</i> <i>NRRL B-593</i>	AR: 30,0 (8h) GS: 28,0 (8h)	0,77 (8h)* 0,69 (12h)*	6,4 (2h) 6,1 (2h)	GONEN et al. (2013)
EGSB	GB 25,0	24 – 3	Misto	NI	0,59 (12h)	3,42 (3h)	GALLARDO et al. (2014)
RALF	GB 2,9-17,1	9,24- 0,75	Misto	4,47 (10 g/L; 9,24h)	1,05 (10 g/L; 9,24h)	1,04 (15 g/L; 2h)	Este estudo

GP: glicerina pura; GB: glicerol bruto; PU: espuma de poliuretano; PP: pedra-pomes, AR: anéis de Raschig; GS: esferas de vidro; NI: não informado, \* glicerol alimentado.

#### 5.2.4.2 Produção volumétrica e rendimento de ácido propiônico.

A produção volumétrica (PVHPr) e o rendimento (HPrY) de ácido propiônico nos 10 ensaios experimentais são apresentados na Tabela 5.35.

**Tabela 5.35:** Produção volumétrica e rendimento de HPr obtidos nos 10 ensaios.

Ensaio	PVHPr (g/L/h)	HPrY (mol HPr / mol glicerol consumido)	HPrY (g HPr / g glicerol consumido)	Razão P/A (molar)
1	0,62 ± 0,17	0,38 ± 0,12	0,30 ± 0,10	17,1
2	1,35 ± 0,14	0,71 ± 0,14	0,57 ± 0,11	31,4
3	0,12 ± 0,01	0,28 ± 0,05	0,22 ± 0,04	29,2
4	0,21 ± 0,02	0,42 ± 0,09	0,33 ± 0,07	10,2
5	0,06 ± 0,01	0,13 ± 0,06	0,11 ± 0,03	5,6
6	0,14 ± 0,01	0,23 ± 0,05	0,19 ± 0,04	5,0
7	0,54 ± 0,07	0,15 ± 0,04	0,12 ± 0,04	6,5
8	0,10 ± 0,03	0,23 ± 0,08	0,19 ± 0,07	37,2
9 (PC)	0,19 ± 0,02	0,32 ± 0,08	0,26 ± 0,07	8,0
10 (PC)	0,23 ± 0,02	0,31 ± 0,07	0,25 ± 0,05	13,2

Razão P/A: Razão HPr/HAc (mol/L)

Na Tabela 5.35, é possível observar que a máxima produção volumétrica (1,35 g/L/h – 32,40 g/L/d) e rendimento de ácido propiônico (0,71 mol HPr / mol glicerol consumido – 0,57 g HPr / g glicerol consumido) ocorreram no ensaio 2, cujas condições foram 15,0 g/L de glicerol e TDH de 2h. A maior concentração de ácido propiônico obtida no reator RM também ocorreu neste ensaio, e corresponde a 2,70 g/L.

Como explicitado no item 3.4 da “Revisão Bibliográfica” deste trabalho, de acordo com Wang & Yang (2013), o rendimento teórico de ácido propiônico, através da rota EMP na fermentação do glicerol, é de 0,80 g HPr / g glicerol consumido. Nesta rota, teoricamente, não ocorre a cogeração de ácido acético, o que resulta em uma razão P/A elevada. Como visto na Tabela 5.32, além de fornecer a maior concentração, rendimento e produtividade de ácido propiônico, o ensaio 2 também fornece uma elevada razão P/A (31,4), o que corrobora nos processos posteriores de purificação deste produto.

Apesar de baixa concentração de ácido propiônico produzida no reator RM (2,7 g/L), os valores atingidos de produção volumétrica e rendimento são semelhantes ou muitas vezes superiores aos estudos reportados na literatura, como é o caso dos trabalhos de Barbirato et al. (1997), Himmi et al. (2000) e Zhang & Yang (2009). A Tabela 5.36 sintetiza e compara os principais estudos acerca da produção de 1,3-propanodiol.

Utilizando um sistema composto por um biorreator do tipo tanque agitado e uma unidade acoplada com membranas de ultrafiltração, Boyaval et al. (1994) estudaram a fermentação da glicerina pura (102,3 g/L) à ácido propiônico, por *P. thoenii*. Os autores verificaram uma elevada eficiência de separação do meio fermentativo e do produto (HPr), com o auxílio da membrana. A máxima concentração obtida foi 42 g/L, enquanto a produtividade e o rendimento alcançaram 0,15 g/L/h e 0,51 mol HPr / mol glicerol.

Barbirato et al. (1997) avaliaram três diferentes substratos na fermentação do glicerol à HPr utilizando *P. acidipropionici*. Os substratos avaliados foram glicerol, glicose e lactato, em concentração equivalente a 20g/L. Verificou-se que a concentração e produtividade máxima de HPr, 13,6 g/L e 0,18 g/L/h respectivamente, ocorreu ao utilizar glicerol como substrato. Além disso, a razão molar P/A (HPr/HAc) obtida para os três substratos testados – 37 com glicerol, 4 com glicose e 2,5 com ácido láctico – indicam que o processo posterior de purificação do produto será facilitado, em função da baixa concentração de ácido acético.

De maneira semelhante à Barbirato et al. (1997), Himmi et al. (2000) avaliaram a fermentação do glicerol à HPr por meio de *P. acidipropionici*, utilizando glicerol e glicose como substratos, na concentração de 20 g/L. Os autores observaram os melhores resultados de concentração (12,0 g/L), rendimento (0,79 mol / mol glicerol consumido) e produtividade de HPr (0,42 g/L/h), ao utilizar glicerol como fonte de carbono ao invés de glicose. A razão P/A molar verificada foi de 5,7 para o glicerol e de 1,3 para a glicose, o que destaca o potencial do glicerol como substrato na produção de ácido propiônico.

Coral et al. (2008) avaliaram, dentre outras coisas, a fermentação da glicerina pura (20,0 g/L) à ácido propiônico, em batelada, por *P. acidipropionici*. Os autores verificaram que do que ocorreu com outros substratos, a produção de ácido propiônico a partir do glicerol, não foi acompanhada de geração de ácido acético, o que proporcionou

uma razão P/A igual a 100:1. A maior concentração, produtividade e rendimento obtidos foram 6,77 g/L, 0,05 g/L/h e 0,90 mol HPr / mol glicerol<sub>consumido</sub> (0,724 g HPr / g glicerol<sub>consumido</sub>), respectivamente.

Zhang & Yang (2009) avaliaram a produção de ácido propiônico em um Reator de Leito Fibroso por batelada alimentada, por meio de *P. acidipropionici* ACK-Tet, utilizando glicerol bruto e puro como substratos (40 g/L). Ao utilizar o glicerol puro, a concentração obtida foi de 23,0 g/L de HPr, produtividade de 0,25 g/L/h e rendimento igual 0,59 g/g glicerol consumido. Em testes utilizando 17 g/L de glicerol, os autores reportaram que, apesar do rendimento de HPr ter sido maior com o glicerol bruto do que com o substrato puro (0,71 g/g vs. 0,54 g/g), a produtividade do glicerol puro foi maior quando comparada com a do resíduo (0,10 g/L/h vs. 0,085 g/L/h). Essa diferença foi atribuída às elevadas concentrações de sais, principalmente NaCl, e outras substâncias químicas tóxicas para as células.

Dishisha, Alvarez & Hatti-Kaul (2012) estudaram a produção de ácido propiônico, a partir de glicerol puro (40 g/L), por meio de *P. acidipropionici* livre e imobilizada em polietilenimina-Poraver tratada (PEI-Poraver) [Poraver = vidro expandido] e polietilenimina-Luffa (PEI-Luffa) [Luffa = bucha vegetal]. Na fermentação em batelada, ao utilizar células imobilizadas em PEI-Luffa, atingiu-se a concentração de 21,70 g/L, produtividade de 0,29 g/L/h e rendimento de 0,74 mol HPr/mol glicerol consumido. Por sua vez, ao utilizar PEI-Poraver, foi verificado grande melhoria na produtividade (0,86 g/L/h), no entanto, houve pouca variação na concentração e no rendimento de ácido propiônico. Ainda neste trabalho, os autores avaliaram a produção de HPr em modo contínuo de operação. Comparou-se o biorreator contendo células imobilizadas em PEI-Poraver e um CSTR com células livres. Em ambos os casos, as taxas de diluição aplicadas foram de 0,057 h<sup>-1</sup> (40 g/L glicerol), 0,075 h<sup>-1</sup> (30g/L) e 0,1h<sup>-1</sup> (30g/L). Para as células livres, percebeu-se que a produtividade, o rendimento e a concentração de HPr decrescem consideravelmente com o aumento da taxa de diluição, indicando a lavagem das células na taxa de 0,1h<sup>-1</sup>. No entanto, para as células imobilizadas em PEI-Poraver, observou-se que a concentração de HPr se manteve constante (14,5 g/L), resultando em alto rendimento (0,86 mol / mol glicerol<sub>consumido</sub>) e produtividade (1,4 g/L/h) com o aumento da taxa de diluição.

**Tabela 5.36:** Comparação da performance de produção de ácido propiônico entre o trabalho atual e os reportados na literatura.

Tipo de Reator	Glicerol (g/L)	TDH (h)	Inóculo	HPr (g/L)	HPrY (mol / mol glicerol consumido)	PVHPr (g/l/h)	Referência
Batelada - alimentada	GP 102,3	280	<i>P. thoenii</i>	42,0	0,51	0,15	BOYAVAL et al. (1994)
Batelada	GP 20,0	73	<i>P. acidipropionici</i>	13,6	0,84	0,18	BARBIRATO et al. (1997)
	GP 80,0	360		42,0	0,77	0,12	
Batelada	GP 20 + Glu 20	54	<i>P. acidipropionici</i>	12,0	0,79	0,42	HIMMI et al. (2000)
Batelada	GP 20,0	135	<i>P. acidipropionici</i>	6,77	0,90	0,05	CORAL et al. (2008)
Batelada- Alimentada (Leito Fibroso)	GP 17,0	250	<i>P. acidipropionici</i>	21,25	0,88	0,085	ZHANG & YANG (2009)
	GB 17,0		<i>ACK-Tet</i>	2,5	0,67	0,010	
Batelada	GP 40,0 (PL)	62,5	<i>P. acidipropionici</i>	20,09	0,74	0,29	DISHISHA et al. (2012)
	GP 42,0 (PP)			20,09	0,64	0,86	
CSTR	GP 40,0	17,5		13,59	0,90	0,77	
RALF	GB 2,9-17,1	9,24-0,75	Misto	2,70 (15 g/L; 2h)	0,71 (15 g/L; 2h)	1,35 (15 g/L; 2h)	Este estudo

GP: glicerina pura; GB: glicerol bruto; PL: PEI-Luffa; PP: PEI-Poraver.

### 5.2.5 Aspectos gerais: pH, remoção de DQO e sólidos suspensos.

A Tabela 5.37 apresenta os parâmetros pH, remoção de DQO e concentração de sólidos suspensos voláteis e fixos obtidas pelo reator RM, em cada ensaio experimental.

**Tabela 5.37:** Parâmetros gerais apresentados pelo reator RM nos 10 ensaios experimentais.

Ensaio	Parâmetros				
	pH Afluente	pH Efluente	ER <sub>DQO</sub> (%)	SSV (µg/L)	SSF (µg/L)
1	6,55	4,20	13,4 ± 4,1	0,122	0,075
2	6,49	4,15	7,8 ± 2,3	0,159	0,086
3	6,02	4,04	12,9 ± 2,8	0,154	0,058
4	5,38	3,98	8,1 ± 1,4	0,150	0,010
5	5,32	4,24	18,8 ± 2,8	0,147	0,051
6	4,54	4,38	6,3 ± 1,7	0,137	0,015
7	6,58	4,76	6,5 ± 2,1	0,231	0,091
8	5,74	4,07	8,9 ± 1,3	0,205	0,006
9	5,74	4,30	6,9 ± 3,0	0,192	0,009
10	5,99	4,06	5,2 ± 1,4	0,123	0,006

ER<sub>DQO</sub>: eficiência de remoção de DQO; SSV: sólidos suspensos voláteis; SSF: sólidos suspensos fixos.

De acordo com O-Thong et al. (2008), o pH é um dos principais fatores que afetam a produção de Hidrogênio e metabólitos, influenciando principalmente, no crescimento microbiano e na atividade das enzimas envolvidas na formação de determinado produto. Entretanto, ao utilizar cultura mista de microrganismos, é necessário controlar as condições de cultivo, como o pH, de modo a direcionar o metabolismo para a geração do produto desejado (NTAIKOU et al., 2010).

Na Tabela 5.37, é possível observar que o pH afluente apresentou grande variação (6,58 a 4,54), enquanto que o pH efluente se manteve praticamente estável (3,99 a 4,76). Justifica-se os valores variáveis do pH afluente com base na adequação do reator as diversas condições operacionais impostas. De maneira sistemática, o pH

afluente foi monitorado e corrigido para que o pH efluente se mantivesse na faixa de 4,5, o que é tido como um pH ótimo para a produção de hidrogênio (AMORIM et al., 2009; ROSA et al., 2014; NAZARETH, 2015).

A remoção da carga orgânica manteve-se constante ao longo das fases de operação do reator, atingindo os valores médios de eficiência entre 5,2 e 18,8%. As baixas eficiências obtidas podem ser atribuídas à presença de ácidos orgânicos derivados do processo fermentativo, principalmente ácido propiônico, extensamente produzido em todas as fases de operação.

Ferreira (2014) ao avaliar a produção de H<sub>2</sub> em RALF termofílico, a partir de glicerol bruto, obteve valores médios de redução de DQO entre 17,7 e 13,6% para os TDH de 8h a 4h, seguido por um decréscimo da eficiência no TDH de 2h (10,4%) e 1h (11%). Entretanto, Bósio (2014), que trabalhou nas mesmas condições à Ferreira (2014), porém utilizando RALF mesofílico, verificou uma queda nos valores médios de redução de DQO de 23% para 9%, ao reduzir o TDH de 8h a 1h. As autoras atribuem a redução expressiva da eficiência de DQO no TDH de 1h ao choque de carga orgânica aplicado aos reatores, o que, de acordo com Aquino e Chernicharo (2005), forneceria mais energia aos microrganismos acidogênicos, resultando em maior produção de hidrogênio e ácidos orgânicos.

A mínima concentração de sólidos suspensos verificada no reator RM foi representada, em sua grande maioria, por sólidos suspensos voláteis. A concentração de sólidos suspensos voláteis permaneceu constante ao longo das fases do reator, variando de 0,123 a 0,231 µg/L. Diante dos resultados compilados na Tabela 5.37, é possível atribuir a concentração de sólidos suspensos voláteis apresentada pelo reator à lavagem da biomassa, que apesar de mínima, foi significativa quando comparada com a concentração de sólidos fixos.

O balanço de DQO foi realizado com base nos dados da DQO teórica dos metabólitos solúveis presentes no efluente, do glicerol remanescente e dos sólidos suspensos voláteis (SSV). A diferença entre a DQO teórica total e a DQO medida no reator são apresentados na Tabela 5.38. Pode-se notar que em alguns ensaios (2, 4, 6, 8 e 9), a diferença percentual apresenta-se relativamente baixa, o que pode ser atribuído a erros experimentais. Para aqueles em que a diferença é maior, atribui-se a presença de metabólitos no efluente que não foram quantificados.

**Tabela 5.38:** Balanço de DQO para os 10 ensaios experimentais realizados no reator RM.

Ensaio	DQO (mg/L)														DQO teórica	DQO medida	DQO teórica - DQO medida	Dif %
	1,3-PD	MetOH	EtOH	ButOH	HAc	HPr	HBu (Iso)	HBu	HVa (Iso)	HVa	HCa	Glicerol Efluente	SSV					
1	3103,8	50,1	63,3	0,0	129,2	1964,4	115,8	149,7	123,3	373,0	80,9	1080,4	0,00016	7233,9	5287,4	-1946,5	-36,8	
2	3485,7	82,0	70,3	0,0	140,9	4164,5	116,3	246,6	123,3	454,3	84,1	11613,1	0,00021	20581,0	17843,7	-2737,3	-15,3	
3	424,5	55,2	49,4	0,0	146,6	1557,0	115,3	126,8	123,3	190,4	78,8	548,4	0,00021	3415,5	5445,1	2029,7	37,3	
4	462,6	96,1	46,2	139,6	301,6	2615,7	115,0	361,1	123,3	107,6	78,5	12163,6	0,00020	16610,8	16692,8	82,1	0,5	
5	1855,2	76,7	34,6	0,0	114,8	558,7	114,8	123,4	123,3	147,2	78,8	554,2	0,00020	3781,6	3399,8	-381,8	-11,2	
6	335,9	78,7	55,4	727,8	398,6	1136,6	116,6	373,0	123,3	103,8	79,4	17035,2	0,00018	20564,3	21973,4	1409,1	6,4	
7	522,9	53,4	53,1	70,8	121,5	707,8	115,1	322,5	123,3	168,0	82,4	5788,7	0,00031	8129,5	10336,3	2206,7	21,3	
8	7536,3	82,0	43,8	0,0	155,0	1542,7	114,7	160,4	123,3	120,5	79,1	5845,9	0,00028	15803,7	13493,2	-2310,4	-17,1	
9	1294,5	60,6	23,6	131,6	249,8	1546,3	115,4	290,6	123,4	109,2	81,5	7205,0	0,00026	11231,4	10995,8	-235,6	-2,1	
10	1210,8	77,1	43,6	0,0	208,4	1833,4	115,0	170,0	123,3	105,4	78,4	5639,5	0,00016	9604,8	13493,2	3888,4	28,8	

1,3-PD: 1,3-propanodiol; MetOH: metanol; EtOH: etanol; ButOH: butanol; HAc: ácido acético; HPr: ácido propiônico, HBu (Iso): ácido isobutírico; HBu: ácido butírico; HVa (Iso): ácido isovalérico; HVa: ácido valérico; SSV: sólidos suspensos voláteis

5.2.6. Considerações adicionais a respeito da taxa de carregamento orgânico na produção de H<sub>2</sub>, 1,3-Propanodiol e Ácido Propiônico.

A taxa de carregamento orgânico (TCO) ou carga orgânica volumétrica aplicada (COVA) é um parâmetro que expressa a quantidade de matéria orgânica aplicada ao reator, por unidade de tempo e por unidade de meio do reator. Por essa definição, diferentes COVAs exercem efeitos variados nos microrganismos, os quais expressam diferentes comportamentos em relação a produção dos metabólitos.

A Tabela 5.39 apresenta os parâmetros de produção de H<sub>2</sub>, 1,3-propanodiol e ácido propiônico, além das cargas orgânicas envolvidas em cada ensaio experimental. Vale ressaltar que o rendimento entre o metabólito produzido (H<sub>2</sub>, 1,3-PD ou HPr) e a matéria orgânica removida em massa (RMCR) é definido pela quantidade desse metabólito pela quantidade de matéria orgânica removida, em massa de glicerol.

**Tabela 5.39:** Produção de H<sub>2</sub>, 1,3-PDO e HPr e cargas orgânicas nos 10 ensaios.

Parâmetro	Unidade	Ensaio Experimentais									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
RMCR <sub>H<sub>2</sub></sub>	mmolH <sub>2</sub> /g glicerol cons.	0,00	0,17	0,00	2,85	0,00	5,23	1,77	0,00	1,27	1,48
RMCR <sub>1,3-PD</sub>	g 1,3-PD/g glicerol cons.	0,42	0,42	0,06	0,05	0,34	0,06	0,07	0,85	0,20	0,15
RMCR <sub>HPr</sub>	g HPr/g glicerol cons.	0,30	0,54	0,21	0,32	0,11	0,20	0,10	0,18	0,25	0,24
COVR	g/L.h	2,09	2,48	0,57	0,65	0,57	0,69	5,51	0,57	0,77	0,98
COVA	g/L.h	2,26	6,69	0,58	1,67	0,62	3,74	10,85	0,98	1,97	1,97

RMCR = Rendimento do metabólito por carga orgânica removida; COVR = carga orgânica volumétrica removida; COVA = carga orgânica volumétrica aplicada.

Diante da Tabela 5.39 é possível observar que a condição que melhor favoreceu a produção de H<sub>2</sub> foi o ensaio 6, correspondente à COVA de 3,74 g/L.h (TCO = 89,86 kg/m<sup>3</sup>.dia) resultante da combinação de 17,1 g/L de glicerol no TDH de 5h. Essa condição propiciou um rendimento molar de H<sub>2</sub> de 5,23 mmol H<sub>2</sub>/g glicerol consumido e uma COVR de 0,69 g/L.h.

Os resultados evidenciam que o sucesso no processo de obtenção de hidrogênio por fermentação do substrato estaria em encontrar um equilíbrio entre a concentração da matéria orgânica alimentada no afluente e o tempo que os microrganismos têm para fermentar essa matéria antes de atingir o nível crítico de pressão parcial de hidrogênio. Um tempo excessivamente alto para uma carga baixa pode-se traduzir no consumo de hidrogênio pela disponibilidade do gás para microrganismos consumidores de lento crescimento. Entretanto, um tempo curto com uma alta concentração de matéria orgânica alimentada poderia se traduzir na excessiva pressão parcial de hidrogênio que também contribuiu para o seu consumo pelos mesmos microrganismos (BRAVO, 2014).

Da mesma forma, a condição que melhor favoreceu a produção de 1,3-propanodiol foi o ensaio 8, que correspondeu à COVA de 0,98 g/L.h (TCO = 23,62 kg/m<sup>3</sup>.dia) resultante da combinação de 10,0 g/L de glicerol e TDH de 9,24h. Essa condição resultou em 0,85 g 1,3-PD/g glicerol<sub>consumido</sub> e COVR de 0,57 g/L. Para ácido propiônico, a melhor condição foi o ensaio 2, correspondente à COVA de 6,69 g/L.h (TCO = 160,60 kg/m<sup>3</sup>.dia) resultante da combinação de 15,0 g/L e TDH de 2h, a qual propiciou um rendimento de 0,54 g HPr/g glicerol<sub>consumido</sub> e COVR de 2,48 g/L.h.

A grande proximidade das cargas orgânicas volumétricas removidas (COVR) nos ensaios 6 (COVR = 0,69) e 8 (COVR = 0,57), pode ser atribuído ao consumo de hidrogênio na via redutora da fermentação do glicerol, de forma que, para se formar o produto final 1,3-propanodiol é necessário o consumo 1 mol de H<sub>2</sub> por mol de glicerol, conforme explícito na Equação (9) do tópico 3.4 desta Dissertação.

Diante do exposto ao longo do Estudo B e principalmente, pelos resultados compilados na Tabela 5.39, é possível observar que existem condições específicas que favorecem a produção de determinado produto da via fermentativa do glicerol. Esse estudo teve como seu principal objetivo, a determinação dessas condições, uma vez que a produção de metabólitos com elevado valor agregado a partir de um resíduo industrial barato e abundante, tem se tornado um tema urgente e ambientalmente atrativo. Além disso, o presente estudo reforça o potencial de aplicação das técnicas de planejamento experimental na compreensão do desempenho de reatores anaeróbios contínuos, contribuindo, assim, para futuras pesquisas nessa área.

## CAPÍTULO 6

### CONCLUSÕES

#### **Estudo A:** Otimização do meio de cultura e aplicação em reatores contínuos

- Os máximos rendimentos de H<sub>2</sub> e etanol, 0,006 e 0,291 mol / mol glicerol consumido, respectivamente, foram obtidos no meio de cultura otimizado constituído por 26,53 g/L de glicerol, 1,75 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,0076 g/L B12 e 0,5 g/L de extrato de levedura.
- A aplicação do meio de cultura otimizado em reatores contínuos não resultou na melhoria do rendimento de H<sub>2</sub> e etanol, mas propiciou um aumento de aproximadamente 5x no rendimento de 1,3-propanodiol, atingindo o máximo de 0,38 mol 1,3-PD/mol glicerol consumido.

#### **Estudo B:** Otimização de parâmetros operacionais em reator contínuo RALF

- A resposta Conversão de Glicerol (CG) é unicamente dependente da variável concentração de glicerol, uma vez que a variável TDH não é significativa. As respostas Conteúdo de Hidrogênio (%H<sub>2</sub>) e Rendimento de Hidrogênio (HY) são dependentes de ambas as variáveis testadas.
- A máxima conversão de glicerol obtida, 98,4%, foi obtida utilizando concentração de substrato menor que 5,0 g/L. O máximo conteúdo e rendimento de H<sub>2</sub> obtidos, 87,4% e 0,17 mol H<sub>2</sub>/mol glicerol consumido, respectivamente, foram alcançados em concentrações superiores a 10,0 g/L e TDH de 5h.
- Os principais metabólitos produzidos foram 1,3-propanodiol, ácido propiônico, ácido acético, ácido butírico, butanol e etanol. O máximo rendimento de 1,3-propanodiol (1,05 mol 1,3-PD/mol glicerol consumido) foi obtido utilizando 10,0 g/L de glicerol e TDH de 9,24h. O máximo rendimento de ácido propiônico (0,71 mol HPr/mol glicerol consumido) foi obtido utilizando 15,0 g/L de glicerol e TDH de 2h.

## CAPÍTULO 7

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAD-ANDALOUSSI, S.; AMINE, J.; GERARD, P.; PETITDEMANGE, H. Effect of glucose on glycerol metabolism by *Clostridium butyricum* DSM 5431. *Journal of Applied Microbiology*, 1998, v.84, p. 515-522.
- ADNAN, N.A.A.; SUHAIMI, S.N.; ABD-AZIZ, S.; HASSAN, M.A.; PHANG, L-Y. Optimization of bioethanol production from glycerol by *Escherichia coli* SS1. *Renewable Energy*, 2014, v. 66, p. 625-633.
- ADHIKARI, S.; FERNANDO, S.D.; HARYANTO, A. Hydrogen production from glycerol: an update. *Energy Conversion and Management*, 2009, v. 50, p. 2600 – 2604.
- AMORIM, E.L.C.; 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*, 2009, v. 34, p. 783-790.
- ANGELIDAKI, I.; SANDERS, W. Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 2004, v. 3, p.117-29.
- ANP – Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Anuário Estatístico 2010. Disponível em [www.anp.gov.br](http://www.anp.gov.br). [acesso 31/08/2014].
- ANP – Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Anuário Estatístico 2012. Disponível em [www.anp.gov.br](http://www.anp.gov.br). [acesso 31/08/2014].
- ANP – Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Anuário Estatístico 2014. Disponível em [www.anp.gov.br](http://www.anp.gov.br). [acesso 31/08/2014].
- ARRUDA, P.V.; RODRIGUES, R.C.L.B.; FELIPE, M.G.A. Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. *Revista Analytica*, 2007, n. 26, p. 56-62.
- APHA, AWWA, WEF. Standard methods for the examination of water and wastewater. Washington, D.C.: American Public Health Association, 2012.
- BARBIRATO, F.; CAMARASA-CLARET, C.; GRIVET, J.P.; BORIES, A. Glycerol fermentation by a new 1,3-propanediol-producing microorganism: *Enterobacter agglomerans*. *Applied Microbiology Biotechnology*, 1995, v.43, p. 786-793.
- BARBIRATO, F.; BORIES, A. Relationship between the physiology between of *Enterobacter agglomerans* CNCM 1210 grown anaerobically on glycerol and the culture conditions. *Research in Microbiology Journal*, 1997, v. 148, p. 475-484.
- BARNWAL, B.K.; SHARMA, M.P. Prospects of biodiesel production from vegetable oils in India. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 2005, v.9, p.368-378.
- BARROS, A.R. Influência de diferentes materiais suporte na produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leiteo fluidizado. 2009. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 2009.
- 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*, 2010, v. 35, p. 3379-3388.
- 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*, 2012, v. 61, p. 59-65.
- BAUER, R.; KATSIKIS, N.; VARGA, S.; HEKMAT, D. Study of the inhibitory effect of the product dihydroxyacetone on *Gluconobacter oxydans* in a semi-continuous two-stage repeated-fed-batch process. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2005, v. 5, p. 37-43.
- BIEBL, H. & PFENNIG, N. Isolation of members of the family *Rhodospirillaceae*. 1981. In *The Prokaryotes*, vol. 1, p. 267–273. Edited by M. P. Starr, H. Stolp, H. G. Trüper, A. Balows & H. G. Schlegel. New York: Springer.
- BIEBL, H.; MENZEL, K.; ZENG, A.P.; DECKWER, W.D. Microbial production of 1,3-propanediol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1999, v. 52, p. 289-297.
- BIEBL, H. Fermentation of glycerol by *Clostridium pasteurianum* – batch and continuous culture studies. *Journal of Industrial microbiology and biotechnology*, 2001, v. 27, p. 18-26.
- BOENIGK, R.; BOWIEN, S.; GOTTSCHALK, G. Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol in continuous cultures of *Citrobacter freundii*. *Applied Microbiology Biotechnology*, 1993, v. 38, p. 453-457.
- BONDIOLI, P.; DELLA BELLA, L. An alternative spectrophotometric method for the determination of free glycerol in biodiesel. *Eur J Lipid Sci Technol*. 2005, v. 107, p. 153-157.
- BOYAVAL, P.; CORRE, C.; MADEC, M-N. Propionic acid production in a membrane bioreactor. *Enzyme Microbiology Technology*, 1994, v. 16, p. 883-886.
- BRAVO, I.M. Influência da carga orgânica na produção de biohidrogênio em ANSBBR com recirculação da fase líquida tratando o efluente do processo de produção do biodiesel. 2014. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo. São Carlos, 2014.
- CAMERON, D.C.; ALTARAS, N.E.; HOFFMAN, M.L.; SHAW, A.J. Metabolic engineering of propanediol pathways. *Biotechnology progress*, 1998, v. 14, p. 116-125.
- CARMONA, M.; VALVERDE, J.L.; PÉREZ, A.; WARCHOL, J.; RODRIGUES, J.F. Purification of glycerol/water solutions from biodiesel synthesis by ion exchange: sodium removal Part I. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2009, v. 84, p. 738-744.
- CHENG, K.; ZANG, J.; LIU, D.; SUN, Y.; LIU, H.; YANG, M.; XU, J. Pilot scale production of 1,3-propanediol using *Klebsiella pneumoniae*. *Process Biochemistry*, 2007, v. 42, p. 740-744.
- CHOOKAEW, T.; SOMPONG, O-T.; PRASERTSAN, P. Statistical optimization of medium components affecting simultaneous fermentative hydrogen and ethanol production from crude glycerol by thermotolerant *Klebsiella* sp. TR17. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2014, v. 39, p. 751-760.
- CHOOKAEW, T.; SOMPONG, O-T.; PRASERTSAN, P. Biohydrogen production from crude glycerol by immobilized by *Klebsiella* sp. TR17 in a UASB reactor and bacterial quantification under non-sterile conditions. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2014, v. 39, p. 9580-9587.

- CORAL, J.; KARP, S.G.; VANDENBERGHE, L.P.S.; PARADA, J.L.; PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. Batch fermentation model of Propionic Acid production by *Propionibacterium acidipropionici* in different carbon sources. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2008, v. 151, p. 333-341.
- DABROCK, B.; BAHL, H.; GOTTSCHALK, G. Parameters affecting solvent production by *Clostridium pasteurianum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, v. 58, p. 1233-1239.
- DA SILVA, G.P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industry microbiology. *Biotechnology Advances*, 2009, v.27, p. 30-39.
- DA SILVA, G.P.; CONTIERO, J.; NETO, P.M.A.; LIMA, C.J.B. 1,3-Propanediol: produção, aplicações e potencial biotecnológico. *Química Nova*, 2014, v. 37, p. 527-534.
- DANIEL, R.; STUERTZ, K.; GOTTSCHALK, G. Biochemical and molecular characterization of the oxidative branch of glycerol utilization by *Citrobacter freundii*. *Journal of Bacteriology*, 1995, v. 177, p. 4392-4401.
- DEMIRBAS, A.; DEMIRBAS, M.F. Importance of algae oil as a source of biodiesel. *Energy Convers Manag*, 2011, v. 52, p. 163-170.
- DELFORNO, T.P. Degradação de surfactant aniônico em reator EGSB sob condição metanogênica e ferro redutora com água residual de lavanderia comercial. 2014. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. São Carlos. 2014.
- DHARMADI, Y.; MURARKA, A.; GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: a new platform for metabolic engineering. *Biotechnology and Bioengineering*, 2006, v. 94, p. 821-829.
- DISHISHA, T.; ALVAREZ, M.T.; HATTI-KAUL, R. Batch- and continuous propionic acid production from glycerol using free and immobilized cells of *Propionibacterium acidipropionici*. *Bioresource Technology*. V. 118, p. 553-562, 2012.
- EDWARDS, V.H. The influence of high substrate concentrations on microbial kinetics. *Biotechnology and Bioengineering*, 1970, v. 12, p. 679-712.
- FENG, X.-H.; CHEN, F.; XU, H.; WU, B.; YAO, J.; YING, H.-J.; OUYANG, P.-K. Propionic acid fermentation *Propionibacterium freudenreichii* CCTCC M207015 in a multi-point fibrous-bed bioreactor. *Bioprocess Biosystem Engineering*, 2010, v. 33, p. 1077-1085.
- FERREIRA, J.D.S. Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidizado a partir de glicerol bruto sob condições termofílicas. 2014. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Carlos. São Carlos. 2014.
- FOSBERG, C.W. Production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium acetobutylicum* and others *Clostridium* species. *Applied Environmental Microbiology*, 1987, v. 53, p. 639-643.
- FORAGE, R.G.; FOSTER, M.A. Glycerol fermentation in *Klebsiella pneumoniae*: functions of the coenzyme B12-dependent glycerol and diol dehydratases. *Journal of bacteriology*, 1982, v. 149, p. 413-419.
- FUENTES, M.; MUSSATI, M.C.; SCENNA, N.J.; AGUIRRE, P.A. Global modeling and simulation of a three-phase fluidized bed bioreactor. *Computer & Chemical Engineering*, 2009, v. 33, n.1, p. 359-370.
- GALLARDO, R.; FARIA, C.; RODRIGUES, L.R.; PEREIRA, M.A.; ALVES, M.M. Anaerobic granular sludge as a biocatalyst for 1,3-propanediol production from glycerol in continuous bioreactors. *Bioresource Technology*, 2014, v. 155, p. 28-33.
- GONÇALVES, B.R.L.; PEREZ, L.; ÂNGELO, A.C.D. Glicerol: Uma Inovadora Fonte de Energia Proveniente da Produção de Biodiesel. *Anais: International Workshop Advances in Cleaner Production*, 2009, p. 1-6.
- GONEN, C.; GUNGORMUSLER, M.; AZBAR, N. Comparative evaluation of Pumice Stone as an alternative Immobilization material for 1,3-propanedio production from waste glycerol by immobilized *Klebsiella pneumoniae*. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 2012, v. 168, p. 2136-2147.
- GONEN, C.; GUNGORMUSLER, M.; AZBAR, N. Continuous production of 1,3-propanediol using waste glycerol with *Clostridium beijerinckii* NRRL B-593 immobilized on glass beads and glass rushing rings. *Chemical and Biochemical Engineering*, 2013, v. 27, p. 227-234.
- GONZÁLEZ-PAJUELO, M.; ANDRADE, J.C.; VASCONCELOS, I. Production of 1,3-Propanediol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 in continuous cultures with high yield and productivity. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2005, V. 32, p.391-396.
- GUNGORMUSLER, M.; GONEN, C.; AZBAR, N. Effect of cell immobilization on the production of 1,3-propanediol. *New Biotechnology*, 2013, v. 30, p. 623-628.
- HARADA, P.K. Produção de ácido propiônico por fermentação submersa utilizando glicerol e melaço de cana como fontes de carbono. 2012. Dissertação – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2012.
- HAZIMAH, A.H.; OOL, T.L.; SALMIAH, A. Recovery of glycerol and diglycerol from glycerol pitch. *Journal of Oil Palm Research*, 2003, v. 15, p. 1-5.
- HEKMAT, D.; BAUER, R.; FRICKE J. Optimization of the microbial synthesis of dihidroxyacetona from glycerol with *Gluconobacter oxydans*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2003, v. 26, p. 109-116.
- HERBERT, D.; PHIPPS, P.J.; STRANGE, R.E. Chemical analysis of microbial cells. *Methods in microbiology*, 1971, v. 5, p. 209-334.
- HIMMI, E.H.; BORIES, A.; BOUSSAID, A.; HASSANI, L. Propionic acid fermentation of glycerol and glucose by *Propionibacterium acidipropionici* and *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *Shermanii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2000, v. 53, p. 435-440.
- HOMANN, T.; TAG, C.; BIEBL, H.; DECKWER, H.D.; SCHINK, B. fermentation of glycerol to 1,3-propanediol by *Klebsiella* and *Citrobacter* strains. *Applied Microbiology and biotechnology*, 1990, v. 33, p. 121-126.
- HONG, E.; YOON, S.; KIM, J.; KIM, E.; KIM, D.; RHIE, S.; RYU, Y.-W. Isolation of microorganism able to produce 1,3-propanediol and optimization of medium constituents for *Klebsiella pneumoniae* AJ4. *Bioprocess Biosystem Engineering*, 2013, v. 36, p. 835-843.
- HU, H.; WOOD, T.K. An evolved *Escherichia coli* strain for producing hydrogen and ethanol from glycerol. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010, v. 391, p. 1033-1038.
- HULSHOFF POL, L.W.; LENS, P.N.; STAMS, A.J.M.; LETTINGA, G. Anaerobic treatment of sulphate-rich wastewaters. *Biodegradation*, 1998, v. 9, p. 213-224.
- IAE – International Energy Agency. *World energy outlook*; 2007.
- IMANDI, S.B.; BANDARU, V.V.R.; SOMALANKA, S.R.; GARAPATI, H.R. Optimization of medium constituents for the production of citric acid from by product glycerol using Doehlert experimental design. *Enzyme Microbiology Technology*, 2007, v. 40, p. 1367-1372.

- ITO, T.; NAKASHIMADA, Y.; SENBA, K.; MATSUI, T.; NISHIO, N. Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2005, v. 100, p. 260-265.
- JARVIS, G.N.; MOORE, E.R.B.; THIELE, J.H. Formate and ethanol are the major products of glycerol fermentation produced by a *Klebsiella planticola* strain isolated from red deer. *Journal of Applied Microbiology*, 1997, v. 83, p. 166-174.
- JITRWUNG, R.; YARGEAU, V. Optimization of media composition for the production of biohydrogen from waste glycerol. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2011, v. 36, p. 9602-9611.
- JOHNSON, E.A.; LIN, E.C. *Klebsiella pneumoniae* 1,3-propanediol: NAD<sup>+</sup> oxidoreductase. *Journal of Bacteriology*, 1987, v. 169, p. 2050-2054.
- KAUR, G.; SRIVASTAVA, A.K.; CHAND, S. Determination of kinetic parameters of 1,3-propanediol fermentation by *Clostridium diolis* using statistically optimized medium. *Bioprocess Biosystem Engineering*, 2012, v. 35, p. 1147-1156.
- 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*, 2006, v. 41, p. 199-207.
- KIVISTÖ, A.; SANTALA, V.; KARP, M. Closing the 1,3-propanediol route enhances hydrogen production from glycerol by *Halanaerobium saccharolyticum* subsp. *saccharolyticum*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2011, v. 36, p. 7074-7080.
- KOSKINEN, P.E.P.; LAY, C.H.; BECK, S.R.; TOLVANEN, K.E.S.; KAKSONEN, A.H.; ÖRLYGSSON, J.; LIN, C.-Y.; PUHAKKA, J.A. Bioprospecting thermophilic microorganisms from Iceland Hot Springs from hydrogen and ethanol production. *Energy & Fuels*, 2007, v. 22, p. 134-140.
- KOSKINEN, P.E.P.; BECK, R.S.; ORLYGSSON, J.; PUHAKKA, A.J. Ethanol and hydrogen production by two thermophilic, anaerobic bacteria isolated from Icelandic geothermal areas. *Biotechnology and Bioengineering*, 2008, v. 101, p. 679-90.
- LAGES, F.; LUCAS, C. Contribution to the physiological characterization of glycerol active uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, 1997, v. 1322, p. 8-18.
- LÁZARO, C.Z.; PERNA, V.; ETCHEBEHERE, C.; VARESCHE, M.B.A. Sugarcane vinasse as substrate for fermentative hydrogen production: the effects of temperature and substrate concentration. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2014, v. 39, p. 6407-6418.
- LEE, S.Y.; HONG, S.H.; LEE, S.H.; PARK, S.J. Fermentative production of chemicals that can be used for polymer synthesis. *Macromolecular Bioscience*, 2004, v. 4, p. 157-164.
- LETTINGA, G.; REBAC, S.; PARSHINA, S.; NOZHEVNIKOVA, A.; VAN LIER, J.B.; STAMS, A.J.M. High-rate anaerobic treatment of wastewater at low temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, v. 65, p. 1696-1702.
- LIN, C.Y.; LAY, C.H. Carbon/nitrogen-ratio effect on fermentative hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2004, v. 29, p. 275-281.
- LIU, F.; FANG, B.S. Optimization of bio-hydrogen production from biodiesel wastes by *Klebsiella pneumoniae*. *J Biotechnol*, 2007, v.2, p. 274-280.
- LIU, Y.; ZHANG, Y.-G.; ZHANG, R.-B.; ZHANG, F.; ZHU, J. Glycerol/Glucose co-fermentation: On more proficient process to produce propionic acid by *Propionibacterium acidipropionici*. *Current Microbiology*, 2011, v. 62, p. 152-158.
- LIU, B.; CHRISTIANSEN, K.; PARNAS, R.; BAIKUN, Z.X. Optimizing the production of hydrogen and 1,3-propanediol in anaerobic fermentation of biodiesel glycerol. *International Journal of hydrogen energy*, 2013, v. 38, p. 3196-3205.
- LO, Y.-C.; CHEN, J.-X.; HUANG, C.-Y.; YUAN, Y.-J.; CHANG, J.-S. Dark fermentative hydrogen production with crude glycerol from biodiesel industry using indigenous hydrogen-producing bacteria. *International Journal of hydrogen energy*, 2013, v. 38, p. 15815-15822.
- LÜTHI-PENG, Q.; DILEME, F.B.; PUHAN, Z. Effect of glucose on glycerol bioconversion by *Lactobacillus reuteri*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, v. 59, p. 289-296.
- MA, F.; HANNA, M.A. Biodiesel production: a review. *Bioresource Technology*, 1999, v. 70, p. 1-5.
- MA, J.; VAN WAMBEKE, M.; CARBALLA, M.; VERSTRAETE, W. Improvement of the anaerobic treatment of potato processing wastewater in a UASB reactor by co-digestion with glycerol. *Biotechnology letters*, 2008, v. 30, p. 861-867.
- MAGASANIK, B.; BROOKE, M.S.; KARIBIAN, D. Metabolic pathways of glycerol dissimilation: A comparative study of two strains of *Aerobacter aerogenes*. *Journal of Bacteriology*, 1953, v. 66, p. 611-619.
- MANGAYIL, R.; AHO, T.; KARP, M.; SANTALA, V. Improved bioconversion of crude glycerol to hydrogen by statistical optimization of media components. *Renewable Energy*, 2015, v. 75, p. 583-589.
- MARCHETTI, J.M.; MIGUEL, V.U.; ERRAZU, A.F. Possible methods for biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Review*, 2007, v. 11, p. 1300-1311.
- MARTENS, J.H.; BARG, H.; WARREN, M.; JAHN, D. Microbial production of vitamin B12. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, v. 58, p. 275-285.
- MENZEL, K.; ZENG, A.P.; DECKWER, W.D. High concentration and productivity of 1,3-propanediol from continuous fermentation of glycerol by *Klebsiella pneumoniae*. *Enzyme Microbiology Technology*, 1997, v. 20, p. 82-86.
- MME – Ministério de Minas e Energia. 2014. Disponível em <http://www.mme.gov.br/>. [acesso em 31/08/2014]
- MOON, C.; LEE, C.H.; SANG, B.; UM, Y. Optimization of medium compositions favoring butanol and 1,3-propanediol production from glycerol by *Clostridium pasteurianum*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2011, v. 102, p. 10561-10568.
- MOTA, C.J.A.; SILVA, C.X.A.; GONÇALVES, V.L.C. Glicerquímica: Novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. *Química Nova*, 2009, v. 32, p. 639-648.
- NAZARETH, T.C. Produção microbiológica de ácido propiônico, 1,3-propanodiol e hidrogênio a partir de glicerol bruto em reator anaeróbio de leito fluidizado. 2015. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Carlos. São Carlos. 2015.
- NTAIKOU, I.; ANTONOPOULOU, G.; LYBERATUS, G. Biohydrogen production from biomass and wastes via dark fermentation: a review. *Waste Biomass Valor*, 2010, v.1, p. 21-39.
- OH, B.-R.; SEO, J.-W.; CHOI, M.H.; KIM, C.H. Optimization of culture conditions for 1,3-propanediol production from crude glycerol by *Klebsiella pneumoniae* using response surface methodology. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2008, v. 13, p. 666-670.
- OH, B.-R.; HONG, W.-K.; HEO, S.-Y.; LUO, L.H.; KONDO, A.; SEO, J.-W.; KIM, C.H. The production of 1,3-propanediol from mixtures of glycerol and glucose by a *Klebsiella pneumoniae* mutant deficient in carbon catabolite repression. *Bioresource Technology*, 2013, v. 130, p. 719-724.

- O-THONG, S.; PRASERTSAN, P.; INTRASUNGKHA, N.; DHAMWICHUKORN, S.; BIRKELAND, N.K. Optimization of simultaneous thermophilic fermentative hydrogen production and COD reduction from palm oil mill effluent by *Thermoanaerobacterium*-rich sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2008, v. 33, p.1221-31.
- PAPANIKOLOAU, S.; MUNIGLIA, L.; CHEVALOT, I.; AGGELIS, G.; MARC, I. *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. *Journal Applied Microbiology*, 2002, v. 92, p. 737-744.
- PFLÜGL, S.; MARX, H.; MATTANOVICH, D.; SAUER, M. 1,3-Propanediol production from glycerol with *Lactobacillus diolivorans*. *Bioresource Technology*, 2012, v. 119, p. 133-140.
- PLAYNE, M.J. Propionic and butyric acids. In: Moon-Young, M. (Ed) *Comprehensive biotechnology*, vol. 3, 1985, Pergamon Press, New York, p. 731-759.
- QATIBI, A-I.; BORIES, A.; GARCIA, J-L. Sulfate reduction and anaerobic glycerol degradation by a mixed microbial culture. *Current Microbiology*, 1991, v. 22, p. 47-52.
- REHMAN, A.-U.; SAMAN WIJESEKARA, R.G.; NOMURA, N.; SATO, S.; MATSUMURA, M. Pre-treatment and utilization of raw glycerol from sunflower oil biodiesel for growth and 1,3-propanediol production by *Clostridium butyricum*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2008, v. 1080, p. 1072-1080.
- REIS, C.M. Efeito da velocidade ascensional e do tempo de detenção hidráulica na produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leite fluidizado. São Carlos. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de São Carlos, 2010.
- REUNGSANG, A.; SITTIJUNDA, S.; ANGELIDAKI, I. Simultaneous production of hydrogen and ethanol from waste glycerol by *Enterobacter aerogenes* KCU-S1. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2013, v. 38, p. 1813-25.
- REUNGSANG, A.; SITTIJUNDA, S.; O-THONG, S. Bio-hydrogen production from glycerol by immobilized *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 on heat-treated UASB granules as affected by organic loading rate. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 38, n. 17, 6970-6979, 2013.
- RIVALDI, J. D.; SARROUH, B. F.; FIORILLO, R.; SILVA, S. S. Glicerol de Biodiesel. *Biocologia Ciência e Desenvolvimento*, 2007, v. 37, p. 44-51.
- ROSA, P. R.F.; SANTOS, S.C.; SILVA, E.L. Different ratios of carbon sources in the fermentation of cheese whey and glucose as substrates for hydrogen and ethanol production in continuous reactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2014a, v. 39, p. 1288-1296.
- ROSA, P.R.F.; SANTOS, S.C.; SAKAMOTO, I.K.; VARESCHE, M.B.A.; SILVA, E.L. Hydrogen production from cheese whey with ethanol-type fermentation: Effect of hydraulic retention time on the microbial community composition. *Bioresource Technology*, 2014b, v. 161, p. 10-19.
- ROSA, P.R.F.; SANTOS, S.C.; SAKAMOTO, I.K.; VARESCHE, M.B.A.; SILVA, E.L. The effects of seed sludge and hydraulic retention time on the production of hydrogen from a cassava processing wastewater and glucose mixture in an anaerobic fluidized bed reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2014c, v. 39, p. 13118-13127.
- ROTH, J.R.; LAWRENCE, J.G.; BOBIK, T.A. Cobalamin (coenzyme B12) synthesis and biological significance. *Annual reviews in Microbiology*, 1996, v. 50, p. 137-181.
- SANTOS, S.C.; ROSA, P.R.F.; SAKAMOTO, I.K.; VARESCHE, M.B.A.; SILVA, E.L. Organic loading rate impact on biohydrogen production and microbial communities at anaerobic fluidized thermophilic bed reactors treating sugarcane stillage. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2014a, v. 159, p. 55-63.
- SANTOS, S.C.; ROSA, P.R.F.; SAKAMOTO, I.K.; VARESCHE, M.B.A.; SILVA, E.L. Continuous thermophilic hydrogen production and microbial community analysis from anaerobic digestion of diluted sugar cane stillage. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2014b, v. 39, p. 9000-9011.
- SANTOS, S.C.; ROSA, P.R.F.; SAKAMOTO, I.K.; VARESCHE, M.B.A.; SILVA, E.L. Hydrogen production from diluted and raw sugarcane vinasse under thermophilic anaerobic conditions. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2014b, v. 39, p. 9599-9610.
- SATTAYASAMITSATHIT, S.; PRASERTSAN, P.; METHACANON, P. Statistical optimization for simultaneous production of 1,3-propanediol and 2,3-butanediol using crude glycerol by newly bacterial isolate. *Process Biochemistry*, 2011, v.46, p. 608-614.
- SELEMBO, P.A.; PEREZ, J.M.; LLOYD, W.A.; LOGAN, B.E. Enhanced hydrogen and 1,3-propanediol production from glycerol by fermentation using mixed cultures. *Biotechnology and bioengineering*, 2009, v. 104, p. 1098-1106.
- SHIDA, G.M. Produção de hidrogênio e ácidos orgânicos por fermentação acidogênica em reator anaeróbio de leite fluidizado. São Carlos. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, 2008.
- SITTIJUNDA, S.; REUNGSANG, A. Media optimization for biohydrogen production from waste glycerol by anaerobic thermophilic mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2012, v. 37, p. 15473-15482.
- SONG, H.; LEE, S.Y. Production of succinic acid by bacterial fermentation. *Enzyme Microbiology Technology*, 2006, v. 39, p. 352-361.
- SORATE K.A.; BHALE, P.V. Biodiesel properties and automotive system compatibility issues. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2015, v. 41, p. 777-798.
- SURATAGO, T.; NOOTONG, K. Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* in an anaerobic moving bed bioreactor. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 2012, v. 31(2), p. 245-253.
- TONG, I-T.; LIAO, H.H.; CAMERON, D.C. 1,3-Propanediol production by *Escherichia coli* expressing genes from the *Klebsiella pneumoniae* dha regulon. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, v. 57, p. 3541-3546.
- VARRONE, C.; GIUSSANI, B.; IZZO, G.; MASSINI, G.; MARONE, A.; SIGNORINI, A.; WANG, A. Statistical optimization of biohydrogen and ethanol production from crude glycerol by microbial mixed culture. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2012, v. 37, p. 16479-16488.
- WALTER, C.; FRIEDEN, E. The prevalence and significance of the product inhibition of enzymes. *Advances in Enzymology and related areas of Molecular Biology*, 1963, v. 25, p. 167-274.
- WALKER, M.; ZHANG, Y.; HEAVEN, S.; BANKS, C. Potential errors in the quantitative evaluation of biogas production in anaerobic digestion processes. *Bioresource Technology*, 2009, v. 100, p. 6339-6346.
- WANG, J.; WAN, W. Factors influencing fermentative hydrogen production: a review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2009, v. 34, p. 799-811.
- WANG, Z.; JIN, Y.; YANG, S-T. High cell density propionic acid fermentation with an acid tolerant strain of *Propionibacterium acidipropionici*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2015, v. 9999, p. 1-10.

- WANG, Z.; YANG, S.T. Propionic acid production in glycerol/glucose co-fermentation by *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*. *Bioresource Technology*, 2013, v. 137, p. 116-123.
- WANG, Z.X.; ZHUGE, J.; FANG, H.; PRIOR, B.A. Glycerol production by microbial fermentation: a review. *Biotechnology Advances*, 2001, v. 19, p. 201-223.
- WETHMAR, M.; DECKWER, W.D. Semisynthetic culture medium for growth and dihydroxyacetone production by *Gluconobacter oxydans*. *Biotechnol. Tech*, 1999, v. 13, p. 283-287.
- YAZDANI, S.S.; GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol: A path to economic viability for the biofuels industry. *Current Opinion of Biotechnology*, 2007, v. 18, p. 213-219.
- YAZDANI, S.S.; GONZALEZ, R. Engineering *Escherichia coli* for the efficient conversion of glycerol to ethanol and co-products. *Metabolic Engineering*, 2008, v. 10, p. 340-351.
- YONG, K.C.; OOI, T.L.; DZULKEFLY, K.; WANYUNUS, W.M.Z.; HAZIMAH, A.H. Characterization of glycerol residue from a palm kernel oil methyl ester plant. *Journal of Oil Palm Research*, 2001, v.13, p. 1-6.
- YUE, G.; YU, J.; ZHANG, X.; TAN, T. The influence of nitrogen sources on ethanol production by yeast from concentrated sweet sorghum juice. *Biomass and Bioenergy*, 2012, v. 39, p. 48-52.
- ZENG, A.P. A new balance equation of reducing equivalents for data consistency check and bioprocess calculation. *J Biotechnol*, 1995, v. 43, p. 111 – 124.
- ZENG, A. P.; MENZEL, K.; DECKWER, W.D. Kinetic, dynamic and pathways 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*, 1996, v. 56, p. 561-571.
- ZHANG, G-L, MA, B-B, XU, X-L, LI, C.; WANG, L. Fast conversion of glycerol to 1,3-propanediol by new strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Biochemical Engineering Journal*, 2007, v. 37, p. 256-260.
- ZHANG, A.; YANG, S-T. Propionic acid production from glycerol by metabolically engineered *Propionibacterium acidipropionici*. *Process Biochemistry*, 2009, v. 44, p. 1346-1351.
- ZHU, Y.; LI, J.; TAN, M.; LIU, L.; JIANG, L.; SUN, J.; LEE, P.; DU, G.; CHEN, J. Optimization and scale-up of propionic acid production by propionic acid-tolerant *Propionibacterium acidipropionici* with glycerol as the carbon source. *Bioresource Technology*, 2010, v. 101, p. 8902-8906.
- ZHUGE, X.; LIU, L.; XIN, H.-D.; LI, J.; DU, G.; CHEN, J. Improved propionic acid production from glycerol with metabolically engineered *Propionibacterium jensenii* by integrating fed-batch culture with a pH-shift control strategy. *Bioresource Technology*, 2014, v. 152, p. 519-525.