

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

TALLES BARCELOS DA COSTA

**PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO E METANO A PARTIR DE GLICEROL BRUTO E
CULTURA MISTA EM REATORES ANAERÓBIOS DE LEITO FLUIDIZADO
TERMOFÍLICOS**

São Carlos - SP

2017

TALLES BARCELOS DA COSTA

**PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO E METANO A PARTIR DE GLICEROL BRUTO E
CULTURA MISTA EM REATORES ANAERÓBIOS DE LEITO FLUIDIZADO
TERMOFÍLICOS**

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.

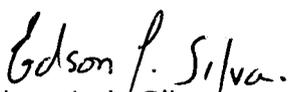
Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Silva

São Carlos - SP

2017

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
TALLES BARCELOS DA COSTA APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO CARLOS, EM 24 DE MARÇO DE 2017.

BANCA EXAMINADORA:


Edson Luiz Silva
Orientador, UFSCar


Marcelo Zaiat
USP


José Alberto Domingues Rodrigues
IMT

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Ana e Raimundo,

À minha irmã Tamiris,

Pela motivação, suporte e por me ensinarem os reais valores da vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela vida e por mais esta oportunidade de conhecer pessoas tão valiosas, nesta importante etapa da minha vida.

Ao Prof. Dr. Edson Luiz Silva pelo aceite de orientação, pelo comprometimento, dedicação, confiança, ensinamentos e auxílio em todas as etapas de execução desse projeto. Agradeço-o, acima de tudo, por ter visto potencial em mim, antes mesmo que eu enxergasse.

Ao CNPq pelo apoio financeiro concedido por meio da Bolsa de Mestrado (Processo 133228/2015-0).

À Profa. Dra. Mônica Lopes Aguiar (DEQ/UFSCar), pela delicadeza e cuidado nas considerações a respeito do Projeto de Dissertação e da postura de apresentação durante os seminários.

Ao Prof. Dr. Marcelo Zaiat (SHS/USP) e a Dra. Valéria Del Ney (SHS/USP), pela gentileza nos comentários, pelas valiosas sugestões e contribuições no Exame de Qualificação. Aproveito para agradecer ao Prof. Dr. Marcelo Zaiat (SHS/USP) e ao Prof. Dr. José Alberto Domingues Rodrigues (EEM/IMT), pelo aceite em avaliar esta Dissertação.

Aos docentes, Prof. Dr. Alberto Colli Badino Junior, Prof. Dr. Antonio José Gonçalves da Cruz, Prof. Dr. José Antônio Silveira Gonçalves, Prof. Dr. Luís Augusto Martins Ruotolo, Profa. Dra. Mônica Lopes Aguiar e Prof. Dr. Ruy de Sousa Junior, do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos, que me propiciaram acesso ao elevado grau de conhecimento acadêmico-científico, durante as disciplinas do mestrado, além do exemplo de profissionais e pessoas que representam.

Aos técnicos do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos, em especial a Alexandra Gonçalves, Amadeus Gomes de Azevedo e Oscar da Silva, pela grande ajuda e por socorrerem nos momentos de problemas durante as análises e operação dos reatores. Às auxiliares de limpeza, pela alegria e carinho com o Laboratório de Controle Ambiental II. A turma de mestrado do PPGEQ/2015, pela ajuda durante as disciplinas.

Agradeço imensamente aos colegas do LCAII/DEQ/UFSCar (Andreza, Lucas, Aline, Tiago, Gabriel, Ariane, Andressa, Camila e Isabelle). Aos alunos que me receberam no LCAII, Lucas, Aline, Tiago e Gabriel, muito obrigado pelos primeiros ensinamentos sobre as técnicas laboratoriais necessárias ao desenvolvimento desta pesquisa, em especial agradeço ao Lucas por sempre se mostrar disposto a contribuir com a operação e análises, além da Aline, por todo conhecimento e experiência com o glicerol, transmitidos de forma tão solícita. Ariane,

Andressa, Camila e Isabele, muito obrigado pela ajuda durante o segundo semestre de 2016, na operação e análises dos reatores, em especial agradeço a Ariane pela ajuda em horários e dias que não faziam parte da sua rotina laboratorial, muito obrigado pelo convívio, boas conversas e experiências compartilhadas.

À Andreza, minha companheira de laboratório na operação dos reatores, exemplo de competência e determinação, muito obrigado pela paciência, amizade, suporte e conselhos, pessoais e profissionais em todas as etapas deste projeto. Foi uma honra ter trabalhado com você e sua amizade vai para a vida!

Aos colegas da UFSJ em Ouro Branco e São Carlos, pela generosidade em ajudar sempre que eu necessitava. Em especial a Katy e a Camila, pela infinita paciência comigo, pelas risadas, apertos e boas conversas. A minha amiga Sabrina, mesmo distante, pelas infinitas conversas, pelo esforço imensurável em me ouvir e aconselhar, compartilhando parte do seu tempo torcendo para que esta etapa fosse concluída com sucesso.

Aos eternos e especiais amigos de Ouro Preto (Tayanne, Tainara e Gustavo), amigos de sempre, que entenderam minha ausência nesse período e torceram muito para que esse dia chegasse. Sei que posso contar com vocês!

Aos meus familiares, pelo constante e incansável incentivo dispensado a mim, por acreditarem nessa conquista e sempre me apoiarem. Meus pais, Ana e Raimundo, muito obrigado pelo carinho, suporte e motivação de sempre. Vocês são meus maiores exemplos de determinação, trabalho, humildade e amor. Esse título, assim como todos os outros, representam seus ensinamentos e valores. Minha irmã, Tamiris, sempre me motivando a seguir essa carreira, muito obrigado pelos conselhos e ensinamentos, pelo carinho verdadeiro e sincero.

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

Meus sinceros agradecimentos.

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo.”

Albert Einstein

RESUMO

COSTA, T. B. **Produção de hidrogênio e metano a partir de glicerol bruto e cultura mista em reatores anaeróbios de leito fluidizado termofílicos**. 2017. 146f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2017.

O presente estudo teve como objetivo avaliar a produção contínua de hidrogênio e metano, sob condições termofílicas (55 °C), utilizando glicerol bruto como substrato e cultura mista. O primeiro estudo visou a produção de H₂, e para tanto, um reator anaeróbio de leito fluidizado (RALF) acidogênico denominado RA foi operado sob variação do tempo de detenção hidráulica (TDH) entre 8 a 0,5 h, enquanto a concentração afluyente de glicerol foi fixada em 10,0 g L⁻¹. Os resultados obtidos mostraram que o máximo conteúdo, 78,5% e produtividade volumétrica de H₂, 1,46 L h⁻¹ L⁻¹, foram alcançados no TDH de 0,5 h. O máximo valor de rendimento de H₂ foi 1,28 mol H₂ mol⁻¹ glicerol_{consumido}, atingido no TDH de 1 h. Os principais metabólitos relacionados à elevada produção de H₂ foram o ácido butírico e butanol, porém houve elevada produção de 1,3-propanodiol no TDH de 6 h, alcançando rendimento máximo de 0,80 mol 1,3-PDO mol⁻¹ glicerol_{consumido}. O segundo estudo, por sua vez, consistiu na avaliação da influência da estratégia de adaptação adotada na operação de dois RALF metanogênicos, RM1 e RM2. O RM1 foi operado sob variação da concentração afluyente de glicerol entre 1,0 a 7,0 g L⁻¹, enquanto o TDH foi fixado em 24 h e a taxa de carregamento orgânico aplicada (TCO') variando entre 1,0 a 7,0 kg DQO m⁻³ d⁻¹. O máximo conteúdo, 86,2% e rendimento de CH₄, 0,47 m³ CH₄ kg⁻¹ DQO_{aplicada}, foram atingidos nas TCO' de 1,0 e 3,0 kg DQO m⁻³ d⁻¹, respectivamente. A máxima produtividade volumétrica de CH₄, 4,27 L d⁻¹ L⁻¹, foi alcançada na TCO' de 7,0 kg DQO m⁻³ d⁻¹. No RM2 o TDH variou de 36 a 6 h, enquanto a concentração afluyente de glicerol foi fixada em 10,0 g L⁻¹ e a TCO' variando entre 6,7 a 40,0 kg DQO m⁻³ d⁻¹. Foi observado que a aplicação de elevadas TCO' em um reator não adaptado, mostrou-se degenerativa à produção de CH₄, devido ao acúmulo de ácidos voláteis no sistema. Assim, pode-se inferir que o glicerol bruto, principal subproduto das biorrefinarias de biodiesel, pode ser utilizado na produção de bioenergia (H₂ e CH₄) e metabólitos de valor agregado, valorizando a cadeia produtiva deste biocombustível.

Palavras-chave: Biodiesel, glicerol bruto, hidrogênio, metano, reator anaeróbio de leito fluidizado.

ABSTRACT

COSTA, T. B. **Hydrogen and methane production from crude glycerol and mixed culture in thermophilic anaerobic fluidized bed reactors**. 2017. 146f. Dissertation (Master's degree) – Exact and Technology Sciences Center, Federal University of São Carlos, 2017.

The study aimed to evaluate the continuous production of hydrogen and methane under thermophilic conditions (55 °C) using crude glycerol as substrate and mixed culture. The first study aimed at the production of H₂, and therefore, an acidogenic anaerobic fluidized bed reactor (AFBR) called RA was operated under hydraulic retention time (HRT) variation between 8 and 0.5 h while the affluent glycerol concentration was fixed in 10.0 g L⁻¹. The results showed that the maximum content, 78.5% and H₂ volumetric productivity, 1.46 L h⁻¹ L⁻¹, were reached in HRT of 0.5 h. The maximum H₂ yield value of was 1.28 mol H₂ mol⁻¹ glycerol_{consumed}, reached in HRT of 1 h. The main metabolites related to high H₂ production were butyric acid and butanol, but there was a high production of 1,3-propanediol in the HRT of 6 h, reaching maximum yield of 0.80 mol 1,3-PDO mol⁻¹ glycerol_{consumed}. The second study, in turn, consisted in evaluating the influence of the adaptation strategy adopted in the operation of two methanogenic AFBR, RM1 e RM2. The RM1 was operated under affluent glycerol concentration variation between 1.0 and 7.0 g L⁻¹, while HRT was fixed in 24 h and the applied organic loading rate (OLR') variation between 1.0 and 7.0 kg COD m⁻³ d⁻¹. The maximum content, 86.2% and CH₄ yield, 0.47 m³ CH₄ kg⁻¹ COD_{applied}, were reached in the OLR' of 1.0 and 3.0 kg COD m⁻³ d⁻¹, respectively. The maximum CH₄ volumetric productivity, 4.27 L d⁻¹ L⁻¹, was reached in the OLR' of 7.0 kg COD m⁻³ d⁻¹. At RM2 the HRT ranged from 36 to 6 h while the affluent glycerol concentration was set at 10.0 g L⁻¹ and the OLR' variation between 6.7 and 40.0 kg COD m⁻³ d⁻¹. It was observed that the application of high TCO' in an unadapted reactor, was shown degenerative to the production of CH₄, due to the accumulation of volatile acids in the system. Thus, it can be inferred that crude glycerol, the main by-product of biodiesel biorefineries, can be used in the production of bioenergy (H₂ and CH₄) and value-added metabolites, valuing the productive chain of this biofuel.

Keywords: Biodiesel, crude glycerol, hydrogen, methane, anaerobic fluidized bed reactor.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 3.1: Fluxograma do processo de produção de biodiesel.....	8
Figura 3.2: Principais setores industriais de utilização da glicerina.....	9
Figura 3.3: Glicerina gerada na produção de biodiesel (B100), segundo grandes regiões – 2006 - 2015.....	10
Figura 3.4: Representação esquemática das principais etapas da digestão anaeróbia (1) bactérias hidrolíticas (2) bactérias acidogênicas fermentativas, (3) bactérias acetogênicas produtoras de hidrogênio, (4) bactérias acetogênicas consumidoras de hidrogênio, (5) <i>archaeas</i> metanogênicas hidrogenotróficas, (6) <i>archaeas</i> metanogênicas acetoclásticas e (7) bactérias redutoras de sulfato e bactérias redutoras de nitrato.....	12
Figura 3.5: Rotas metabólicas de fermentação de glicerol até compostos mais simples.....	14
Figura 4.1: Instalação experimental (modo contínuo) do RALF.....	50
Figura 4.2: Reator anaeróbio de leito fluidizado termofílico.....	51
Figura 4.3: A) Partículas de argila expandida (cinasita) utilizadas no RA. B) Partículas de pneu triturado utilizadas no RM1 e RM2.....	52
Figura 5.1: Boxplot das conversões de glicerol no RA.....	64
Figura 5.2: Composição do biogás produzido pelo RA em relação ao TDH aplicado.....	67
Figura 5.3: Boxplot da produção volumétrica de H ₂ produzido pelo RA em relação ao TDH aplicado.....	70
Figura 5.4: Boxplot para os rendimentos de H ₂ produzidos pelo RA em relação ao TDH aplicado.....	73
Figura 5.5: Porcentagem molar dos principais metabólitos produzidos pelo RA em relação ao TDH aplicado.....	79
Figura 5.6: Boxplot das remoções de DQO no RA.....	86
Figura 5.7: Boxplot das conversões de glicerol no RM1.....	93
Figura 5.8: Boxplot das conversões de glicerol no RM2.....	93
Figura 5.9: Boxplot das remoções de DQO no RM1.....	96
Tabela 5.10: Boxplot das remoções de DQO no RM2.....	96
Tabela 5.11: Boxplot das relações entre taxa de carregamento orgânico aplicada (TCO') e taxa de carregamento orgânico removida (TCO _{removida} ') para o RM1.....	99
Figura 5.12: Valores médios de AB afluente e efluente para o RM1.....	102
Figura 5.13: Valores médios de AB afluente e efluente para o RM2.....	102

Figura 5.14: Boxplot das concentrações de AGV no efluente do RM1.....	104
Figura 5.15: Boxplot das concentrações de AGV no efluente do RM2.....	104
Figura 5.16: Boxplot das relações AI/AP no efluente do RM1.....	105
Figura 5.17: Boxplot das relações AI/AP no efluente do RM2.....	106
Figura 5.18: Composição do biogás produzido pelo RM1 em relação à TCO' aplicada.....	109
Figura 5.19: Composição do biogás produzido pelo RM2 em relação à TCO' aplicada.....	110
Figura 5.20: (A) Boxplot da produção volumétrica de CH ₄ no RM1. (B) Boxplot para os rendimentos de CH ₄ produzidos pelo RM1.....	112
Figura 5.21: (A) Boxplot da produção volumétrica de CH ₄ no RM2. (B) Boxplot para os rendimentos de CH ₄ produzidos pelo RM2.....	113
Figura 5.22: Porcentagem molar dos principais metabólitos produzidos pelo RM1 em relação à TCO' aplicada.....	119
Figura 5.23: Porcentagem molar dos principais metabólitos produzidos pelo RM2 em relação à TCO aplicada.....	122

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Evolução da utilização de diferentes matérias-primas para produção de biodiesel.....	6
Tabela 3.2: Estequiometria e variação da energia livre (ΔG^0) das reações de acidogênese, acetogênese e metanogênese.....	17
Tabela 3.3: Resumo da literatura sobre as condições para produção de H_2 a partir de glicerol.....	27
Tabela 3.4: Resumo da literatura sobre as condições para produção de CH_4 a partir de glicerol.....	36
Tabela 4.1: Características físicas dos materiais suporte.....	52
Tabela 4.2: Caracterização da solução de glicerol bruto ($\sim 5,0 \text{ g L}^{-1}$).....	53
Tabela 4.3: Composição do meio nutricional adicionado ao RA.....	54
Tabela 4.4: Composição da solução de elementos traços (SL7) adicionada ao RA.....	54
Tabela 4.5: Composição da solução de nutrientes adicionada ao RM1 e RM2.....	55
Tabela 4.6: Condições operacionais do RA.....	57
Tabela 4.7: Condições operacionais do RM1.....	58
Tabela 4.8: Condições operacionais do RM2.....	59
Tabela 4.9: Frequência de análises de monitoramento dos reatores ao longo da realização do experimento.....	61
Tabela 5.1: Descrição das fases de operação do RA e suas características.....	63
Tabela 5.2: Concentrações e conversões médias de glicerol no RA.....	64
Tabela 5.3: Composição dos componentes do biogás produzido pelo RA.....	67
Tabela 5.4: Valores médios de produção volumétrica de H_2 para os diferentes TDH aplicados.....	69
Tabela 5.5: PVH encontradas na literatura utilizando a configuração de reator RALF.....	72
Tabela 5.6: Valores médios de rendimentos de H_2 para os diferentes TDH aplicados.....	72
Tabela 5.7: Comparação do desempenho na produção de hidrogênio entre o trabalho atual e os reportados na literatura.....	76
Tabela 5.8: Concentração (g L^{-1}) e fração molar (%) dos metabólitos detectados durante a operação do RA.....	78
Tabela 5.9: Produção volumétrica ($\text{g h}^{-1} \text{ L}^{-1}$) e rendimentos (mol mol^{-1}) dos metabólitos detectados durante a operação do RA.....	80

Tabela 5.10: Produção volumétrica e rendimento de 1,3-PDO obtidos no RA para os diferentes TDH aplicados.....	83
Tabela 5.11: Comparação do desempenho na produção de 1,3-PDO entre o trabalho atual e os reportados na literatura.....	85
Tabela 5.12: Concentrações afluente, efluente e sua respectiva remoção de DQO no RA.....	86
Tabela 5.13: Valores médios de pH afluente e efluente para o RA.....	88
Tabela 5.14: Valores médios de Sólidos suspensos totais (SST), fixos (SSF) e voláteis (SSV) no efluente do RA.....	89
Tabela 5.15: Balanço de DQO para as 6 fases operacionais realizadas no RA.....	90
Tabela 5.16: Descrição das fases de operação do RM1 e RM2 e suas características.....	91
Tabela 5.17: Concentrações e conversões médias de glicerol no RM1 e RM2.....	92
Tabela 5.18: DQO (afluente e efluente) e remoções de DQO médias no RM1 e RM2.....	95
Tabela 5.19: Valores médios de pH e AB afluente e efluente para o RM1 e RM2.....	100
Tabela 5.20: Valores médios de AGV e relação AI/AP afluente e efluente para o RM1 e RM2.....	103
Tabela 5.21: Composição dos componentes do biogás produzido pelo RM1 e RM2.....	108
Tabela 5.22: Valores médios de produção volumétrica e rendimentos de CH ₄ em DQO e glicerol para o RM1 e RM2.....	111
Tabela 5.23: Comparação do desempenho na produção de metano entre os trabalhos atuais e os reportados na literatura.....	117
Tabela 5.24: Concentração (g L ⁻¹) e fração molar (%) dos metabólitos detectados durante a operação do RM1.....	118
Tabela 5.25: Concentração (g L ⁻¹) e fração molar (%) dos metabólitos detectados durante a operação do RM2.....	121
Tabela 5.26: Valores médios de Sólidos suspensos totais (SST), fixos (SSF) e voláteis (SSV) no efluente do RM1 e RM2.....	124
Tabela 5.27: Balanço de DQO para as 3 fases operacionais que apresentaram acúmulo de metabólitos no RM1.....	126
Tabela 5.28: Balanço de DQO para as 6 fases operacionais realizadas no RM2.....	126
Tabela 5.29: Comparação entre a produção de metano, carga orgânica removida e acúmulo de ácidos voláteis nos reatores RM1 e RM2.....	127

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

ΔG^0 : Variação da Energia Livre de Gibbs

1,3-PDO: 1,3-Propanodiol

1,3-PDY: *1,3-propanediol yield* (Rendimento de 1,3-PDO em mol);

1,3-PDY': *1,3-propanediol yield* (Rendimento de 1,3-PDO em grama);

AB: Alcalinidade Bicarbonato

AI: Alcalinidade Intermediária

AP: Alcalinidade Parcial

ABR: *Anaerobic Baffled Reactor*

AGCL: cidos Graxos de Cadeia Longa

AGV: cidos Graxos Voláteis

ANP: Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis

AnSBBR: *Anaerobic Sequencing Batch Biofilm Reactor*

ASBR: *Anaerobic Sequencing Batch Reactor*

ButOH: n-Butanol

C_{CH_4} : Concentração de CH_4 no biogás

C_{CO_2} : Concentração de CO_2 no biogás

C_{H_2} : Concentração de H_2 no biogás

CH_4 : Metano

CNTP: Condição Normal de Temperatura e Pressão

CO_2 : Dióxido de Carbono

COV: Carga Orgânica Volumétrica

CSTR: *Continuous Stirred Tank Reactor*

DQO: Demanda Química de Oxignio

$DQO_{af lu}$: DQO afluente

$DQO_{ef lu}$: DQO efluente

EGSB: *Expanded Granular Sludge Bed*

EtOH: Etanol

$G_{af lu}$: glicerol afluente

$G_{ef lu}$: glicerol efluente

GB: Glicerol bruto

GP: Glicerina pura

H_2 : Hidrogênio

HAc: Ácido Acético
HBu: Ácido Butírico
HCa: Ácido Capróico
HIsoBu: Ácido Isobutírico
HIsoVa: Ácido Isovalérico
HPr: Ácido Propiônico
HVa: Ácido Valérico
HY: *Hydrogen yield* (Rendimento de Hidrogênio)
KOH: Hidróxido de potássio
MetOH: Metanol
MY: *Methane yield* (Rendimento de Metano em glicerol)
MY': *Methane yield* (Rendimento de Metano em DQO)
NaOH: Hidróxido de sódio
PABR: *Periodic Anaerobic Baffled Reactor*
P_{H2}: Pressão Parcial de Hidrogênio
PNPB: Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel
PV1,3-PD: Produção volumétrica de 1,3-PDO;
PVH: Produção Volumétrica de Hidrogênio em L h⁻¹ L⁻¹
PVH': Produção Volumétrica de Hidrogênio em mmol h⁻¹ L⁻¹
PVM: Produção Volumétrica de Metano
RALF: Reator Anaeróbico de Leito Fluidizado
RA: RALF acidogênico com concentração de glicerol bruto de 10,0 g L⁻¹
RM1: RALF metanogênico com concentração de glicerol bruto variando entre 1,0 a 7,0 g L⁻¹.
RM2: RALF metanogênico com concentração de glicerol bruto de 10,0 g L⁻¹
SSF: Sólidos Suspensos Fixos
SST: Sólidos Suspensos Totais
SSV: Sólidos Suspensos Voláteis
TCO: Taxa de Carregamento Orgânico Aplicada em glicerol
TCO': Taxa de Carregamento Orgânico Aplicada em DQO
TCO_{removida}': Taxa de Carregamento Orgânico Removida em DQO
TDH: Tempo de Detenção Hidráulica
UASB: *Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor*
UFCB: *Anaerobic Up-flow Column Bioreactor*
X_A: Conversão ou consumo do substrato

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	5
2.1 OBJETIVO GERAL.....	5
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
3.1 A INDÚSTRIA DE BIODIESEL NO BRASIL E NO MUNDO	6
3.2 PRODUÇÃO DE BIODIESEL	7
3.3 O GLICEROL	9
3.4 DIGESTÃO ANAERÓBIA.....	11
3.5 FERMENTAÇÃO DO GLICEROL: ROTAS METABÓLICAS	13
3.6 RENDIMENTO TEÓRICO DE HIDROGÊNIO E METANO NA FERMENTAÇÃO DO GLICEROL.....	18
3.7 PRODUÇÃO DE BIOENERGIA A PARTIR DE GLICEROL COMO FONTE DE CARBONO.....	20
3.7.1 Produção biológica de hidrogênio a partir de glicerol	20
3.7.2 Produção biológica de metano a partir de glicerol	28
3.8 PRINCÍPIOS E FUNDAMENTOS FERMENTATIVOS SOB TEMPERATURA TERMOFÍLICA	38
3.9 PRODUÇÃO DE BIOENERGIA EM REATOR ANAERÓBIO DE LEITO FLUIDIZADO	39
3.9.1 Produção de hidrogênio em RALF	40
3.9.2 Produção de metano em RALF	44
3.10 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	47
4 MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.1 REATOR ANAERÓBIO DE LEITO FLUIDIZADO	49
4.2 MATERIAL SUPORTE.....	51
4.3 ÁGUA RESIDUÁRIA	53
4.4 MEIO NUTRICIONAL.....	54
4.5 INÓCULO	55
4.6 FASE DE ADPTAÇÃO DO INÓCULO	56
4.7 CONDIÇÕES OPERACIONAIS	57
4.7.1 RALF acidogênico – RA	57
4.7.2 RALF metanogênico – RM1	58
4.7.3 RALF metanogênico – RM2	58

4.8 MÉTODOS ANALÍTICOS	59
4.9 FREQUÊNCIA DAS ANÁLISES	61
4.10 CÁLCULO DOS PRINCIPAIS INDICADORES DE DESEMPENHO.....	62
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5.1 RALF ACIDOGÊNICO – RA	63
5.1.1 Consumo de glicerol.....	63
5.1.2 Composição do biogás.....	66
5.1.3 Produção volumétrica de hidrogênio	69
5.1.4 Rendimento de hidrogênio	72
5.1.5 Metabólitos solúveis produzidos	77
<i>5.1.5.1 Produção volumétrica e rendimento de 1,3-propanodiol.....</i>	<i>83</i>
5.1.6 Remoção de DQO, pH e sólidos suspensos	86
5.2 RALF METANOGÊNICO – RM1 e RM2	91
5.2.1 Consumo de glicerol.....	91
5.2.2 Remoção de DQO.....	94
5.2.3 Avaliação do pH, alcalinidade bicarbonato e ácidos graxos voláteis	100
5.2.4 Composição do biogás, produtividade volumétrica e rendimento de metano	108
5.2.5 Metabólitos solúveis produzidos no RM1 e RM2.....	118
5.2.6 Sólidos suspensos e balanço de DQO	124
5.2.7 Análise comparativa dos reatores metanogênicos.....	127
6 CONCLUSÕES	129
7 SUGESTÕES	130
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	131

1 INTRODUÇÃO

Os atuais problemas ambientais causados pela utilização de combustíveis fósseis são tema de amplo debate. Entre os problemas associados a esses combustíveis, estão o fato de não serem renováveis, apresentarem alto custo e instabilidade de preços, além da instabilidade geopolítica nas principais regiões produtoras. Desta forma, a utilização de fontes alternativas de energia é umas das grandes prioridades atuais, que vem contribuir significativamente para contornar os graves problemas ocasionados pelo desenvolvimento tecnológico.

O aumento na produção de biocombustíveis, como o etanol e o biodiesel, estão entre as mais importantes alternativas energéticas consideradas para substituir combustíveis derivados do petróleo. 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.

Visando complementar o uso do óleo diesel, o Brasil vem incorporando o biodiesel na matriz energética nacional através do Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB), instituído em 2004 pelo Governo Federal, que estabelece a adição obrigatória do biocombustível ao diesel fóssil. Em 2008 a adição estabelecida foi de 3% (B3), em 2010 de 5% (B5) e em 2014 de 7% (B7), de acordo com as seguintes legislações: Lei nº 11.097 (2005), resolução ANP nº 7 (2008), Lei nº 13.033 (2014). Dados da ANP indicam que a produção anual de biodiesel, em 2015, foi na ordem de 3,9 bilhões de litros e a geração de glicerol, principal subproduto gerado do processo de produção de biodiesel, foi estimado em 347 milhões de litros.

Com o intuito de evitar futuros problemas derivados da acumulação de glicerol, uma vez que o mercado atual não é suficiente para consumir a grande produção dessa substância, e para tornar a produção de biodiesel mais competitiva, torna-se necessária a busca de alternativas para utilização desse resíduo, de modo a estabilizar o preço e a oferta do biodiesel e do seu subproduto (LEONETI et al., 2012).

Este subproduto, na forma pura, possui inúmeras aplicações industriais (aditivos para as indústrias de alimentos, química e farmacêutica). O glicerol obtido resultante da transesterificação de triglicerídios com álcool apresenta impurezas como água, sais, ésteres, álcool e óleo residual, que lhe conferem um baixo custo (OOI et al., 2004). Dessa forma, existe um grande interesse na purificação do glicerol ou no seu reaproveitamento direto, sem

tratamento, o que proporcionará à viabilização do processo de produção de biodiesel, permitindo que este se torne competitivo no crescente mercado de biocombustíveis. No entanto, os tratamentos de purificação são de custo excessivamente elevados para pequenos e médios produtores nacionais de biodiesel. Devido a este fato, uma maior quantidade de efluentes contendo glicerol poderá ser descartada no meio ambiente sem nenhum tratamento, aumentando consequentemente os problemas e riscos ambientais.

A conversão microbiana de glicerol por processos biológicos em produtos de maior valor agregado como biomassa e biomoléculas, além de co-geração de bioenergia é uma alternativa relevante para a maior valorização da produção de biodiesel (ITO et al., 2005). Nos últimos anos, o uso de glicerol como substrato orgânico para síntese biológica de outros produtos tem se intensificado, sendo os principais: 1,3-propanodiol (BARBIRATO et al., 1998; BIEBL et al., 1998; ZHANG et al., 2007a); etanol (JARVIS et al., 1997; ITO et al., 2005); ácido propiônico (BARBIRATO et al., 1997; HIMMI et al., 2000; ZHANG & YANG, 2009); ácido butírico e acético (FORREST et al., 2010) e hidrogênio (ITO et al., 2005; REUNGSANG et al., 2013; LO et al., 2013). Além disso, o número de pesquisas sobre a utilização de glicerol no tratamento anaeróbio de águas residuárias tem aumentado, em especial para produção de metano (YANG et al., 2008; SILES LÓPEZ et al., 2009; HUTŇAN et al., 2009; ZHANG et al., 2015), visando geração de energia.

Produtos com alto valor agregado e amplamente utilizados podem ser obtidos a partir da fermentação do glicerol. Como exemplo, o 1,3-propanodiol, é utilizado na fabricação de cosméticos, lubrificantes e medicamentos, além de ser considerado um valioso intermediário químico potencialmente utilizado na manufatura de polímeros (poliésteres, poliuretanos, entre outros) e na síntese de compostos heterocíclicos (MENZEL et al., 1997; BIEBL et al., 1999). Além disso, diante do cenário atual de esgotamento de reservas fósseis e minerais, o biohidrogênio e o biometano se consolidam como promissoras alternativas energéticas e renováveis.

A configuração do reator é fator relevante para a produção de metano, hidrogênio e metabólitos via processo fermentativo. Inúmeros trabalhos têm utilizado ensaios descontínuos (ITO et al., 2005; SELEMBRO et al., 2009; NGO et al., 2011; MARU et al., 2013; DINH et al., 2014) na fermentação de glicerol. No entanto, o emprego de reatores contínuos ainda é precário na literatura científica, verificando-se a utilização de reatores UASB (HUTŇAN et al., 2013a; REUNGSANG et al., 2013; CHOOKAEW et al. 2014) e CSTR (LO et al., 2013; ZHANG et al., 2015).

Dessa forma, o reator anaeróbio de leito fluidizado (RALF) surge como opção viável na conversão microbiana do glicerol devido a sua capacidade em oferecer vantagens como boa retenção de biomassa sobre o meio suporte, boa capacidade de transferência de massa e energia, bom sistema de homogeneização com mistura na fase líquida, o que favorece o desprendimento do biogás (SHIDA, 2008).

Nesse contexto, devido ao aumento constante na demanda por biodiesel e geração de glicerol bruto, esse projeto propõe a aplicação do RALF para utilização desse subproduto como substrato na fermentação acidogênica para gerar hidrogênio, álcoois e ácidos orgânicos e na fermentação acidogênica seguida de metanogênese para gerar metano, sob condição termofílica (55 °C) e cultura mista.

O desenvolvimento, adaptação e operação de reatores para a produção de H₂ e CH₄ sob condições termofílicas, ainda representam desafios e requerem pesquisas futuras. Sabe-se que do ponto de vista econômico e tecnológico a condição mesofílica é preferível comparada à termofílica. Entretanto, condições termofílicas para a produção de H₂ e CH₄ podem apresentar vantagens no tratamento de águas residuárias lançadas em temperaturas elevadas, como o glicerol bruto, por se tratar de um subproduto que deixa a etapa de destilação a altas temperaturas (70 °C), implicando em pouca dependência de energia para o sistema, que poderia reduzir os custos da planta de tratamento e valorizando a cadeia produtiva do biodiesel.

Nesse sentido, a produção de bioenergia a altas temperaturas poderá aumentar a produção de H₂ e CH₄, selecionando microrganismos produtores eficientes de bioenergia (FANGKIM e REUGSANG, 2011; ZHANG et al., 2015). Processos termofílicos exibem baixa solubilidade de H₂ na fase aquosa, e melhores condições de transferência líquido-gás de H₂ (AKUTSU et al., 2009). Além disso, o funcionamento a temperaturas elevadas pode melhorar o desempenho da fermentação, promovendo a hidrólise dos compostos orgânicos e simplificando a comunidade microbiana favorável para a produção de bioenergia (KIM et al., 2011).

Adicionalmente, muitos estudos tem investigado a produção biológica de hidrogênio a partir de glicerol bruto, sendo a maioria realizada em condições mesofílicas (ITO et al., 2005; SELEMBRO et al., 2009; REUNGSANG et al., 2013; LO et al., 2013). Porém, poucos trabalhos foram executados em reatores contínuos e condição termofílica (FERREIRA, 2014), o que permite contribuir com informações sobre um tema ainda pouco investigado. Logo, o primeiro estudo desse trabalho teve como objetivo avaliar a produção contínua de hidrogênio,

em um RALF acidogênico denominado RA, variando o tempo de detenção hidráulica (TDH) de 8 a 0,5 h e mantendo a concentração afluyente de glicerol fixa em $10,0 \text{ g L}^{-1}$ ao longo do experimento. De maneira análoga, poucos trabalhos reportados na literatura abordam a produção de metano a partir de glicerol, sendo a maioria realizada em temperatura mesofílica (HUTŇAN et al., 2013b; PHUKINGNGAM et al., 2011; BOONSAWANG et al., 2015). Ainda menor é o número de trabalhos em reatores contínuos e condição termofílica (YANG et al., 2008). Assim, o segundo estudo desse trabalho propõe avaliar a produção biológica de metano, utilizando diferentes estratégias operacionais em dois RALF metanogênicos. O RM1 foi operado sob variação da concentração afluyente de glicerol entre $1,0$ a $7,0 \text{ g L}^{-1}$ em TDH fixo de 24 h e o RM2 mantendo a concentração afluyente de glicerol fixa em $10,0 \text{ g L}^{-1}$, sob variação do TDH de 36 a 6 h.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção biológica de hidrogênio e metano em reatores anaeróbios de leito fluidizado independentes, ambos sob temperatura termofílica (55 °C), cultura mista e utilizando glicerol bruto oriundo da produção de biodiesel como fonte de carbono.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Avaliar a influência do TDH (8 a 0,5 h) e concentração afluyente de glicerol fixa em 10,0 g L⁻¹ na capacidade de produção de hidrogênio (produção volumétrica, rendimento e conteúdo de H₂ no biogás), assim como a influência das condições operacionais na produção e distribuição dos principais metabólitos dissolvidos verificados durante a operação do RA;
- Investigar a capacidade de produção de metano (produção volumétrica, rendimento e conteúdo de CH₄ no biogás) utilizando como estratégia de operação a adaptação em diferentes concentrações afluyente de glicerol (1,0 a 7,0 g L⁻¹) em TDH fixo de 24 h no RM1 e o efeito do TDH (36 a 6 h) em concentração afluyente de glicerol fixa em 10,0 g L⁻¹ na operação sem adaptação no RM2, assim como a influência das condições operacionais na produção e distribuição dos principais metabólitos dissolvidos verificados durante a operação dos RALF metanogênicos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A INDÚSTRIA DE BIODIESEL NO BRASIL E NO MUNDO

Nas últimas décadas, muita atenção tem sido dada para a produção de biocombustíveis, a fim de reduzir a dependência de combustíveis fósseis. O desenvolvimento de novas fontes de energia obtidas a partir da biomassa, como o biogás, bioetanol e biodiesel têm sido exploradas. O Brasil foi o pioneiro no uso de 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 (DA SILVA et al., 2009).

Outro biocombustível produzido a partir da biomassa é o biodiesel. Assim como o bioetanol pode substituir a gasolina em motores de ciclo Otto, o biodiesel pode ser utilizado diretamente nos motores de combustão interna (RASHID et al., 2008). O mercado mundial de biodiesel foi estimado em 140 bilhões de litros em 2016 e com o aumento do crescimento anual, a produção atingirá 159 bilhões de litros em 2020 (NWACHUKWU et al., 2013)

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 bovinos que fornecem gordura animal ou sebo (GONÇALVES et al., 2009). A Tabela 3.1 apresenta a evolução da utilização das principais matérias-primas empregadas na produção de biodiesel no Brasil.

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

Matérias-primas	Matérias-primas utilizadas na produção de biodiesel (B100)* (m ³)									
	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
Total	69.012	408.005	1.177.638	1.614.834	2.387.639	2.672.771	2.719.897	2.921.006	3.415.467	3.938.873
Óleo de soja	65.764	353.233	967.326	1.250.590	1.980.346	2.171.113	2.105.334	2.231.464	2.625.558	3.061.027
Óleo de algodão	-	1.904	24.109	70.616	57.054	98.230	116.736	64.359	76.792	78.840
Gordura animal	816	34.445	154.548	255.766	302.459	358.686	458.022	578.427	675.861	738.920
Outros materiais graxos	2.431	18.423	31.655	37.863	47.781	44.742	39.805	46.756	37.255	60.086

*B100 = Biodiesel 100% puro.

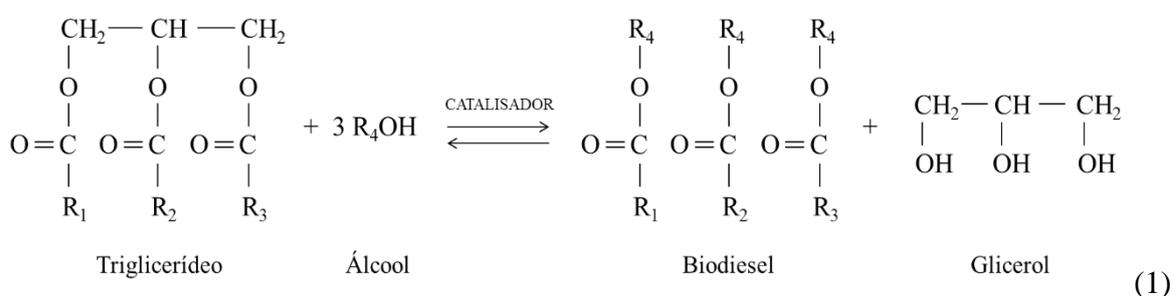
Fonte: ANP/SPD, conforme Resolução ANP nº 17/2004.

Visando à gradual substituição do diesel, o Brasil vem incorporando o biodiesel na matriz energética nacional através do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB), instituído em 2004 pelo Governo Federal, que estabelece a adição obrigatória do biocombustível ao diesel fóssil. Em 2008 a adição estabelecida foi de 3% (B3), em 2010 de 5% (B5) e em 2014 de 7% (B7), de acordo com as seguintes legislações: Lei nº 11.097 (2005), resolução ANP nº 7 (2008), Lei nº 13.033 (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.

De acordo com dados da ANP (2015), a capacidade nominal para produção de biodiesel (B100) no Brasil era de cerca de 7,7 milhões de m³ (21,2 mil m³ dia⁻¹). Entretanto, a produção nacional foi de 3,4 milhões de m³, o que correspondeu a 44,3% da capacidade total.

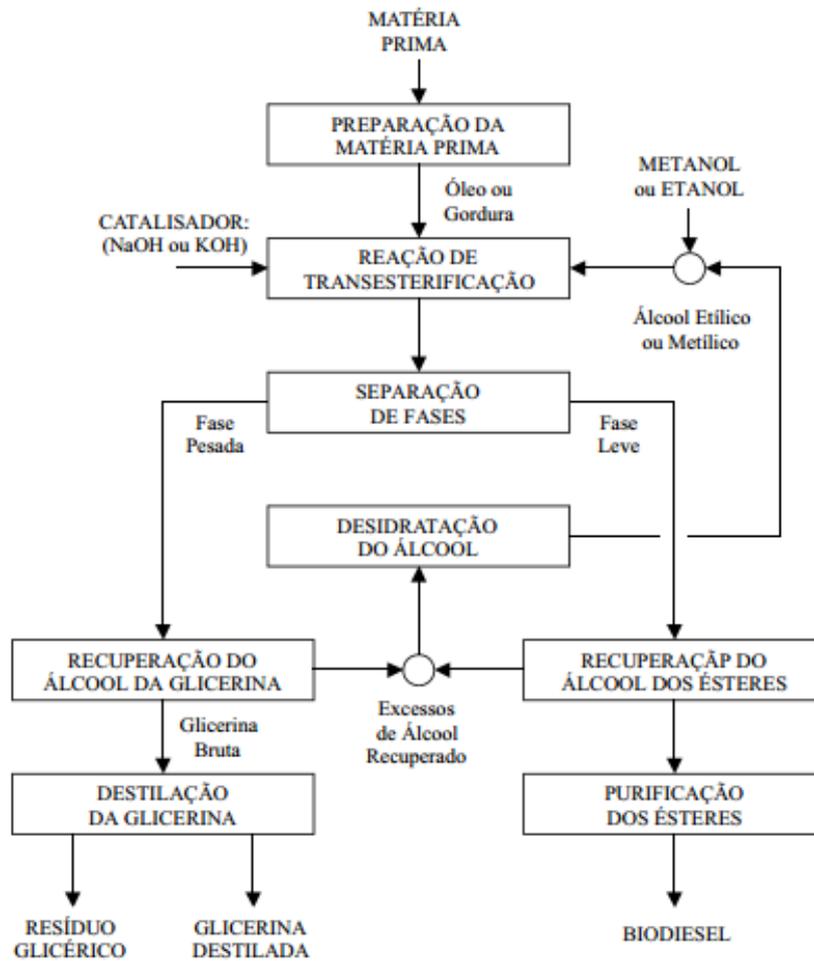
3.2 PRODUÇÃO DE BIODIESEL

O processo mais amplamente empregado para a produção de biodiesel é a transesterificação. Nessa reação (1) o óleo (triglicerídeo) reage com um álcool simples (metanol ou etanol), formando como produto principal o biodiesel (mistura de ésteres metílico ou etílico) e glicerol como subproduto. Os catalisadores mais eficientes para esse propósito são hidróxido de potássio (KOH) ou hidróxido de sódio (NaOH), observando-se maior rendimento e seletividade, além de apresentar menores problemas relacionados à corrosão de equipamentos (PAPANIKOLAOU et al, 2002; GONZÁLEZ-PAJUELO et al, 2004; MU et al, 2006).



A produção de biodiesel através da transesterificação envolve as etapas de preparação da matéria prima, reação, separação de fases, recuperação e desidratação do álcool, purificação dos ésteres e do glicerol (Figura 3.1).

Figura 3.1 – Fluxograma do processo de produção de biodiesel.



Fonte: PARENTE (2003).

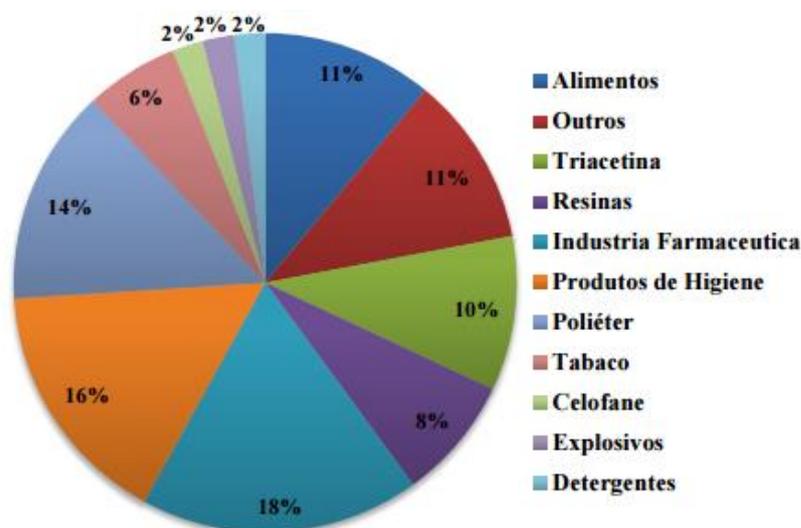
Inicialmente é realizada a seleção da matéria-prima (óleos vegetais ou gorduras animais). Para obter um resultado satisfatório, os óleos ou gorduras devem ser processados com baixo teor de ácidos graxos livres e umidade, evitando a formação de produtos saponificados que reduzem a eficiência de conversão (BENDER, 1999). Em seguida, a matéria-prima previamente preparada segue para a etapa de transesterificação. O produto dessa reação possui duas fases, na qual a fase pesada é composta pelo glicerol e a fase leve é o biodiesel. Ambos estão contaminados com excessos de álcool, água e catalisador. Essa mistura bifásica é separada por decantação e/ou por centrifugação e o biodiesel segue para o processo de remoção do álcool e purificação. Da mesma forma, o glicerol 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.

3.3 O GLICEROL

Glicerol é o nome comum do composto 1,2,3-propanotriol, também denominado glicerina. Em 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, e ao fato de ser inócuo, o glicerol possui inúmeras aplicações industriais. A Figura 3.2 apresenta os principais setores industriais que utilizam o glicerol como matéria-prima.

Figura 3.2 - Principais setores industriais de utilização da glicerina.



Fonte: Adaptado de PAGLIARO et al. (2007).

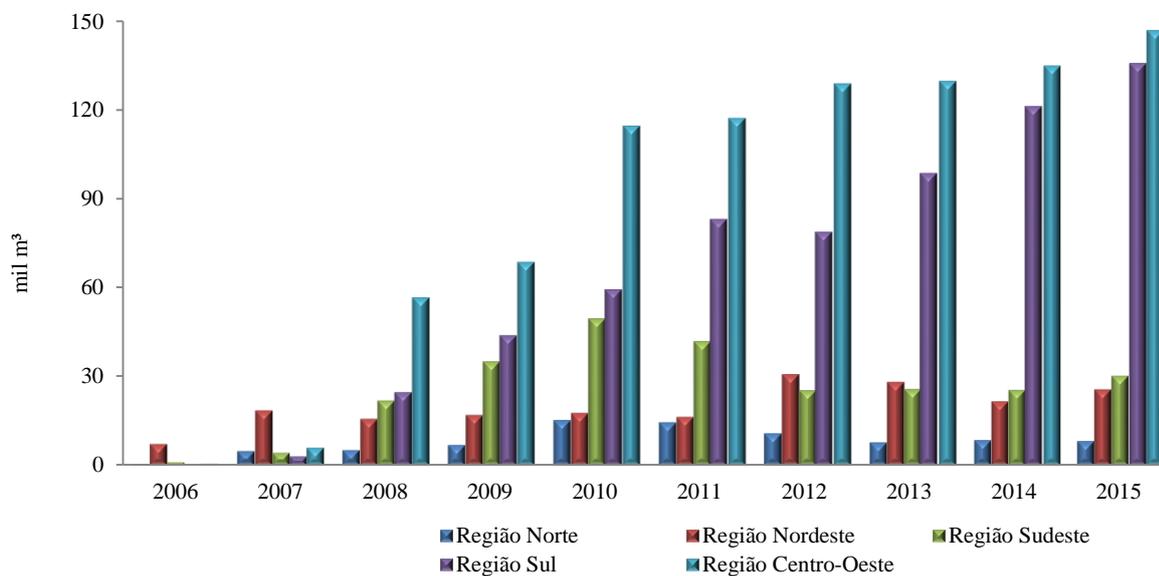
O glicerol resultante do processo de transesterificação apresenta impurezas como água, sais, ésteres, álcool e óleo residual (OOI et al., 2004), entretanto para a maioria das aplicações industriais expostas, é necessário que a glicerina apresente elevado teor de pureza (PACHUARI, 2006). Porém, existe um grande interesse na purificação do glicerol, todavia, tratamentos de purificação possuem custos elevados para pequenos e médios produtores nacionais de biodiesel. Devido a este fato, uma maior quantidade de efluentes contendo glicerol poderá ser descartada no meio ambiente sem nenhum tratamento, aumentando consequentemente os problemas e riscos ambientais (RIVALDI et al., 2007).

Considerando o aumento da produção de combustíveis renováveis em todo o mundo, como a demanda na produção de biodiesel, é esperado um aumento progressivo na geração de

glicerol. Segundo Dillis et al. (1980), este glicerol pode ser usado como uma fonte de carbono altamente reduzida e assimilável por microrganismos, agregando valor à cadeia produtiva da indústria de biodiesel, contribuindo para a sua competitividade. Logo, uma das aplicações promissoras para o uso de glicerol é a sua bioconversão em compostos de elevado valor agregado através de fermentação microbiológica (DHARMADI et al., 2006).

Como principal subproduto gerado nas indústrias de biodiesel, o glicerol tem ganhado certa visibilidade decorrente da quantidade produzida. No Brasil, segundo dados da ANP (2016), a produção de glicerina coproduto do biodiesel foi 11,23% maior que no ano anterior. Em 2015, a produção de biodiesel atingiu um total de 3 937 269 m³ e a produção de glicerol foi de 346 839 m³, representando cerca de 10% em volume do total de biodiesel gerado. A Figura 3.3 apresenta a evolução na geração de glicerina, segundo as regiões brasileiras. Nota-se que a região centro-oeste é a maior produtora de glicerina bruta desde 2008.

Figura 3.3 - Glicerina gerada na produção de biodiesel (B100), segundo grandes regiões – 2006 - 2015.



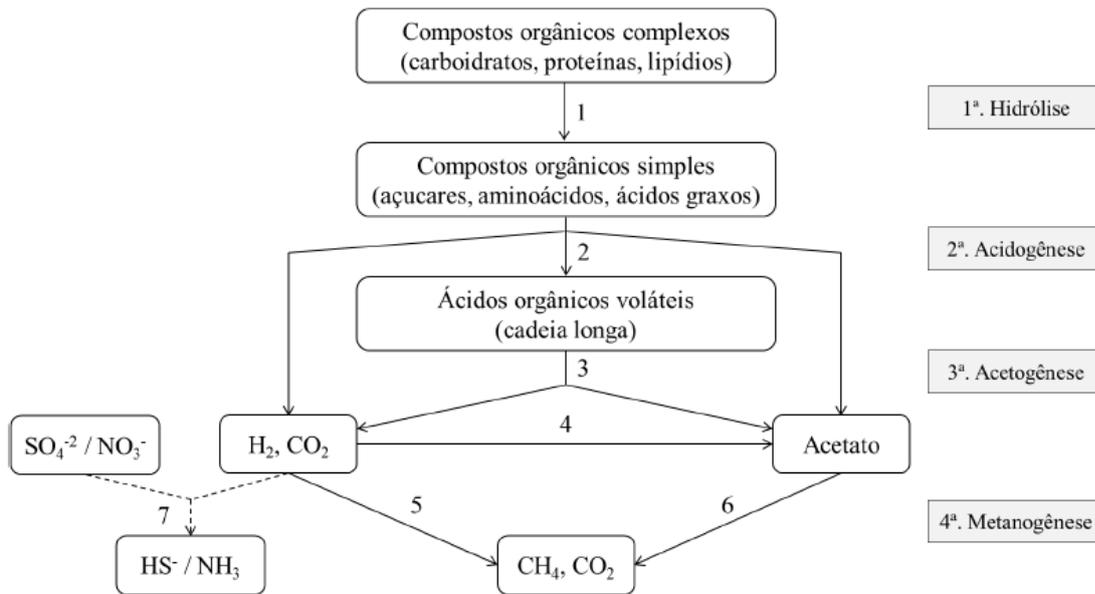
Fonte: ANP/SPD (2016).

3.4 DIGESTÃO ANAERÓBIA

A digestão anaeróbia é um processo biológico natural que ocorre na ausência de oxigênio molecular, em que populações de microrganismos e *archaeas* interagem para promover a fermentação estável e autorregulada da matéria orgânica, da qual resultam o metano e o gás carbônico como principais produtos gasosos. O metano, além de ser um gás combustível, é pouco solúvel em água e, portanto, facilmente liberado do meio líquido, o que torna possível a remoção efetiva da matéria orgânica por meio de um sistema anaeróbio e a geração de energia elétrica e calorífica através da queima do metano (McCARTY, 1964).

A Figura 3.4 apresenta um esquema da digestão anaeróbia, no qual, as quatro principais etapas podem ser distinguidas. A primeira fase no processo de degradação anaeróbia consiste na hidrólise de materiais particulados complexos (polímeros) a materiais dissolvidos mais simples, através da ação de coenzimas excretadas pelos microrganismos fermentativos hidrolíticos. Na segunda fase, os produtos solúveis oriundos da primeira fase (hidrólise) são convertidos a hidrogênio, bicarbonato, ácido acético, propiônico, butírico, etanol e ácido láctico, além de novas células por microrganismos fermentativos acidogênicos. Na terceira fase, os microrganismos sintróficos fermentativos acetogênicos são responsáveis pela oxidação dos produtos da acidogênese, gerando acetato, hidrogênio e dióxido de carbono. Por fim, na quarta etapa, os microrganismos metanogênicos (*archaeas* metanogênicas) convertem principalmente o acetato e hidrogênio a metano e dióxido de carbono por duas vias metabólicas principais: hidrogenotrófica e acetoclástica (McCARTY, 1971; LETTINGA et al., 1996).

Figura 3.4 - Representação esquemática das principais etapas da digestão anaeróbia (1) bactérias hidrolíticas (2) bactérias acidogênicas fermentativas, (3) bactérias acetogênicas produtoras de hidrogênio, (4) bactérias acetogênicas consumidoras de hidrogênio, (5) *archaeas* metanogênicas hidrogenotróficas, (6) *archaeas* metanogênicas acetoclásticas e (7) bactérias redutoras de sulfato e bactérias redutoras de nitrato.



Fonte: Adaptado de MOSEY (1982).

Os microrganismos metanogênicos são os mais sensíveis e facilmente inibidos do consórcio. Dentre eles, os acetoclásticos são os mais importantes, uma vez que a remoção de DQO da fase líquida depende da conversão de acetato, composto no qual são canalizados cerca de 70% dos elétrons do substrato original (MCCARTY, 1971 apud AQUINO e CHERNICHARO, 2005). Já os hidrogenotróficos são de rápido crescimento, com tempo de geração mínimo de 6 horas (MOSEY, 1983 apud AQUINO e CHERNICHARO, 2005) e, além de contribuir para cerca de 30% do metano formado, a presença deles ajuda a manter baixas concentrações de hidrogênio dissolvido nos reatores anaeróbios, favorecendo a degradação de propionato e butirato (MOSEY, 1983; HARPER e POHLAND, 1986 apud AQUINO e CHERNICHARO, 2005).

A produção de metano a partir da digestão anaeróbia de efluentes e resíduos é processo amplamente aplicado. Neste processo, o hidrogênio é um produto intermediário que, entretanto, não permanece disponível devido à sua rápida utilização e conversão em metano pelos microrganismos metanogênicos. Dessa forma, quando o objetivo é produzir hidrogênio,

deve-se garantir que o processo seja interrompido durante a etapa de fermentação acidogênica, visto que nas etapas posteriores ocorre a formação de metano.

3.5 FERMENTAÇÃO DO GLICEROL: ROTAS METABÓLICAS

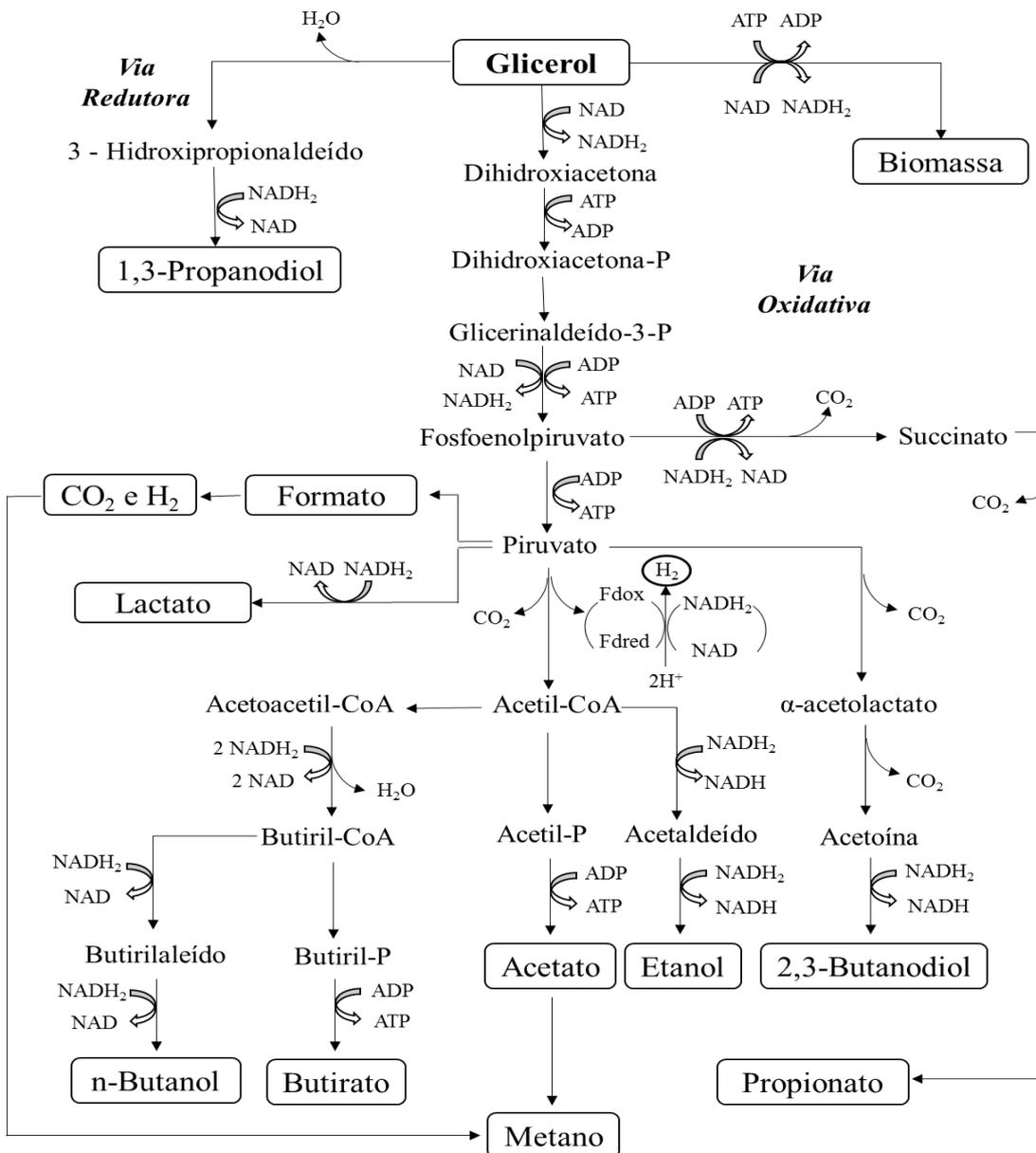
Inúmeros são os microrganismos capazes de crescer em meio contendo glicerol e utilizá-lo como fonte de carbono e energia. A conversão microbiana de glicerol por processos biotecnológicos em produtos de maior valor agregado como biomassa e biomoléculas é uma alternativa relevante para a maior valorização da produção de biodiesel (ITO et al., 2005). Assim, a literatura descreve alguns desses microrganismos, que convertem glicerol nos biocombustíveis hidrogênio, como *Klebsiella* sp. (JOHNSON et al., 1987; HOMANN et al., 1990; TONG et al., 1991; CAMERON et al., 1998; CHENG et al., 2007; CHOOKAEW et al., 2014), *Clostridium* sp. (FORSBERG, 1987; ABBAD-ANDALOUSSI et al., 1998; PAPANIKOLAOU et al., 2002; KIVISTO et al., 2011; MANGAYIL et al., 2012), *Enterobacter aerogenes* (ITO et al., 2005) e *Lactobacillus reuteri* (LÜTHI-PENG et al., 2002); e metano, como *Methanosaeta* sp., *Methanosarcina* sp. e *Methanobacterium* sp. (YANG et al., 2008; LOVATO et al., 2012; PHUKINGNGAMET et al., 2011; DINH, et al., 2014).

O glicerol entra na célula por difusão, sem a dependência de microrganismos hidrolíticos, os quais possuem papel importante na etapa inicial da degradação de outros compostos presentes no glicerol bruto, tais como óleos e graxas. Esses microrganismos hidrolíticos fermentativos são capazes de hidrolisar lipídeos e formar glicerol e ácidos graxos de cadeia longa pela ação de lipases extracelulares (MENDES et al., 2005).

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 co-enzima *glicerol desidratase*, produzindo 3-hidroxi-propionaldeído, que por sua vez é reduzido a 1,3-propanodiol (1,3-PDO), mediado pela enzima *1,3-propanodiol desidrogenase*. A rota oxidativa consiste em desidrogenar o glicerol, através 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-butanediol, lactato, butirato, etanol, formato, acetato, hidrogênio e dióxido de carbono (SILVA et al., 2009; ADHIKARI et al., 2009; PAPANIKOLAOUA et al., 2008; REHMAN et al., 2008; YAZDANI & 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 de glicerol até compostos mais simples está apresentado na Figura 3.5.

Figura 3.5 - Rotas metabólicas de fermentação de glicerol até compostos mais simples.



Fonte: adaptado de BIEBL et al. (1999).

O 1,3-PDO vem se destacando como um importante intermediário para a síntese de compostos cíclicos e monômeros para poliésteres, poliuretanos e polipropileno tereftalato. O campo de aplicação desse composto é considerado amplamente abrangente, diferentes setores comerciais, desde a produção de polímeros, tintas, resinas de poliéster, lubrificantes, anti-gelante, até a produção de cosméticos (GONZALEZ-PAJUELO et al., 2006; XIU et al., 2007).

Notoriamente, muitas espécies apresentam a capacidade de fermentar o glicerol produzindo 1,3-PDO, entre elas podem ser citadas *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium butyricum*, *Enterobacter agglomerans*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri* e *Bacillus welchii* (BARBIRATO et al., 1997; GONZALEZ-PAJUELO et al., 2006; XIU et al., 2007).

De acordo com Biebl et al. (1999), durante a fermentação do glicerol, as culturas que apresentam maior rendimento de 1,3-PDO são as que produzem, além de CO₂ e H₂, somente ácido acético como subproduto, fornecendo 64% de 1,3-PDO do glicerol consumido.

De maneira semelhante às outras fermentações, a formação dos produtos na fermentação a 1,3-PDO 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, devido ao aumento da inibição pelos subprodutos, a formação de etanol cessa e o rendimento de 1,3-PDO se aproxima do seu valor máximo (BIEBL et al.; 1999).

González-Pajuelo et al. (2005) avaliaram os efeitos da taxa de diluição (D) e da concentração de alimentação de substrato na fermentação contínua de glicerina pura a 1,3-PDO, por meio de *Clostridium butyricum* VPI 3266, em um CSTR, no TDH de 3 h. A taxa de diluição variou de 0,05 a 0,50 h⁻¹ e a concentração de glicerol em 30,0 – 70,0 g L⁻¹. A temperatura foi fixada em 30 °C e o pH mantido constante em 6,5. Os autores observaram que com o aumento da taxa de diluição, para a concentração fixa de 30,0 g L⁻¹, 1,3-PDO foi o principal produto final obtido, com valor máximo de 15 g L⁻¹. Para todos os valores de D, a conversão de glicerol em 1,3-PDO foi entre 0,60 e 0,68 mol 1,3-PDO mol⁻¹ glicerol_{consumido}. Os autores também verificaram que um aumento na taxa de diluição produz elevação na produtividade volumétrica de 1,3-PDO, quando a concentração de alimentação de glicerol permaneceu constante em 30, 60 ou 70 g L⁻¹. O maior valor reportado de produtividade (10,3 g L⁻¹ h⁻¹) foi atingido na taxa de diluição de 0,30 h⁻¹ e 60 g L⁻¹ de glicerol, obtendo o

rendimento de 1,3-PDO igual a $0,65 \text{ mol } 1,3\text{-PDO mol}^{-1} \text{ glicerol}_{\text{consumido}}$. Nessa condição a concentração de 1,3-PDO foi de $30,9 \text{ g L}^{-1}$.

Cheng et al. (2007) foram os pioneiros em reportar a produção de 1,3-PDO, utilizando *K. pneumoniae*, em escala piloto. Os autores utilizaram um fermentador de três estágios e volumes de 5 L, 50 L e 5000 L para a produção de 1,3-PDO em batelada alimentada. A temperatura foi mantida em $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e o pH ajustado em 6,8. Os melhores resultados para esse sistema foram alcançados para o fermentador de 5000 L e mantendo a concentração de glicerol no intervalo de $15,0 - 40,0 \text{ g L}^{-1}$, onde foi reportada uma produção de $58,8 \text{ g L}^{-1}$ de 1,3-PDO, com um rendimento equivalente a $0,53 \text{ mol } 1,3\text{-PDO mol}^{-1} \text{ glicerol}_{\text{consumido}}$ e produtividade de $0,92 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

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

Gallardo et al. (2014) produziram 1,3-PDO a partir de glicerol residual, em três reatores granulares de leito expandido (EGSB). O reator R1 foi inoculado com lodo granular, R2 com lodo granular tratado termicamente e R3 com lodo granular fragmentado. Avaliou-se a aplicação de diferentes TDH, variando entre 24 – 3 h. Os reatores foram operados a $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$, com concentração de glicerol afluyente constante em $25,0 \text{ g L}^{-1}$ e pH afluyente ajustado em 6,8 para proporcionar pH efluyente na faixa de 5,0 – 6,0 (TDH de 24 a 12 h) e 4,0 – 5,0 (TDH de 6 a 3 h). Como resultados, observou-se a conversão de glicerol em 1,3-PDO em todos os reatores, no geral, sem influência do pré-tratamento aplicado ao inóculo no rendimento de 1,3-PDO. Os máximos rendimento ($0,52 \text{ mol } 1,3\text{-PDO mol}^{-1} \text{ glicerol}_{\text{consumido}}$) e produtividade ($56,9 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) foram atingidos no R1 no TDH de 12 e 3 h, respectivamente.

Quando o processo anaeróbico visa a geração de energia, devem estar presentes microrganismos formadores de formato, 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.

Contudo, nem todas as reações de acetogênese ocorrem espontaneamente sob condições ambientais padrões (pH neutro, 25°C e 1 atm), como é o caso do propionato, butirato e etanol, sendo necessário que haja um mecanismo de remoção de H₂ 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 de H₂ do meio é o seu consumo pelas *archaeas* metanogênicas hidrogenotróficas. Quando este consumo é suficiente para manter uma pressão de H₂ no meio entre 10⁻⁴ e 10⁻⁶ atm, a degradação de propionato, butirato ou etanol se torna exergônica, liberando energia para os microrganismos acetogênicos, tornando essas reações termodinamicamente favoráveis (LETTINGA et al., 1999). Posteriormente, os subprodutos da acetogênese são assimilados pelas *archaeas* metanogênicas acetoclásticas e convertidos a CH₄ e CO₂. A Tabela 3.2 mostra a estequiometria e variação da energia livre de Gibbs das principais reações que ocorrem na digestão anaeróbia.

Tabela 3.2 – Estequiometria e variação da energia livre de Gibbs (ΔG^0) das reações de acidogênese, acetogênese e metanogênese.

Acidogênese	Reação	ΔG^0 (kJ mol⁻¹)
Glicose → Acetato	$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COO^- + 2CO_2 + 2H^+ + 4H_2$	-206
Glicose → Propionato	$C_6H_{12}O_6 + 2H_2 \rightarrow 2CH_3CH_2COO^- + 2H_2O + 2H^+$	-358
Glicose → Butirato	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CH_2CH_2COO^- + 2CO_2 + H^+ + 2H_2$	-255
Acetogênese	Reação	ΔG^0 (kJ mol⁻¹)
Propionato → Acetato	$CH_3CH_2COO^- + 3H_2O \rightarrow CH_3COO^- + H^+ + HCO_3^- + 3H_2O$	+76,1
Butirato → Acetato	$CH_3CH_2CH_2COO^- + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COO^- + H^+ + 2H_2$	+48,1
Etanol → Acetato	$CH_3CH_2OH + H_2O \rightarrow CH_3COO^- + H^+ + 2H_2$	+9,6
Lactato → Acetato	$CH_3CHOHCOO^- + 2H_2O \rightarrow CH_3COO^- + HCO_3^- + H^+ + 2H_2$	-4,2
Bicarbonato → Acetato	$2HCO_3^- + 4H_2 + H^+ \rightarrow CH_3COO^- + 4H_2O$	-70,3
Metanogênese	Reação	ΔG^0 (kJ mol⁻¹)
Acetato → Metano	$CH_3COO^- + H_2O \rightarrow CH_4 + CO_2 + 2HCO_3^-$	-31,0
Hidrogênio e Dióxido de Carbono → Metano	$4H_2 + HCO_3^- + H^+ \rightarrow CH_4 + 3H_2O$	-135,6
Formiato → Metano	$4HCOO^- + H_2O + H^+ \rightarrow CH_4 + HCO_3^-$	-32,6

Fonte: Adaptado de HARPER e POHLAND (1986).

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), o acúmulo de intermediários e a presença de compostos considerados tóxicos podem inibir a digestão anaeróbia de glicerol residual. Os principais compostos tóxicos encontrados neste resíduo são 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.

3.6 RENDIMENTO TEÓRICO DE HIDROGÊNIO E METANO NA FERMENTAÇÃO DO GLICEROL

O processo fermentativo aplicado à oxidação do glicerol como fonte de carbono para a obtenção de hidrogênio e metano é uma opção interessante tanto pela valorização do despejo como pelo rendimento teórico dos subprodutos gerados.

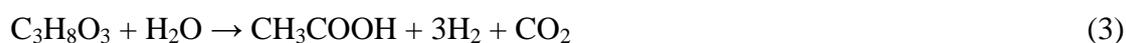
De acordo com Wang e Yang (2013), 1 mol de glicerol produz 1 mol de ácido propiônico, e nenhum de ácido acético, apresentando rendimento teórico de ácido propiônico de 0,80 g HPr g⁻¹ glicerol, conforme equação:

(a) Glicerol (C₃H₈O₃) → ácido propiônico (C₃H₆O₂)



A partir da Figura 3.5, as reações que levam a formação de diferentes metabólitos na fermentação do glicerol, por meio de *Klebsiella pneumoniae* e *Clostridium butyricum*, são descritas conforme equações a seguir, as quais podem produzir concomitantemente hidrogênio ou consumi-lo (ZENG, 1995 e ZENG et al., 1996):

(b) Glicerol (C₃H₈O₃) → ácido acético (CH₃COOH) e ácido fórmico (HCOOH)



(c) Glicerol ($C_3H_8O_3$) \rightarrow ácido butírico ($C_4H_8O_2$)



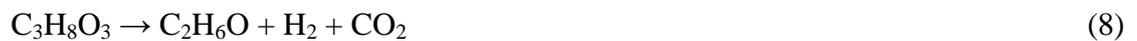
(d) Glicerol ($C_3H_8O_3$) \rightarrow ácido láctico ($C_3H_6O_3$)



(e) Glicerol ($C_3H_8O_3$) \rightarrow ácido succínico ($C_4H_6O_4$)



(f) Glicerol ($C_3H_8O_3$) \rightarrow etanol (C_2H_6O) e ácido fórmico (HCOOH)



(g) Glicerol ($C_3H_8O_3$) \rightarrow 2,3-butanodiol ($C_4H_{10}O_2$)



(h) Glicerol ($C_3H_8O_3$) \rightarrow 1,3-propanodiol ($C_3H_8O_2$)



A equação que leva a formação de butanol, a partir da fermentação de glicerol, pode ser descrita como (BIEBL, 2001; SARMA et al., 2012):

(i) Glicerol ($C_3H_8O_3$) \rightarrow butanol ($C_4H_{10}O$)



Teoricamente o rendimento máximo de $3,0 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ glicerol}_{\text{consumido}}$ pode ser atingido quando acetato é o produto final da fermentação. No entanto, em estudos anteriores, observou-se que a conversão de glicerol puro ou bruto (BIEBL et al., 1998; ITO et al., 2005; TEMUDO et al., 2008) utilizando-se microrganismos mesofílicos conduz a um rendimento máximo de H_2 de cerca de $1,0 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ glicerol}_{\text{consumido}}$ concomitante com a produção de $\sim 1,0 \text{ mol Etanol mol}^{-1} \text{ glicerol}_{\text{consumido}}$. Assim, é frequente na utilização de microrganismos

mesofílicos a geração de produtos finais reduzidos e, conseqüentemente, ocorrer menor produção de H₂ (MATHEWS et al., 2009).

Quando a digestão anaeróbia é completa, a relação estequiométrica entre o biogás produzido na fermentação de metano por glicerol consumido anaerobiamente pode ser calculada pela equação empírica desenvolvida por Buswell & Muellepi (1952):

(i) Glicerol (C₃H₈O₃) → metano (CH₄)



Segundo Viana (2011) considerando-se a estequiometria da reação expressa pela equação (13), o potencial teórico de produção de metano é de 0,426 m³ CH₄ kg⁻¹ de glicerol degradado, sob condições normais de temperatura e pressão (CNTP). No entanto, na prática, as condições ambientais, operacionais e a presença de compostos tóxicos podem interferir neste resultado.

Além disso, o processo de conversão de intermediários químicos a metano pode ocorrer em tal velocidade que não seja capaz de consumir completamente o ácido acético produzido e transformá-lo em metano, possivelmente devido a menor velocidade de crescimento das *archaeas* metanogênicas acetoclásticas, ocorrendo assim a produção de metano e a verificação de ácido acético no efluente, o que torna o rendimento de metano menor que o descrito na equação (13). De acordo com Zhang et al. (2015) a equação pode ser descrita como:

(j) Glicerol (C₃H₈O₃) → ácido acético (CH₃COOH) + metano (CH₄)



3.7 PRODUÇÃO DE BIOENERGIA A PARTIR DE GLICEROL COMO FONTE DE CARBONO

3.7.1 Produção biológica de hidrogênio a partir de glicerol

Atualmente, muitos estudos tem investigado a produção biológica de hidrogênio a partir de glicerol como fonte de carbono, sendo a maioria realizada em condições de

temperatura mesofílica. Tais estudos, em sua grande maioria, foram realizados em batelada (ensaios descontínuos), devido à facilidade de operação e controle dos mesmos.

Ito et al. (2005) avaliaram o efeito da concentração de H₂, EtOH e outros metabolitos, utilizando *Enterobacter aerogenes* HU-101. A fermentação foi realizada em batelada (ensaios descontínuos) em pH inicial de 6,8 e temperatura mantida em 37 °C. Os autores observaram que ao aumentar a concentração de glicerol bruto de 1,7 g L⁻¹ para 25,0 g L⁻¹, o rendimento de H₂ e EtOH decrescia de 1,12 para 0,71 mol H₂ mol⁻¹ glicerol e 0,96 para 0,56 mol EtOH mol⁻¹ glicerol, respectivamente. O mesmo fenômeno aconteceu nos experimentos com glicerol puro, os rendimentos de H₂ e EtOH diminuíram de 1,05 para 0,82 mol H₂ mol⁻¹ glicerol e de 1,00 para 0,80 mol EtOH mol⁻¹ glicerol, ao aumentar a concentração do substrato de 5,0 para 25,0 g L⁻¹, respectivamente. Em relação ao rendimento de 1,3-PDO, observou-se que para a concentração de 10,0 g L⁻¹, utilizando glicerol puro o rendimento foi de 0,16 mol 1,3-PDO mol⁻¹ glicerol. Quando foi utilizado o glicerol bruto o rendimento foi de 0,12 mol 1,3-PDO mol⁻¹ glicerol. Nos experimentos em reator contínuo de leito fixo, com células auto imobilizadas, temperatura fixa de 37 °C e concentração de glicerol de 10,13 g L⁻¹, os autores alcançaram utilizando glicerol puro, produtividade volumétrica de H₂ de 80 mmol L⁻¹ h⁻¹ e utilizando glicerol bruto, 30 mmol L⁻¹ h⁻¹. Já nos experimentos em reator contínuo de leito fixo, com material suporte (Nagao Porcell), temperatura fixa de 37°C e concentração de glicerol de 10,0 g L⁻¹, os autores alcançaram a máxima produtividade volumétrica de H₂ de 63 mmol L⁻¹ h⁻¹ utilizando glicerol bruto, com um rendimento de etanol de 0,85 mol EtOH mol⁻¹ glicerol.

Selembro et al. (2009) produziram hidrogênio a partir de glicerol puro e bruto, em concentração de 3,0 g L⁻¹, sob condições mesofílicas (30 °C). O processo foi realizado em batelada (ensaios descontínuos) utilizando cultura mista proveniente de solo de trigo, a qual foi tratada termicamente, com o intuito de inibir a geração de metano, nos quatro inóculos utilizados no experimento. Os rendimentos na produção de hidrogênio obtidos foram de 0,28 mol H₂ mol⁻¹ glicerol_{consumido} para o glicerol puro e 0,31 mol H₂ mol⁻¹ glicerol_{consumido} para o glicerol bruto. Nesse estudo também foi quantificada a produção de 1,3-propanodiol, obtendo-se um rendimento de 0,69 mol 1,3-PDO mol⁻¹ glicerol_{consumido} a partir do glicerol puro como substrato e 0,59 mol 1,3-PDO mol⁻¹ glicerol_{consumido} com o glicerol bruto como substrato. Tais resultados demonstraram que a produção de biodiesel pode ser combinada com a produção de hidrogênio e 1,3-propanodiol para a máxima utilização dos recursos e minimização dos resíduos gerados.

Ngo et al. (2011) investigaram a produção de hidrogênio pelo microrganismo hipertermofílico *Thermotoga neapolitana* DSM 4359, utilizando cultivo em batelada (ensaios descontínuos) com meio de cultura contendo glicerol puro e bruto como substratos em concentração de $5,0 \text{ g L}^{-1}$ sob condições hipertermofílicas ($75 \text{ }^\circ\text{C}$) e pH de 7,5. O glicerol bruto passou por um pré-tratamento que consistiu em remover metanol e etanol. O rendimento de H_2 após 49 horas de cultivo de *T. neapolitana* foi de 1,02 e $1,28 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ glicerol}_{\text{consumido}}$ para glicerol puro e glicerol bruto, respectivamente. Após 56 horas de cultivo, a produção de H_2 por glicerol bruto foi de $1,97 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ glicerol}_{\text{consumido}}$, sendo quase 1,55 vez maior que o glicerol puro ($1,27 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ glicerol}_{\text{consumido}}$), de modo que o pré-tratamento do substrato desempenhou um papel fundamental na conversão de glicerol bruto em hidrogênio por *T. neapolitana*. O controle do pH e introdução de gás nitrogênio no sistema foram implementado para otimizar a taxa de crescimento microbiano e aumentar a produção de hidrogênio, que variou de 1,24 para $1,98 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ glicerol}_{\text{consumido}}$. Observou-se o rendimento máximo de H_2 em meio contendo $0,05 \text{ M}$ de HEPES (ácido N-2-hydroxyethylpiperazine-N0-2-ethanesulphonic), o qual aumentou para $2,73 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ glicerol}_{\text{consumido}}$.

Mangayil et al. (2012) realizaram ensaios descontínuos a fim de investigar o efeito de impurezas presentes no glicerol bruto em comparação ao glicerol puro na produção de hidrogênio. O inóculo utilizado foi proveniente de uma planta de tratamento de águas residuárias. Os experimentos para investigar o efeito de diferentes concentrações de glicerol bruto ($0,5 - 5,0 \text{ g L}^{-1}$), foram realizados sob valores de pH e temperatura já otimizados em 6,5 e $40 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente. O glicerol bruto utilizado possuía pureza de 45 %. Foi observado que o rendimento de H_2 aumentou com a concentração de glicerol bruto até $1,0 \text{ g L}^{-1}$. Na condição ótima ($1,0 \text{ g L}^{-1}$), o rendimento de H_2 foi de $1,1 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ glicerol}_{\text{consumido}}$. Os autores também verificaram que a produção de hidrogênio não foi afetada pelas impurezas, sendo os valores do volume acumulado de hidrogênio produzido de 20,9 mL para o glicerol bruto e 14,8 mL para o glicerol puro. Uma possível justificativa para o aumento na produção acumulativa de hidrogênio para o glicerol bruto, exposta pelos autores, foi à presença de ácidos graxos livres e compostos orgânicos não pertencentes ao glicerol neste substrato. Acetato, butirato e etanol foram os metabólitos observados e o consórcio microbiano predominante foi *Clostridium* sp.

Maru et al., (2012) utilizaram glicerol bruto como substrato para a produção de hidrogênio utilizando microrganismos hipertermofílicos (*Thermotoga marítima* DSM 3109 e *Thermotoga neapolitana* DSM 4359). Os cultivos em batelada (ensaios descontínuos) foram

realizados à temperatura constante de 80 °C. Ambas as espécies metabolizaram o glicerol bruto principalmente em acetato e hidrogênio. Em concentrações de glicerol bruto de 2,5 g L⁻¹, o hidrogênio foi produzido com um rendimento de 2,75 e 2,65 mol H₂ mol⁻¹ glicerol_{consumido} por *T. marítima* e *T. neapolitana*, respectivamente. Além disso, o efeito do pH inicial (5,0 – 8,5) e diferentes concentrações de extrato de levedura (0,5 – 4,0 g L⁻¹) sobre a fermentação de glicerol por *T. neapolitana* foram investigados. O pH inicial em 7 foi ótimo para produção de hidrogênio por *T. neapolitana*. A concentração mais baixa de extrato de levedura resultou em produção de H₂ inferior, no entanto o aumento da concentração de 2,0 a 4,0 g L⁻¹ não afetou a produção de H₂. Entre os subprodutos da fermentação, 90% corresponderam a ácido acético, justificando assim os valores de rendimentos de H₂ próximos do teórico (3,0 mol H₂ mol⁻¹ glicerol_{consumido}).

As concentrações de glicerol bruto e nutrientes demonstraram alta eficiência na produção biológica de hidrogênio realizada por Sittijunda et al. (2012) a partir de cultura mista anaeróbia termofílica (55 °C), proveniente de sedimento de fonte termal em ensaios descontínuos. Para tanto, utilizou-se a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) e o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). A composição ótima do meio foi de 20,33 g L⁻¹ de glicerol bruto, 0,16 g L⁻¹ de uréia, 3,97 g L⁻¹ de Na₂HPO₄ e 0,20 mL L⁻¹ de meio nutricional. Nessas condições, foram obtidos rendimentos de H₂ e etanol de 0,30 mol H₂ mol⁻¹ glicerol_{consumido} e 0,24 mols EtOH mol⁻¹ glicerol_{consumido}, respectivamente. A produtividade volumétrica máxima de H₂ foi de 1502,84 mL H₂ L⁻¹. Ao final do experimento de validação, os autores verificaram que os principais metabólitos produzidos foram 1,3-PDO (3,46 g L⁻¹) e EtOH (3,01 g L⁻¹). Ácido acético, butírico, fórmico, láctico e propiônico foram produzidos em menores quantidades. Verificou-se também que os microrganismos produtores de hidrogênio presentes na fermentação pertencem a *Thermoanaerobacterium* sp.

Maru et al. (2013) avaliaram a produção de hidrogênio a partir de glicerol bruto através do microrganismo hipertermofílico *Thermotoga marítima* DSM 4359 em batelada (ensaios descontínuos) sob condições hipertermofílicas (80 °C). *T. marítima* converteu glicerol principalmente a acetato, CO₂ e H₂, com rendimentos máximos de hidrogênio de 2,84 mol H₂ mol⁻¹ glicerol_{consumido} e 0,94 mol HAc mol⁻¹ glicerol_{consumido} para H₂ e acetato, respectivamente. Para o cultivo em batelada a produção ótima de H₂ foi encontrada utilizando um pH inicial entre 7 – 7,5 e uma concentração de extrato de levedura de 2,0 g L⁻¹. Nesse trabalho também foi observado que a baixa diversidade em produtos finais de fermentação

favoreceu a elevados rendimentos de H_2 , que são superiores em comparação com aqueles normalmente observados para microrganismos mesofílicos.

Rodrigues et al. (2016) avaliaram a produção de hidrogênio a partir de glicerol bruto ($10,0 \text{ g L}^{-1}$), em ensaios descontínuos sob condições mesofílicas ($37 \text{ }^\circ\text{C}$). O glicerol bruto foi submetido a um tratamento por ajuste do pH com o intuito de remoção de impurezas, sendo o pH inicial do meio mantido em 7,0. Os inóculos testados foram: (I) lodo granular de reator UASB termofílico utilizado no tratamento da vinhaça e (II) lodo granular de reator UASB utilizado no tratamento de efluente municipal, ambos submetidos a um pré-tratamento térmico e utilizados nos ensaios em batelada (1) e (2), respectivamente. Os consumos de glicerol bruto não foram completos durante os dois ensaios. Constatou-se 26,9% e 31,7% de conversão durante 69,1 h e 68,7 h de operação aos ensaios (1) e (2), respectivamente. Os autores concluíram que a presença de impurezas neste resíduo provavelmente causou inibição ao crescimento microbiano, interferindo nas vias metabólicas de ambos os inóculos (I e II), ocasionando o baixo consumo de glicerol bruto. A produção acumulada de hidrogênio para os ensaios (1) e (2) foram, 28,49 e 19,14 $\text{mmol H}_2 \text{ L}^{-1}$, respectivamente. Os rendimentos de H_2 obtidos foram de 2,2 e 1,1 $\text{mol H}_2 \text{ mol}^{-1}$ glicerol, para os ensaios (1) e (2), respectivamente. Os principais metabólitos produzidos durante a operação foram etanol, ácido acético e butírico.

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. A abordagem usual para a eliminação da inibição do produto é a remoção do produto inibitório do caldo de fermentação por qualquer processo contínuo. Culturas contínuas oferecem uma vantagem distinta de alta produtividade, mas, geralmente, concentrações não muito elevadas de produtos são obtidas, principalmente, devido às elevadas taxas de alimentação e de retirada, o que torna o processamento posterior dificultado (KAUR et al., 2012).

Lo et al. (2013) avaliaram a viabilidade da utilização de glicerol bruto e puro para a produção de hidrogênio utilizando cepas isoladas de microrganismos produtores de hidrogênio (*Clostridium butyricum*, *Clostridium pasteurianum*, e *Klebsiella* sp.) em reator de tanque agitado (CSTR). Entre as cepas analisadas, *C. pasteurianum* exibiu o melhor desempenho produzindo hidrogênio sob as condições ótimas de temperatura mesofílica ($35 \text{ }^\circ\text{C}$), pH inicial 7 e concentração de glicerol em 10 g L^{-1} . Ao utilizar o glicerol puro como fonte de carbono para a fermentação de hidrogênio, a produtividade volumétrica média e

rendimento de H_2 foram $103,1 \text{ mL h}^{-1} \text{ L}^{-1}$ e $0,50 \text{ mol } H_2 \text{ mol}^{-1}$ glicerol, respectivamente. Em contraste, quando se utilizou glicerol bruto como fonte de carbono, a produtividade volumétrica e rendimento de H_2 foram de $166,0 \text{ mL h}^{-1} \text{ L}^{-1}$ e $0,77 \text{ mol } H_2 \text{ mol}^{-1}$ glicerol, respectivamente. Em tais condições, o percentual de H_2 obtido foi de 75%. O elevado percentual de H_2 atingido, pode ser justificado pelas condições operacionais adotadas, já que, para os autores, estas foram condições ótimas para a produção de hidrogênio.

Reungsang et al. (2013) investigaram a produção de hidrogênio em reator UASB, utilizando glicerol puro e bruto ($25,0 \text{ g L}^{-1}$) como substratos, a partir da variação da taxa de carregamento orgânico (TCO) e pela imobilização de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048. O inóculo utilizado foi lodo granular metanogênico proveniente de um reator UASB tratando águas residuárias de cervejaria, o qual foi submetido ao tratamento térmico para posterior imobilização de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048. A temperatura de operação foi mantida em condições mesofílicas ($37 \text{ }^\circ\text{C}$) e o pH afluente em 5,5. Com o intuito de maximizar a produção de H_2 , a TCO sofreu variação de 25,0, 37,5, 50, 62,5 e $75,0 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, para os testes com glicerol puro. As TCO de operação utilizando glicerol bruto foram estabelecidas em 37,5, 50,0 e $62,5 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Conforme reportado no trabalho, a mudança da TCO levou a uma variação no conteúdo de hidrogênio presente no biogás e na produtividade volumétrica de hidrogênio, pois ambos apresentaram crescimento até a TCO de $50 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Assim, a TCO de $50 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ foi considerada ótima, obtendo-se conteúdo e taxa máxima de produção de hidrogênio de 37,1% e $9 \text{ mmol } H_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (para glicerol puro) e 24,2% e $6,2 \text{ mmol } H_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (para glicerol bruto), além do rendimento máximo na produção de H_2 de $410 \text{ mmol } H_2 \text{ mol}^{-1}$ glicerol (para glicerol puro) e $324 \text{ mmol } H_2 \text{ mol}^{-1}$ glicerol (para glicerol bruto).

Chookaew et al. (2014) investigaram a produção de hidrogênio pela imobilização de *Klebsiella* sp. TR17 em reatores UASB. Tais reatores foram operados sob condições mesofílicas ($40 \text{ }^\circ\text{C}$) e pH inicial igual a 8, com diferentes TDH aplicados (12 – 2 h). O substrato utilizado foi glicerol bruto com 50% de pureza, em diferentes concentrações (10,0 20,0 e $30,0 \text{ g L}^{-1}$). O inóculo utilizado foi lodo granular metanogênico proveniente de um reator UASB, o qual foi submetido ao tratamento térmico para posterior imobilização de *Klebsiella* sp. TR17. Os autores verificaram que o TDH ótimo foi de 4 h, no qual foi atingida a máxima PVH ($242,15 \text{ mmol } H_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) e HY ($44,27 \text{ mmol } H_2 \text{ g}^{-1}$ glicerol_{consumido}), para as concentrações de 30,0 e $10,0 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente. Aumentando-se a concentração de glicerol (10,0 – $30,0 \text{ g L}^{-1}$) no TDH de 4h, a PVH aumentou ($165,21 -$

242,15 mmol H₂ L⁻¹ d⁻¹, respectivamente) e houve decréscimo do HY (44,27 – 29,00 mmol H₂ g⁻¹ glicerol_{consumido}, respectivamente), mas nenhum efeito foi verificado no conteúdo de hidrogênio no biogás (42 – 43%, respectivamente). Nas três concentrações do glicerol adotadas, houve a predominância de 1,3-propanodiol em todos os TDH operados. A máxima concentração de 1,3-PDO foi encontrada no TDH de 12 h, para todas as concentrações de glicerol aplicadas, sendo os valores máximos de 9,0 g L⁻¹ a 20,0 g L⁻¹ de glicerol. De maneira conjunta ácido acético, etanol e 2,3-butanodiol também foram produzidos, em menores concentrações.

Dounavis et al. (2015) utilizaram um reator anaeróbio de coluna ascendente (UFCB), utilizando grânulos cerâmicos cilíndricos, afim de avaliar o efeito da concentração do glicerol bruto, pH afluente e TDH na produção de H₂. O inóculo empregado foi um lodo obtido de um digestor anaeróbio, o qual foi submetido ao tratamento térmico. A temperatura foi mantida em 35 °C e o TDH sofreu variações de 24 – 48 h. A concentração variou em 10,0 – 25,0 g L⁻¹ e o pH afluente em 6 – 7. Os autores verificaram que sob 10,0 g L⁻¹, 36 h, pH igual a 6 e TCO de 8,7 g DQO d⁻¹ L⁻¹ o reator apresentou o maior consumo de glicerol (96,1%). Na condição de 25,0 g L⁻¹, TDH de 24 h, pH igual a 7 e TCO de 29,7 g DQO d⁻¹ L⁻¹ observou-se a máxima produção volumétrica de 4,23 L d⁻¹. Os autores verificaram que a proporção de hidrogênio na fase gasosa foi levemente afetada pelas mudanças operacionais, variando entre 40,2 a 45,2%. De forma contrária, o HY aumentou quando a concentração de glicerol na alimentação passou de 10,0 g L⁻¹ para 20,0 g L⁻¹, e então sofreu redução quando o TDH aumentou de 36 a 48 h.

Desta maneira, a Tabela 3.3 apresenta um resumo da literatura sobre a utilização de glicerol como substrato em diferenciadas configurações de reatores e condições operacionais.

Tabela 3.3 – Resumo da literatura sobre as condições para produção de H₂ a partir de glicerol.

Reator	Inóculo	Temperatura (°C)	Glicerol (g L ⁻¹)	TDH (h)	TCO (kg m ⁻³ d ⁻¹)	HY (mol H ₂ mol ⁻¹ glicerol _{consumido})	Referência
Reatores Mesofílicos							
Batelada			1,7 – 25,0	-	-	1,12	
Leito Fixo	<i>E. aerogenes</i> HU-101	37	10,13	0 – 1 ^a	0 – 243*	-	Ito et al. (2005)
			10,0	0 – 0,67 ^a	0 – 358*	-	
Batelada	Cultura mista	30	3,0	-	-	0,31	Selembro et al. (2009)
Batelada	Cultura mista	37	0,5 – 5,0	-	-	1,10	Mangayil et al. (2012)
CSTR	<i>C. pasteurianum</i>	35	10,0	12	20*	0,77	Lo et al (2013)
UASB	<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	37	25,0	12	30*	0,41	Reungsang et al (2013)
UASB	Cultura mista	40	10,0 – 30,0	12 – 2	20 – 360*	4,08*	Chookaew et al. (2014)
UFCB	Cultura mista	35	10,0 – 25,0	24 – 48	8,7 – 29,7	0,50*	Dounavis et al (2015)
Batelada	Cultura mista	37	10,0	-	-	2,20	Rodrigues et al. (2016)
Reatores Termofílicos							
Batelada	<i>T. neapolitana</i> DSM 4359	75	5,0	-	-	2,73	Ngo et al. (2011)
Batelada	<i>T. marítima</i> DSM 3109 <i>T. neapolitana</i> DSM 4359	80	2,5	-	-	2,75	Maru et al. (2012)
Batelada	Cultura mista	55	20,33	-	-	0,30	Sittijunda et al. (2012)
Batelada	<i>T. marítima</i> DSM 4359	80	2,5	-	-	2,84	Maru et al. (2013)

CSTR: *Continuous Stirred Tank Reactor*; UASB: *Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor*; UFCB: *Anaerobic Up-flow Column Bioreactor*; HY: rendimento de H₂;
^aCalculado como sendo o inverso da taxa de diluição; *Calculado com base em informações apresentadas no artigo ou verificado graficamente. Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

3.7.2 Produção biológica de metano a partir de glicerol

A literatura atual apresenta um número menor de estudos com o objetivo de investigar a produção de metano a partir de glicerol, em comparação aos estudos de produção de hidrogênio utilizando o mesmo substrato, sendo a maioria realizada em temperatura mesofílica.

No estudo realizado por Yang et al. (2008) foi avaliada a eficiência da biodegradação de resíduos sintéticos contendo glicerol, utilizando biorreatores de leito fixo com espuma de poliuretano como meio suporte, operados em modo semi-contínuo, sob condições mesofílicas (35 °C) e termofílicas (55 °C). O TDH foi estabelecido em 14 dias. Os inóculos utilizados foram lodo mesofílico e termofílico, com origem em uma planta de tratamento de águas residuárias. A alimentação com o meio sintético sofreu variação na TCO de 0,25 – 0,70 g L⁻¹ d⁻¹. Em seguida, uma TCO de 1,0 g L⁻¹ d⁻¹ foi aplicada nos reatores termofílicos. O pH manteve-se em torno de 7,5 nos reatores termofílicos. No entanto, sob as mesmas condições operacionais, o pH era inferior a 7,0 nos reatores mesofílicos. Este trabalho demonstrou também que a temperatura exerce efeito sobre a degradação anaeróbia do glicerol, pois em condições termofílicas obtiveram eficiência média de remoção de carbono orgânico de 87%, enquanto que em condições mesofílicas a eficiência foi de 50%. O reator termofílico apresentou a maior produção de metano de 0,45 L CH₄ g⁻¹ DQO_{aplicada} em uma TCO de 0,70 g L⁻¹ d⁻¹, sendo que o rendimento na produção de metano foi reduzido com a elevação da TCO sob condição mesofílica. A clonagem molecular de sequências de genes indicaram que os clones de *archaeas* no reator termofílico foram principalmente *Methanobacterium* sp. e *Methanosarcina* sp.

Selma et al. (2010) avaliaram o efeito da concentração de matéria orgânica e do tempo de ciclo em reator ASBR (30 °C) operado em batelada e em batelada alimentada. A concentração de glicerol bruto variou entre 0,5 – 3,0 g DQO L⁻¹ correspondendo a TCO de 0,6 – 3,82 g DQO L⁻¹ d⁻¹, respectivamente. O inóculo utilizado foi proveniente de um reator UASB tratando águas residuais provenientes de um matadouro de aves. No ASBR em batelada, a remoção de matéria orgânica foi de 93, 81 e 66% para as concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 g DQO L⁻¹ (0,6, 1,29 e 2,44 g DQO L⁻¹ d⁻¹), respectivamente. Na concentração de 3,0 g DQO L⁻¹ (3,82 g DQO L⁻¹ d⁻¹) a estabilidade operacional não foi alcançada. No ASBR em batelada alimentada, a eficiência de remoção de matéria orgânica foi de 85% a 1,0 g DQO L⁻¹ e tempos de alimentação de 2 e 4 h, além de 80 e 77% a 2,0 g DQO L⁻¹ e tempos de 2 e 4 h, respectivamente. Os autores concluíram que a alimentação em batelada

alimentada pareceu melhorar e suavizar os perfis de matéria orgânica e AGV ao longo do ciclo. O rendimento máximo de metano obtido foi de 96 NmL CH₄ g⁻¹ DQO.

Phukingngam et al. (2011) avaliaram o desempenho de reatores anaeróbios compartimentados (ABR) para o tratamento de águas residuárias do processo de produção de biodiesel, em diferentes TCO e temperatura de 27 °C. A água residuária foi diluída nas concentrações de 5,0 – 30,0 g DQO L⁻¹. As TCO testadas foram de 0,5 – 3,0 kg DQO m⁻³ d⁻¹ e o TDH foi mantido constante em 10 dias. Os reatores foram inoculados com lodo obtido de um reator UASB de uma estação de tratamento de indústria de refrigerante. Os ABR operados nas TCO de 0,5 – 1,5 kg DQO m⁻³ d⁻¹ foram mais eficientes, apresentando remoção de DQO, metanol e glicerol entre 98 – 100%. No entanto, o aumento da TCO para 2,1 e 3,0 kg DQO m⁻³ d⁻¹ diminuiu as eficiências de remoção de DQO e metanol. A diminuição na conversão de glicerol também foi observada com o aumento da TCO acima de 2,1 kg DQO m⁻³ d⁻¹. Nas TCO de 0,5 – 2,1 kg DQO m⁻³ d⁻¹, as concentrações de AGV variaram de 12 a 64 mg HAc L⁻¹ e o pH entre 7,07 – 7,51. Um aumento da TCO para 3,0 kg DQO m⁻³ d⁻¹ provocou um aumento significativo na concentração de AGV para 410 mg HAc L⁻¹. O acúmulo de AGV levou a queda do pH para 6,07, o que não é favorável para a metanogênese. A taxa de produção de biogás aumentou de 2,1 – 12,4 L d⁻¹ quando a TCO foi aumentada de 0,5 para 1,5 kg DQO m⁻³ d⁻¹, e foi relativamente constante quando os reatores foram operados em TCO mais elevadas, 2,1 – 3,0 kg DQO m⁻³ d⁻¹. A produção de biogás revelou que a TCO de 1,5 kg DQO m⁻³ d⁻¹ apresentou maior produção de biogás e de metano. A composição global de metano foi responsável por 64 – 74% do volume total de biogás. A análise microbiológica dos grânulos do lodo indicou predominância das populações de *Methanosarcina* e *Methanosaeta*.

Bezerra et al. (2011) avaliaram o efeito da carga orgânica volumétrica aplicada sobre a eficiência, estabilidade e produção de metano em um reator AnSBBR aplicado ao tratamento de glicerol bruto nas concentrações de 1,0 – 4,0 g DQO L⁻¹, as quais correspondem as COV de 1,5 – 6,0 g DQO L⁻¹ d⁻¹, respectivamente. O inóculo utilizado foi proveniente de um reator UASB tratando águas residuais provenientes de um matadouro de aves e cubos de espuma de poliuretano foram utilizados como material suporte. O aumento da COV resultou em queda na eficiência de remoção de matéria orgânica e aumento na concentração de AGV no efluente. As COV de 1,5, 3,0, 4,5 e 6,0 g DQO L⁻¹ d⁻¹ resultaram em eficiências de remoção de 92, 81, 67 e 50%, respectivamente, enquanto as concentrações de AGV no efluente foram de 42, 145, 386 e 729 mg HAc L⁻¹, respectivamente. Além disso, ao aumentar a COV de 1,5 para

4,5 g DQO L⁻¹ d⁻¹ a produção de metano aumentou de 29,5 para 55,5 NmL CH₄ g⁻¹ DQO. No entanto, esta produção caiu para 36,0 NmL CH₄ g⁻¹ DQO quando a COV foi aumentada para 6,0 g DQO L⁻¹ d⁻¹, provavelmente devido à maior concentração de AGV no reator. Apesar da elevada concentração de AGV na COV mais alta, a suplementação de alcalinidade no afluente, na proporção de 0,5 – 1,3 g NaHCO₃ g⁻¹ DQO_{aplicada}, foi suficiente para manter o pH próximo ao neutro e garantir a estabilidade do processo durante a operação do reator.

Lovato et al. (2012) investigaram o efeito de diferentes tempos de alimentação (2 – 6 h), para concentrações iniciais de glicerol (3,0 – 5,0 g DQO L⁻¹), que correspondem as COV aplicadas (4,5 – 7,5 g DQO L⁻¹ d⁻¹) sobre a performance de um reator anaeróbio em batelada sequencial (AnSBBR), visando a remoção de matéria orgânica, bem como a produção de metano. O inóculo utilizado em todos os experimentos foi proveniente de um reator UASB tratando águas residuais provenientes de um matadouro de aves e o material suporte consistiu de cubos de espuma de poliuretano. O reator foi operado a cerca de 30 °C e pH próximo de 7. As maiores eficiências de remoção de matéria orgânica obtidas a COV de 4,5 g DQO L⁻¹ d⁻¹ foram 87%, em tempo de alimentação de 4 h e 84% em 2 e 6 h. Na COV de 6,0 g DQO L⁻¹ d⁻¹, maiores eficiências de remoção de matéria orgânica foram obtidas nos tempos de 4 e 6 h de 84%, contra 71% em 2 h. Na COV de 7,5 g DQO L⁻¹ d⁻¹, a eficiência de remoção de matéria orgânica obtida com 4 h de alimentação foi de 77%. Assim, tempos de alimentação mais longos favorecerão a minimização da concentração de AGV durante o ciclo, garantindo a estabilidade e a segurança do processo. O rendimento ótimo de metano foi de 5,28 mmol CH₄ g⁻¹ DQO_{consumida}, com porcentagem de metano no biogás de 75% no tempo de alimentação de 2 h e COV de 4,5 g DQO L⁻¹ d⁻¹. Sob todas as condições de operação investigadas, as análises microbiológicas revelaram a presença de morfologia semelhante à *Methanosarcina* sp. e *Methanosaeta* sp.

O trabalho realizado por Vlassis et al. (2012) teve como objetivo a utilização de glicerol puro para a produção de metano e hidrogênio. O reator utilizado para a produção de metano era um CSTR operado em condições mesofílicas (35 °C) e sua alimentação consistiu em glicerol nas concentrações de 5,0 – 10,0 g DQO L⁻¹, correspondendo as TCO de 0,25 – 0,5 g DQO L⁻¹ d⁻¹, respectivamente, o TDH foi mantido em 20 dias. Lodo metanogênico mesofílico obtido a partir de uma planta de estação de tratamento foi usado como inóculo. A operação do reator mostrou que ele não suportou TCO acima de 0,25 g DQO L⁻¹ d⁻¹, devido ao acúmulo de AGV e redução do pH. Nesta TCO, o rendimento máximo de metano alcançado foi de 0,30 m³ CH₄ kg⁻¹ DQO_{aplicada}. A produção de hidrogênio foi investigada em reatores em batelada sob condições mesofílicas (35 °C), utilizando cultura

microbiana anaeróbia pré-tratada termicamente, como inóculo. Na primeira série de experimentos, foi investigado o efeito da concentração inicial de glicerol ($8,3 - 25 \text{ g DQO L}^{-1}$) na produção de hidrogênio. Em seguida, a influência do pH sobre a produção de hidrogênio foi estudada, mantendo a concentração de glicerol inicial fixa em $8,3 \text{ g DQO L}^{-1}$. Neste experimento, o pH foi ajustado obtendo valores iniciais de $4,5 - 8,0$. O maior rendimento obtido foi de $22,14 \text{ mL H}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{aplicada}}$ em pH inicial de $6,5$ e concentração de glicerol inicial de $8,3 \text{ g DQO L}^{-1}$. O principal metabólico obtido foi 1,3 propanodiol, enquanto os ácidos butírico e acético, bem como o etanol, em baixas concentrações, também foram detectados.

A digestão anaeróbia de glicerol puro foi estudada por Vlassis et al. (2013) em dois biorreatores: reator de tanque agitado (CSTR) e reator compartimentado (PABR), operados em condições mesofílicas ($35 \text{ }^\circ\text{C}$) em diferentes cargas orgânicas. Lodo anaeróbio mesofílico proveniente de estação de tratamento de águas residuais municipal foi usado como inóculo nos experimentos. A alimentação do reator CSTR consistiu em glicerol em várias concentrações $5,0 - 10,0 \text{ g DQO L}^{-1}$ que correspondem as TCO de $0,25 - 0,5 \text{ g DQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, respectivamente. A TCO máxima alcançada pelo CSTR foi de $0,25 \text{ g DQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, dando origem à produtividade de metano de $0,074 \text{ L CH}_4 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Por outro lado, a alimentação do reator PABR consistiu em glicerol em várias concentrações $10,0 - 37,5 \text{ g DQO L}^{-1}$. O TDH foi fixado em 10 dias. A TCO máxima alcançada pelo PABR foi de $3,0 \text{ g DQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, dando origem à produtividade de metano de $0,993 \text{ L CH}_4 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Logo, o PABR foi mais eficiente, uma vez que foi submetido a uma carga orgânica 10 vezes maior que o CSTR. Além disso, seu desempenho foi muito maior em termos de remoção de DQO e produtividade de metano.

Watanabe et al. (2013) operaram dois biorreatores anaeróbios, sendo R_{CJ} contendo carvão de cedro japonês como material suporte e R_C operando como reator controle, sem material suporte. Os biorreatores foram operados em modo semi-contínuo, com agitação, TDH de 30 dias e temperatura de $35 \text{ }^\circ\text{C}$. O inóculo teve origem em um lodo de digestor anaeróbio em grande escala. O substrato utilizado foi glicerol (47% de pureza). Foram estipuladas fases de operações, as quais corresponderam a diferentes adições de glicerol, sendo a fase 1 de 0 a 12 dias de operação ($0,375 \text{ mL d}^{-1}$ ou $0,54 \text{ g DQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), fase 2 de 13 a 34 dias ($0,75 \text{ mL d}^{-1}$ ou $1,09 \text{ g DQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) e fase 3 de 35 a 85 dias ($1,5 \text{ mL L}^{-1}$ ou $2,17 \text{ g DQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$). Os autores constataram que a produção acumulada de metano apresentou comportamento semelhante em ambos os reatores durante as duas primeiras fases, com R_{CJ} mostrando resultados ligeiramente maiores que o R_C . Entretanto, na fase 3 (maior TCO

aplicada) R_{CJ} apresentou produção acumulada de metano significativamente superior a R_C no final da operação (aproximadamente 52 L reator⁻¹ e 32 L reator⁻¹, respectivamente), cerca de 1,6 vezes maior. Em R_C , no período de operação de 50 a 60 dias, houve uma diminuição na produção de metano, justificado pelo aumento dos níveis de ácido propiônico, indicando uma menor eficiência de degradado neste reator. Os autores destacam que em R_{CJ} , tal metabólito foi degradado de maneira satisfatória pelas *archaeas* metanogênicas hidrogenotróficas fixadas no material suporte utilizado. Os valores de pH no final da operação foram de 5,87 para R_C e 6,72 para R_{CJ} .

Hutňan et al. (2013a) avaliaram a utilização de glicerol bruto (GBNT - 55% de pureza) e glicerol bruto pré-tratado por processo de acidificação (GBPT - 80% de pureza) para produção de metano, em reatores anaeróbios de mistura, operados a 37 °C. Lodo suspenso foi utilizado como inóculo. O reator operado com GBNT teve sua TCO aumentada de 1,6 a 8,0 g DQO L⁻¹ d⁻¹. Inicialmente a produção específica de biogás aumentou com o aumento da TCO até 5,6 g DQO L⁻¹ d⁻¹, com parâmetros operacionais estáveis, como produção específica de biogás maior que 0,55 L g⁻¹ DQO, concentração de AGV inferior a 700 mg HAc L⁻¹ e pH em torno de 7. Com o aumento da TCO para 8,0 g DQO L⁻¹ d⁻¹, ocorreu um acentuado aumento na DQO e AGV efluente, com diminuição do pH (abaixo de 6) e da produção de biogás. Houve recuperação do sistema, mediante ajuste do pH e novamente se estabeleceu aumento gradual da dosagem de glicerol. A produção de biogás específica média durante a operação desse reator foi de 0,56 L g⁻¹ DQO. A concentração média de metano no biogás foi de 61,1% e o rendimento de metano de 0,33 L g⁻¹ DQO. No reator operado com GBPT a TCO foi elevada de 1,2 para 3,6 g DQO L⁻¹ d⁻¹. A produção específica de biogás foi em média 0,47 L g⁻¹ DQO para a TCO de 1,2 g DQO L⁻¹ d⁻¹, com aumento dessa variável na TCO aplicada de 3,0 g DQO L⁻¹ d⁻¹. Quando a TCO foi elevada para 3,6 g DQO L⁻¹ d⁻¹, houve deterioração no desempenho do reator, devido ao aumento da DQO e AGV efluente, com diminuição do pH e da produção de biogás. Assim, a TCO foi reduzida novamente a 3,0 g DQO L⁻¹ d⁻¹, permanecendo nesse valor. A produção média específica de biogás nesse reator foi de 0,680 L g⁻¹ DQO e concentração de metano média de 57,5%. O rendimento de metano médio foi de 0,345 m³ kg⁻¹ DQO_{aplicada}.

Hutňan et al. (2013b) avaliaram a operação de três reatores UASB, inoculados com biomassa suspensa ou granular, no tratamento de glicerol bruto não-diluído e diluído, sob condição mesofílica de temperatura (37 °C) e cultura mista como inóculo. Seis tipos diferentes de gliceróis brutos (GB) foram utilizados, sendo GB1 e GB2 com aproximadamente 55% de pureza e os demais (GB3 – GB6) com cerca de 80%. Para o

glicerol não diluído, TDH de 24 e 8 h foram usados para biomassa suspensa e granular, respectivamente. Utilizando glicerol diluído o TDH foi de 4,8 h. No processamento de glicerol bruto não-diluído (GB1), com biomassa suspensa (UASB1), a TCO variou de 1,30 a 4,32 kg DQO m⁻³ d⁻¹. A produção de biogás específica média foi de 0,73 L mL⁻¹ de glicerol bruto. No processamento de glicerol bruto não-diluído (GB1 e GB2) com biomassa granular (UASB2) a produção de biogás aumentou proporcional ao aumento da dosagem de glicerol. A TCO variou de 2,16 a 6,49 kg DQO m⁻³ d⁻¹, alcançando nessa última produção média específica de biogás de 0,82 L mL⁻¹ de glicerol bruto. Ocorreu deterioração no desempenho do reator, provavelmente pela acumulação de sais inorgânicos dissolvidos, atingindo concentração de ácidos em torno de 6000 mg HAc L⁻¹ no colapso. A execução do processamento de glicerol bruto diluído (GB2 – GB6) com biomassa granular (UASB3), não levou à acumulação de sais no reator, cuja máxima TCO aplicada foi de 3,9 kg DQO m⁻³ d⁻¹. O conteúdo de metano no biogás foi em média 70% e a produção específica de biogás não sofreu variação significativa durante o aumento da TCO, com valor médio de 0,51 L mL⁻¹ glicerol aplicado. Quando se converte a produção específica de biogás para m³ kg⁻¹ DQO_{aplicada} os valores são: 0,46, 0,51 e 0,43 m³ kg⁻¹ DQO_{aplicada}, para os reatores UASB1, UASB2 e UASB3, respectivamente. Convertendo a produção específica a metano na CNTP, os valores variaram de 0,27 a 0,31 m³ kg⁻¹ DQO_{aplicada}.

Dinh et al. (2014) estudaram as alterações na comunidade microbiana durante os estádios de adaptação para fermentação de glicerol e produção de metano. Durante os experimentos em batelada (ensaios descontínuos), sob condições mesofílicas (39 °C), a TCO foi mantida em 2,5 kg DQO m⁻³ d⁻¹. Foi utilizando como inóculo, lodo granular oriundo de um reator UASB metanogênico tratando água residuária de cervejaria. A taxa média de produção de biogás foi de aproximadamente 910 L m⁻³ d⁻¹ e o conteúdo de metano em torno de 59 – 64%, resultando em uma taxa de produção de metano de aproximadamente 580 L m⁻³ d⁻¹. A partir do 61º dia de operação, o frasco foi alimentado apenas com glicerol como fonte de carbono e a concentração de AGV foi menor que 200 g L⁻¹ (calculado pela soma de ácido acético, propiônico, butírico e isobutírico) e permaneceu estável até o final da operação. Análises microbiológicas revelaram que os microrganismos do gênero *Trichococcus* e família *Syntrophomonadaceae*, tornaram-se rapidamente dominante após o início da adaptação, e *archaea* dos gêneros *Methanobacterium* e *Methanospirillum*, aumentaram gradualmente com o progresso da adaptação.

Tangkathitipong et al. (2014) avaliaram a produção simultânea de hidrogênio e metano a partir de águas residuais do processo de produção de biodiesel contendo glicerina, utilizando um sistema de reatores anaeróbios em batelada sequencial (ASBR) de dois estágios, sob condições mesofílicas (37 °C). Inóculo de cultura mista foi utilizado nos reatores e a concentração de alimentação foi mantida em 45,0 g DQO L⁻¹. O sistema ASBR de dois estágios foi operado a diferentes TCO (33,75 – 84,38 kg DQO m⁻³ d⁻¹ no sistema ASBR H₂ e 5,63 – 14,06 kg DQO m⁻³ d⁻¹ no sistema ASBR CH₄). Para a unidade ASBR H₂ a TCO ótima de 67,50 kg DQO m⁻³ d⁻¹, gerou a máxima produtividade volumétrica de hidrogênio de 332,54 mL H₂ L⁻¹ d⁻¹ e composição máxima de H₂ de 31,67%. No ASBR CH₄ a TCO ótima foi de 11,25 kg DQO m⁻³ d⁻¹, na qual o sistema obteve a máxima produtividade volumétrica de metano de 672,84 mL CH₄ L⁻¹ d⁻¹ e composição máxima de CH₄ de 74,76%. No entanto, nas TCO mais elevadas, o desempenho na produção de H₂ e CH₄ diminuíram devido à toxicidade e acúmulo AGV nos reatores. Além disso, quando o sistema foi considerado em uma fase, a TCO de 9,64 kg DQO m⁻³ d⁻¹ foi considerada ótima, na qual foi encontrada composição máxima de H₂ e CH₄ (16,65% e 38,12%, respectivamente), produtividade volumétrica de H₂ (154 mL H₂ L⁻¹ d⁻¹) e CH₄ (355 mL CH₄ L⁻¹ d⁻¹) e os rendimento máximo de H₂ (20,43 mL H₂ g⁻¹ DQO_{aplicada}) e CH₄ (6,11 mL CH₄ g⁻¹ DQO_{aplicada}). Assim, os resultados mostram que o sistema sequencial foi mais vantajoso que a operação em fases separadas.

Albuquerque (2014) operou quatro reatores UASB, utilizando como substratos glicerol puro e bruto, em diferentes condições de concentração de DQO inicial (1,0 e 2,0 g DQO L⁻¹), temperatura (ambiente e 35 °C) e TDH (12 e 24 h), principalmente no que tange à remoção de DQO, produção de metano e acúmulo de AGV. Quatro reatores UASB foram operados em 2 fases. Na Fase 1, foram testados glicerol puro e bruto sob temperaturas diferentes, carga orgânica de 1,0 g DQO L⁻¹ d⁻¹ e TDH de 24 h. Na Fase 2, a carga orgânica foi dobrada e sua influência na degradação do glicerol bruto em diferentes temperaturas foi avaliada. Elevadas eficiências de degradação (77 – 84% de remoção de DQO) foram acompanhadas por pequeno acúmulo de AGV (112 – 170 mg DQO_{AGV} L⁻¹) na Fase 1 após um longo período de adaptação dos microrganismos, sem diferença significativa entre os reatores alimentados com glicerina pura e àqueles alimentados com glicerol bruto. Uma maior carga orgânica (2 g DQO L⁻¹ d⁻¹) prejudicou a remoção de matéria orgânica (21 – 48% de eficiência) e aumentou o acúmulo de AGV (272 – 563 mg DQO_{AGV} L⁻¹). A autora concluiu que a baixa produção de metano na Fase 1, em comparação com a Fase 2, indicou que a quantificação deste gás foi subestimada.

Zhang et al. (2015) estudaram a viabilidade da produção simultânea de acetato e metano a partir de glicerol por enriquecimento seletivo de metanogênicas hidrogenotróficas em condições hipertermofílicas (70 °C). O lodo anaeróbio utilizado foi obtido a partir de um reator UASB mesofílico para o tratamento de águas residuais de uma fábrica de cerveja. A operação foi realizada em reator CSTR sob TDH de 5,5 dias. Foram estudadas três concentrações iniciais de glicerol (5,0 – 13,0 g L⁻¹). O rendimento máximo de metano foi obtido na concentração de 5,0 g L⁻¹, variando entre 0,96 – 1,09 mol CH₄ mol⁻¹ glicerol. O rendimento máximo de acetato foi obtido na concentração de glicerol de 13,0 g L⁻¹, variando entre 0,74 – 0,80 mol HAc mol⁻¹ glicerol. Os experimentos mostraram que acetato foi produzido em uma concentração de até 13,0 g L⁻¹, sendo superior a 90 % w/w dos metabolitos líquidos produzidos. Esses resultados foram próximos aos valores teóricos. A análise da comunidade microbiana no CSTR demonstrou que as *archaeas* metanogênicas hidrogenotróficas, principalmente *Methanothermobacter thermautotrophicus* formaram 93% da comunidade metanogênica. Os autores concluíram que a elevada temperatura (70 °C) pôde efetivamente selecionar microrganismos metanogênicos hidrogenotróficos.

No trabalho de Boonsawang et al. (2015) avaliou-se o processo anaeróbio de duas fases, tratando águas residuais de biodiesel. O efeito do pH, TDH e TCO sobre o desempenho de ambos os reatores foi investigada utilizando a metodologia de superfície de resposta. Inóculo misto advindo de um reator UASB foi utilizado, sendo submetido a tratamento térmico para utilização no reator acidogênico. A concentração da água residual afluyente foi diluída para 10,0 g DQO L⁻¹. Todos os experimentos foram realizados a 30 °C. No reator acidogênico, o pH ótimo, TDH e a TCO foram 6,48, 16 h, e 26,0 g DQO L⁻¹ d⁻¹, respectivamente. Aplicando-se essas condições experimentalmente, elevada produção de AGV de 9,35 g L⁻¹ foi alcançada, com baixa produção de metano e remoção de DQO de 41,5%. No reator metanogênico, o valor ótimo do pH, TDH e a TCO foram 6,95, 30 h, e 6,0 g DQO L⁻¹ d⁻¹, respectivamente. A produção de biogás verificada experimentalmente foi de 19,1 L d⁻¹, remoção de DQO de 93,5% e produção de metano de 0,14 m³ CH₄ kg⁻¹ DQO_{removida}. Os AGV foram completamente consumidos. Em comparação, o sistema de duas fases apresentou maior eficiência do que o sistema de uma fase.

Assim como para a produção de H₂, as pesquisas de produção de CH₄ utilizando glicerol como substrato foram realizadas, em sua maioria, em faixa mesofílica de temperatura e em reatores batelada e biomassa suspensa (Tabela 3.4). Nota-se a carência de aplicações em reatores com biomassa imobilizada e faixa de temperatura termofílica.

Tabela 3.4 – Resumo da literatura sobre as condições para produção de CH₄ a partir de glicerol.

Reator	Temperatura (°C)	DQO (g DQO L ⁻¹)	TDH (h)	TCO (kg DQO m ⁻³ d ⁻¹)	MY (m ³ CH ₄ kg ⁻¹ DQO _{aplicada})	Referência
Reatores Mesofílicos						
Leito Fixo	35	GP 3,5 – 9,8	336	0,25 – 0,70*	0,37	Yang et al. (2008)
ASBR	30	GB 0,5 – 3,0	8**	0,6 – 3,82	0,10 ^b	Selma et al. (2010)
		GB 1,0 – 2,0	2 – 4**	1,27 – 2,44		
ABR	27	GB 5,0 – 30,0	240	0,5 – 3,0	0,28	Phukingngam et al. (2011)
AnSBBR	30	GB 1,0 – 4,0	8**	1,5 – 6,0	0,06 ^b	Bezerra et al. (2011)
AnSBBR	30	GB 3,0 – 5,0	2 – 6**	4,5 – 7,5	5,28 ^a	Lovato et al. (2012)
CSTR	35	GP 5,0 – 10,0	480	0,25 – 0,5	0,30	Vlassis et al. (2012)
PABR	35	GP 10,0 – 37,5	240	1,0 – 3,75	0,33	Vlassis et al. (2013)
R _{CJ} R _C	35	GB 16,2 – 65,1	720	0,54 - 2,17	-	Watanabe et al. (2013)
RAM-GB _{NT}	37	-	-	1,6 – 8,0	0,33	Hutňan et al. (2013a)
RAM-GB _{PT}				1,2 – 3,6	0,35	
UASB ₁	37	-	24	1,30 – 4,32	0,29	Hutňan et al. (2013b)
UASB ₂			8	2,16 – 6,49	0,31	
UASB ₃			14,8	0,50 – 3,90	0,27	

Tabela 3.4 – Resumo da literatura sobre as condições para produção de CH₄ a partir de glicerol. (continuação)

Batelada	39	GP 2,05 – 8,22*	-	2,5	-	Dinh et al. (2014)
ASBR 2E	37	GB 45,0	-	5,63 – 14,06	-	Tangkathitipong et al. (2014)
ASBR 1E				4,82 – 12,05	0,01	
UASB	Ambiente*** e 35	GB 1,0 – 2,0*	12 – 24	1,0 – 2,0*	-	Albuquerque (2014)
Reator 2E	30	GB 10,4 – 12,5*	18 – 30	4,0 – 8,0*	0,14 ^b	Boonsawang et al. (2015)
Reator 1E				8,8*	0,03 ^b	
Reatores Termofílicos						
Leito Fixo	55	GP 3,5 - 14,0	336	0,25 – 1,0*	0,45	Yang et al. (2008)
CSTR	70	GB 5,0 – 13,0*	132	0,9 – 2,3*	0,96 – 1,09 ^c	Zhang et al. (2015)

UASB: *Anaerobic Up-flow Column Bioreactor*; ASBR: *Anaerobic Sequencing Batch Reactor*; ABR: *Anaerobic Baffled Reactor*; AnSBBR: *Anaerobic Sequencing Batch Biofilm Reactor*; CSTR: *Continuous Stirred Tank Reactor*; PABR: *Periodic Anaerobic Baffled Reactor*; RAM: Reator Anaeróbio Metanogênico; R_{CJ}: Reator com carvão de cedro japonês como material suporte; R_C: Reator Controle GB: Glicerol bruto; GP: Glicerina pura; GB_{NT}: glicerol puro sem tratamento; GB_{PT}: pré-tratado por processo de acidificação 1E: um estágio; 2E: dois estágios; MY: rendimento de CH₄ em DQO; *concentração de glicerol em g L⁻¹ e TCO em kg m⁻³ d⁻¹; **tempo de alimentação (h); ***A temperatura ambiente variou de 16 a 37 °C; ^ammol CH₄ g⁻¹ DQO_{removida}; ^bm³ kg⁻¹ DQO_{removida}; ^cmol CH₄ mol⁻¹ glicerol_{consumido}.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

3.8 PRINCÍPIOS E FUNDAMENTOS FERMENTATIVOS SOB TEMPERATURA TERMOFÍLICA

Os microrganismos são capazes de produzir hidrogênio em intervalos de temperatura de 15 a 85 °C. As reações fermentativas podem ser operadas em temperaturas mesofílicas, entre 25 e 40 °C, termofílicas, entre 40 e 65 °C e em condições hipertermofílicas, com temperaturas acima de 80 °C. Segundo Wang (2009), a temperatura é um dos mais importantes fatores influentes na atividade dos microrganismos produtores de H₂ e conseqüentemente na produção fermentativa de H₂.

A diversidade de substratos sintéticos e reais tem sido viabilizada para a produção de hidrogênio por meio de processos fermentativos termofílicos e, em sua maioria, a partir de reatores em batelada, utilizando o óleo de palma (O-THONG et al., 2009), soro de queijo (KARGI et al., 2012), água residuária de mandioca (O-THONG et al., 2011), celulose (XIA et al., 2012) e glicerol (NGO et al., 2011; SITTIJUNDA et al., 2012; MARU et al., 2012; MARU et al., 2013). A efetividade da produção de hidrogênio também pôde ser verificada em reatores contínuos, a partir de sacarose (DONG et al., 2011; OBAZU et al., 2012), soro de queijo (AZBAR et al., 2009a; AZBAR et al., 2009b), vinhaça de destilarias de álcool (WANG et al., 2011; SANTOS et al., 2014a; 2014b; 2014c) e glicerol (FERREIRA, 2014). A produção de metano por meio de processos fermentativos termofílicos a partir de glicerol em reatores contínuos pôde ser verificada nos trabalhos de Yang et al., 2008 e Zhang et al., 2015.

Sistemas termofílicos operados normalmente sob temperaturas de 55 a 60 °C apresentam elevada produção e rendimento de hidrogênio. Esses fatores são principalmente atribuídos ao maior favorecimento termodinâmico, aumentando as reações químicas e biológicas, à dominância da via metabólica do acetato contrariamente a do etanol ou do lactato e a maior tolerância à pressão parcial do hidrogênio (O-THONG et al., 2009).

O hidrogênio apresenta baixa solubilidade em fase aquosa: 0,017 cm³ de H₂ por 1 cm³ de água a 1 bar e 37 °C (GUWY et al., 1997). Levando-se em consideração a Lei de Henry, temperaturas mais elevadas acabam reduzindo a solubilidade do gás na fase aquosa e, conseqüentemente, a interação do gás com os microrganismos presentes no processo. Isso desfavorece o consumo do gás para geração de outros produtos do processo fermentativo e aumenta a eficiência da transferência líquido-gás deste composto.

A influência da pressão parcial de hidrogênio (P_{H₂}) na fase gasosa também é importante. Quando a concentração de hidrogênio se eleva, a síntese de H₂ torna-se termodinamicamente desfavorável e o metabolismo é deslocado para a produção de produtos

finais reduzidos (LEVIN et al., 2004). Apenas em baixos valores de P_{H_2} , poderá ocorrer a oxidação do NADH para NAD^+ por meio da síntese de H_2 (CIRANNA et al., 2011).

A digestão anaeróbia convencional é realizada à temperatura mesofílica. No entanto, a faixa de temperatura termofílica é considerada como uma alternativa, pois permite aplicação de taxas mais elevadas no reator, maior produção de biogás e maiores taxas de destruição de agentes patogênicos do que a faixa de temperatura mesofílica. Contudo, o processo termofílico é mais sensível a alterações do ambiente do que o processo mesofílico (YANG et al., 2008).

3.9 PRODUÇÃO DE BIOENERGIA EM REATOR ANAERÓBIO DE LEITO FLUIDIZADO

A configuração do reator e a otimização de parâmetros operacionais são essenciais para obtenção de melhores taxas de produção de hidrogênio e metano, sendo que o desempenho do sistema é largamente influenciado pela retenção de biomassa no reator (REN et al., 2011). Grande parte dos experimentos de produção de hidrogênio e metano são conduzidos em reatores operados em batelada. Essa configuração é de fácil operação e controle, gerando uma série de trabalhos com diferentes resíduos (GUO et al., 2010). Entretanto, visando à aplicação em escala industrial, é necessário entender o comportamento da fermentação durante o processo contínuo.

O reator anaeróbio de leito fluidizado consiste em um vaso cilíndrico contendo meio suporte inorgânico e se caracteriza pela capacidade em reter grandes quantidades de biomassa. Neste tipo de reator, o meio é fluidizado pela velocidade ascendente do líquido criada pelas taxas de escoamento de alimentação e recirculação. A separação do líquido, biogás e sólido, é garantida pela presença de um separador trifásico no topo do reator (BARROS, 2009).

Essa configuração de reator possui como vantagens o acúmulo de elevada quantidade de biomassa aderida ao material suporte, mantendo elevadas taxas de carregamento orgânico, possibilidade de aplicação de baixos tempos de detenção hidráulica e boas características de mistura, otimizando a transferência de massa entre o substrato e os microrganismos, além de promover alta velocidade de agitação na fase líquida favorecendo o desprendimento do biogás (WU et al., 2003).

3.9.1 Produção de hidrogênio em RALF

Algumas pesquisas em produção de hidrogênio tem sido realizadas em reatores de leito fluidificado (Koskinen et al., 2007; Zhang et al., 2007; Wu et al., 2007; Shida, 2008; Rosa et al., 2014) devido às vantagens conferidas ao processo anaeróbio pela fluidificação do meio.

Zhang et al. (2007b) operaram um RALF utilizando carvão ativado como material suporte para adesão da biomassa para avaliar a redução do TDH de 4 – 0,5 h a partir de glicose em uma concentração de 10 g L^{-1} como fonte de carbono, suplementada com nutrientes. Sob condições de pH 4,0 e temperatura de $37 \text{ }^\circ\text{C}$, a conversão da glicose reduziu de 99,47% em TDH de 4 h para 71,4% em TDH de 0,5 h. A composição de hidrogênio no biogás produzido reduziu de 61,2% para 57,2% com a diminuição do TDH. O rendimento na produção de hidrogênio foi de $0,94 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}$ glicose, no TDH de 4 h e estabilizou em $1,12 - 1,19 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}$ glicose entre o TDH de 0,5 e 2 h. A produtividade volumétrica de hidrogênio aumentou significativamente com a redução do TDH, alcançando valor máximo de $2,22 \text{ L h}^{-1} \text{ L}^{-1}$ em TDH de 0,5 h. Em geral, os metabólitos solúveis produzidos foram o ácido acético (43 a 46%), ácido butírico (20 a 31%), etanol (14 a 21%), ácido capróico (7 a 10%) e ácido propiônico (0 a 3%).

Estudos envolvendo a produção de hidrogênio em RALF, utilizando água residuária sintética e complexa, foram reportados pelo grupo de pesquisa do LCAII/DEQ/UFSCar em anos anteriores. Amorim et al. (2009) estudaram a produção de H_2 em RALF alimentado com água residuária sintética a base de glicose (2000 mg L^{-1}) e cinasita como material suporte. A faixa de TDH avaliada foi de 8 a 1 h e temperatura de operação de $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Houve aumento do HY de 1,41 para $2,49 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}$ glicose, quando avaliado sob redução de TDH de 8 para 2 h, porém, para o TDH de 1 h houve redução deste parâmetro para $2,41 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}$ glicose. O biogás produzido foi composto por H_2 e CO_2 , sendo que a redução do TDH causou incremento da concentração de H_2 de 8 para 35%. A fermentação obtida pode ser caracterizada como butírico-acética, com a maior parte de metabólitos produzidos representada por ácido acético (36,1 – 53,3%) e ácido butírico (36,1 – 44,9%).

Barros et al. (2010) avaliaram dois diferentes materiais suporte (poliestireno e argila expandido) para a produção de hidrogênio em RALF a partir de água residuária sintética contendo glicose (4000 mg L^{-1}) como substrato, suplementada com nutrientes. Os RALF continham ou poliestireno (R1) ou argila expandida (R2) como materiais suporte e foram inoculados com lodo anaeróbio de reator UASB, tratando águas residuárias de suinocultura,

pré-tratado termicamente. Os reatores foram operados em temperatura de 30 °C e pH de aproximadamente 5,5. Os RALF foram operados variando-se o TDH entre 8 – 1 h. Para o reator R1 no TDH de 2 h, o rendimento máximo de hidrogênio foi de 1,90 mol H₂ mol⁻¹ glicose, para o R2 no TDH de 2 h, o rendimento máximo de hidrogênio foi de 2,52 mol H₂ mol⁻¹ glicose. Já as máximas produtividades volumétricas de hidrogênio ocorreram no TDH de 1 h, cujos valores para R1 e R2 foram respectivamente 0,95 L h⁻¹ L⁻¹ e 1,21 L h⁻¹ L⁻¹. Logo, os autores concluíram que a conversão de glicose foi maior no reator operado na presença de argila expandida (R2), atribuindo esse fato as melhores características de superfície desse material.

Barros et al. (2012) avaliaram a influência de diferentes materiais suportes: poliestireno (R1), pneu triturado (R2) e polietileno tereftalato (R3), na produção de hidrogênio e etanol utilizando RALF e glicose como substrato, na concentração de 4,0 g L⁻¹. Os reatores foram inoculados com lodo anaeróbico, pré-tratado termicamente, proveniente de um reator UASB destinado ao tratamento de efluente suíno. Os RALF foram operados com TDH decrescente de 8 – 1 h, temperatura constante em 23 °C e pH em cerca de 5,0 no afluente e 3,5 no efluente. Em relação à produção de H₂, o melhor desempenho se deu no reator utilizando pneu triturado, no TDH de 2 h, cujo máximo rendimento de hidrogênio foi de 2,11 mol H₂ mol⁻¹ glicose, com teor de H₂ de 60%. Em todos os reatores, os metabólitos solúveis predominantes foram ácido acético, ácido butírico, ácido láctico e etanol, além de baixas concentrações de ácido propiônico. O R2 foi o reator que apresentou maior produção de ácido acético e butírico (434,74 e 1013,61 mg L⁻¹, respectivamente). No entanto, o R3 mostrou melhor desempenho para a produção de etanol (1941,78 mg L⁻¹).

Santos et al. (2014a) avaliaram o efeito da TCO na produção de H₂, utilizando vinhaça como substrato, em dois RALF (RALF1: 15000 mg DQO L⁻¹; RALF2: 20000 mg DQO L⁻¹). A temperatura foi mantida constante em 55 °C e o TDH variou decrescentemente de 6 a 1 h. Com a redução do TDH, a produtividade de hidrogênio manteve perfil crescente em ambos os reatores, com valores máximos de 1,49 L H₂ L⁻¹ h⁻¹ (15000 mg DQO L⁻¹) e 1,2 L H₂ h⁻¹ L⁻¹ (20000 mg DQO L⁻¹) no TDH de 1 h. Entretanto, o rendimento de hidrogênio foi reduzido com a diminuição do TDH, com valores máximos de 2,23 mmol H₂ g⁻¹ DQO_{aplicada} (15000 mg DQO L⁻¹) e de 1,85 mmol H₂ g⁻¹ DQO_{aplicada} (20000 mg DQO L⁻¹), observados no TDH de 6 h. Estes resultados indicaram que a produção de hidrogênio foi realizada sobre condições de sobrecarga orgânica no reator. Os principais metabólitos produzidos foram os ácidos láctico, butírico, isobutírico e propiônico. A população microbiana caracterizou-se pela

presença de produtores de hidrogênio (*Megasphaera* sp.) e outros organismos (*Lactobacillus* sp.).

Com o objetivo de utilizar glicose como fonte de carbono para facilitar a adaptação da comunidade microbiana à vinhaça, Santos et al. (2014b) avaliaram a co-digestão de diferentes razões destes substratos em RALF termofílico (55 °C), utilizando misturas de vinhaça e glicose com, aproximadamente, 5000 – 5300 mg DQO L⁻¹. Como fonte de inóculo foi utilizado lodo pré-tratado termicamente de reator UASB termofílico (55 °C) para o tratamento de vinhaça de cana de açúcar. Nesse estudo, o TDH variou de 8 a 1 h, com subsequente aumento da TCO de 26,6 para 225,3 kg DQO m⁻³ d⁻¹, aplicando frações decrescentes de glicose na vinhaça. O rendimento máximo de H₂ (5,73 mmol H₂ g⁻¹ DQO_{aplicada}) foi obtido no TDH de 4 h, com TCO igual a 52,7 kg DQO m⁻³ d⁻¹. Entretanto, a produtividade volumétrica de hidrogênio obteve perfil crescente com a redução do TDH, com valor máximo de 0,78 L H₂ h⁻¹ L⁻¹ no TDH de 1 h. Os principais metabólitos encontrados foram os ácidos succínico, láctico e butírico. A comunidade microbiana foi dominada por *Thermoanaerobacterium* sp. e *Clostridium* sp.

Santos et al. (2014c) avaliaram a produção de H₂ em dois RALF termofílicos (55 °C), ao utilizar vinhaça diluída e vinhaça bruta como substratos (RALF1: 10000 mg DQO L⁻¹; RALF2: 30000 mg DQO L⁻¹), reduzindo o TDH de 6 para 1 h. Ambos os reatores apresentaram resultados efetivos na produção de hidrogênio, no entanto, o RALF1 apresentou os melhores resultados (2,86 mmol H₂ g⁻¹ DQO_{aplicada}), em um TDH de 6 h e produtividade volumétrica de H₂ (1,96 L H₂ L⁻¹ h⁻¹) no TDH de 1 h. No caso do RALF2, o rendimento máximo de H₂ de 0,79 mmol H₂ g⁻¹ DQO_{aplicada}, no TDH de 6 h, e a produtividade volumétrica máxima de 0,8 L H₂ L⁻¹ h⁻¹, no TDH de 1 h, foram frutos da inibição da produção de hidrogênio pela maior concentração de ácidos na alimentação, como butírico (3,7 g L⁻¹) e acético (3,0 g L⁻¹), resultando em sobrecarga do reator. Pelas análises microbiológicas, os autores concluíram que o efeito inibitório da maior concentração de ácidos graxos no afluente modificou a estrutura da comunidade microbiana, motivo diretamente responsável pelos diferentes resultados entre os dois reatores.

Trabalhos recentes realizados pelo grupo de pesquisa do LCAII/DEQ/UFSCar relatam a potencial aplicação de RALF na fermentação do glicerol bruto. Ferreira (2014) operou um RALF, utilizando como material suporte argila expandida (cinasita) com o objetivo de avaliar a produção de hidrogênio mediante as condições operacionais estabelecidas. Glicerol bruto foi utilizado como substrato na concentração de 5,0 g L⁻¹, suplementado com nutrientes. O lodo utilizado para inoculação do RALF termofílico foi proveniente de um reator UASB

termofílico, para tratamento de vinhaça, o qual foi submetido ao tratamento térmico. A temperatura do reator foi mantida em 55 °C e o pH do afluente foi ajustado em torno de 6 e 7, de acordo com os valores do pH efluente (4 a 5,5). O reator foi operado variando-se o TDH entre 14 – 1 h. Os resultados mostraram que os máximos rendimento e produtividade volumétrica de H₂, alcançados no TDH de 1 h, foram de 3,0 mol H₂ mol⁻¹ glicerol e 1508,7 mL L⁻¹ h⁻¹, respectivamente. Entre os TDH de 14 a 2 h, houve o predomínio dos metabólitos 1,3-PDO, EtOH, HAc e H₂Bu. No entanto, ao reduzir o TDH para 1 h, a produção de EtOH cessou e a produção de H₂Pr foi favorecida.

Bósio (2014) avaliou a produção de hidrogênio em RALF, utilizando argila expandida como material suporte. O TDH variou entre 14 e 1 h e a concentração de glicerol foi fixada em 5,0 g L⁻¹, suplementado com nutrientes. O inóculo empregado foi lodo granular proveniente de reator UASB mesofílico, utilizado no tratamento de águas residuárias de abatedouro de aves, o qual foi submetido ao tratamento térmico. A temperatura foi mantida em 30 °C e o pH controlado em 4,5. Os máximos rendimento e produtividade volumétrica de H₂, 0,73 L h⁻¹ L⁻¹ e 0,85 mol H₂ mol⁻¹ glicerol, respectivamente, foram alcançados no TDH de 1 h. Os principais metabólitos produzidos neste reator foram 1,3-propanodiol, ácido propiônico e etanol, com rendimentos máximos de 0,66, 0,63 e 0,49 mol mol⁻¹ glicerol, respectivamente, nos TDH de 2 e 1 h.

Nazareth (2015) avaliou a produção de H₂Pr, 1,3-PDO e H₂, em RALF mesofílico contendo pneu triturado como material suporte. O TDH variou entre 8 – 0,5 h. A concentração de glicerol foi fixada em 5,0 g L⁻¹, suplementado com nutrientes. O inóculo empregado foi lodo proveniente de um reator UASB mesofílico, utilizado no tratamento de águas residuárias de abatedouro de aves, o qual foi submetido ao tratamento térmico. A temperatura foi mantida em 30 °C e o pH em torno de 4,5. A autora constatou que não ocorreu produção volumétrica de hidrogênio nos TDH de 8, 6 e 4 h, e que nos demais TDH (2, 1 e 0,5 h) houve produção desse biocombustível, cuja máxima produção de 13,2 mL L⁻¹ h⁻¹ ocorreu no TDH de 1 h. Os resultados obtidos mostraram que os principais metabólitos produzidos foram H₂Pr e 1,3-PDO, com rendimentos máximos de 1,77 e 0,82 mol mol⁻¹ glicerol, respectivamente, no TDH de 8 h.

O trabalho de Paranhos (2016) teve como objetivo otimizar a produção de hidrogênio e outros metabólitos, utilizando glicerol bruto como substrato. O primeiro estudo visou à otimização de parâmetros operacionais do processo fermentativo, onde um RALF mesofílico foi operado em 10 fases distintas, distribuídas conforme uma combinação do TDH e da

concentração de glicerol (C_g). O TDH variou de 9,24 a 0,76 h, enquanto a C_g variou de 17,1 a 2,9 g L⁻¹. Os resultados obtidos mostraram que a máxima conversão de glicerol, 98,4%, foi obtida utilizando concentrações de substrato menores que 5,0 g L⁻¹. O máximo rendimento (0,17 mol H₂ mol⁻¹ glicerol_{consumido}) e conteúdo de H₂ no biogás produzido (87,4%) foram atingidos em concentrações superiores a 10,0 g L⁻¹ e TDH de 5 h. Dentre os principais metabólitos solúveis produzidos, 1,3-PDO e HPr se destacaram. O segundo estudo, por sua vez, consistiu na otimização de componentes do meio de cultura, através de ensaios em batelada, e posterior aplicação em RALF. Os máximos rendimentos de H₂ e etanol, 0,006 e 0,291 mol mol⁻¹ glicerol_{consumido}, foram obtidos em meio de cultura ótimo constituído por 26,53 g L⁻¹ de glicerol, 1,75 g L⁻¹ de KH₂PO₄, 0,0076 g L⁻¹ de B12 e 0,5 g L⁻¹ de extrato de levedura.

3.9.2 Produção de metano em RALF

Além dos trabalhos realizados para a produção de metano a partir de glicerol nas mais diversas configurações de reatores, outras pesquisas foram realizadas utilizando diferentes substratos, mas tendo destaque para a utilização do RALF.

Damiano (2005) avaliou o desempenho de um RALF na degradação da vinhaça de cana de açúcar, sob condições mesofílicas. O reator anaeróbio, de 770 cm³ e operado em TDH de 24 h, foi inoculado com lodo proveniente de água residuária de abatedouro de aves e preenchido com partículas de poliestireno, após testes com diferentes meios suportes (poliamida, poliestireno e nylon) que apresentaram boa adesão microbiana. O reator foi operado durante 122 dias, com valores de DQO, da vinhaça diluída, variando de 1009 a 15874 mg L⁻¹ e TCO aplicada variando de 1,0 a 15,9 kg m⁻³ d⁻¹, apresentando eficiências médias de remoção de DQO de 51 a 70 % para valores de TCO removidas de 0,5 a 7,9 kg m⁻³ d⁻¹. O pH manteve-se estável, entre 6,5 e 8,5, durante todo experimento. Boa adesão microbiana nas partículas de poliestireno foi encontrada através das análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) em todas as fases do reator.

Fernández et al. (2007) estudaram a aplicação de zeólita como meio suporte em RALF tratando vinhaça de cana de açúcar sob condições mesofílicas, isto é, Reator1 com diâmetro das partículas entre 0,25 e 0,50 mm e Reator2 com diâmetros entre 0,50 e 0,80 mm. Através da análise de MEV, as características físicas das zeólitas foram observadas. A concentração da biomassa fixa ao suporte, em ambos os reatores, variou entre 40 a 45 g SVT L⁻¹. Eficiências de remoção de DQO superiores a 90% foram alcançadas para TCO de até

20 kg DQO L⁻¹ d⁻¹. As concentrações de AGV foram sempre inferiores ao limite para o colapso do reator. O rendimento de produção de metano foi de 0,29 L CH₄ g⁻¹ DQO_{removida} e foi independente da TCO aplicada. Através da técnica de hibridização (hibridização fluorescente in situ, FISH), observou-se que *Methanosaeta* e *Methanosarcina* foram os microrganismos anaeróbios predominantes que colonizaram as zeólitas. Os resultados obtidos para ambos os reatores foram similares, mostrando que o tamanho da partícula não influenciou significativamente a comunidade microbiana imobilizada na zeólita.

O estudo de Andalib et al. (2012) teve como objetivo avaliar o tratamento da vinhaça, subproduto do processo de produção de etanol, utilizando RALF sob condições mesofílicas (37 °C), preenchido com zeólita como material suporte. O TDH foi mantido em 3,5 dias. Lodo anaeróbio proveniente de uma estação de tratamento de águas residuais municipal foi utilizado como inóculo. As concentrações de SST e SSV foram 15900 mg L⁻¹ e 12180 mg L⁻¹, respectivamente. A concentração de vinhaça na alimentação foi de 130000 mg DQO L⁻¹ e sólidos solúveis totais de 47000 mg SST L⁻¹. O RALF alcançou remoção de DQO e SST de até 88 e 78%, respectivamente, sob elevada carga orgânica e de sólidos (29 kg DQO m⁻³ d⁻¹ e 10,5 kg SST m⁻³ d⁻¹), em TDH de 3,5 dias. A taxa de produção de metano máxima foi de 160 L d⁻¹ no estado estacionário, equivalente a 40 L CH₄ L⁻¹ d⁻¹ e a taxa de produção de biogás por volume de reator foi de 15,8 L L_{reator}⁻¹ d⁻¹.

Yeshanew et al. (2016) estudaram o processo de start-up de um RALF mesofílico (37 °C) operado em TDH de 20 dias, utilizando glicose e posteriormente uma mistura de acetato e propionato como substratos, com suplementação nutricional. Foi utilizado como material suporte pequenos cilindros de polietileno de baixa densidade (Kaldness-K1). O inóculo foi proveniente de uma planta de tratamento de resíduos de laticínio em condições mesofílicas. Neste estudo, foram identificados diversos fatores operacionais que afetam o processo de start-up de um RALF, como as condições hidrodinâmicas obtidas com a recirculação do efluente, mantido a uma taxa de 125 mL min⁻¹, que foram adequadas para o melhor desempenho do reator e formação de biofilme. Quando o reator foi alimentado com a mistura de acetato e propionato como substratos, houve aumento do crescimento das *archaeas* metanogênicas, favorecendo a sua colonização no material suporte. Ao fim da operação, o reator produziu um rendimento diário de metano próximo ao teórico, isto é, entre 340 e 345 mL g⁻¹ DQO d⁻¹, com uma eficiência de remoção de DQO entre 94 e 95%.

Trabalhos envolvendo a produção de metano e hidrogênio/metano em RALF, utilizando água residuária complexa, também foram realizados pelo grupo de pesquisa do LCAII/DEQ/UFSCar.

Siqueira et al. (2013) estudou a degradação anaeróbia da vinhaça de cana-de-açúcar em RALF sob condições mesofílicas (35° C). Partículas de poliestireno foram utilizadas como meio suporte e o reator foi operado em TDH fixo de 24 h. O inóculo utilizado foi lodo granular de um reator UASB tratando água residuária de abatedouro de aves. As concentrações médias de vinhaça tratada foram de 2273 – 20073 mg DQO L⁻¹ com TCO aplicadas de 3,33 – 26,19 kg DQO m⁻³ d⁻¹ e respectivas eficiências de remoção de DQO de 51 – 70%. As concentrações de AB e AGV aumentaram com o aumento da TCO, variando entre 918 – 7275 mg CaCO₃ L⁻¹ e 365 – 3146 mg HAc L⁻¹, respectivamente. A produtividade volumétrica de biogás no reator alcançou 5,37 m³ m⁻³ d⁻¹ para a TCO aplicada de 25,32 kg DQO m⁻³ d⁻¹. Os testes de atividade metanogênica específica (AME) revelaram possível predomínio de metanogênicas hidrogenotrófica. Exames de microscopia ótica permitiram constatar a presença de espécies semelhantes às *archaeas* metanogênicas do gênero *Methanosarcina* durante a adaptação do inóculo, ocorrendo seleção e predominância, no decorrer da operação do reator de espécies semelhantes às *archaeas* do gênero *Methanosaeta*.

Rosa et al. (2014) estudaram os efeitos de diferentes TDH (4 – 1 h) e diferentes fontes de inóculo (R1 com lodo de suinocultura e R2 com lodo de avicultura) sobre a produção de H₂ e CH₄ em dois RALF, utilizando partículas de poliestireno como material suporte. Ambos os inóculos foram submetidos ao tratamento térmico. Soro de queijo foi utilizado como substrato em concentração de 5000 mg L⁻¹. Os reatores foram operados sob temperatura mantida em 30 °C e pH entre 4,0 a 4,5. Mesmo com o tratamento térmico dos inóculos e condições operacionais ácidas, quando os reatores foram operados no TDH de 1 h, metano foi produzido concorrentemente com hidrogênio, sendo seu maior valor de 0,68 L CH₄ h⁻¹ L⁻¹ em R2. As produtividades volumétricas máximas de H₂ no R1 e R2 foram respectivamente 0,74 e 0,51 L H₂ h⁻¹ L⁻¹, também no TDH de 1 h. O rendimento máximo de hidrogênio ocorreu no TDH de 4 h no R1 e foi de 1,33 mol H₂ mol⁻¹ lactose. Já o rendimento máximo de metano se deu em R2, no TDH de 1 h e foi de 1,26 mol CH₄ mol⁻¹ lactose. Os principais metabolitos observados foram etanol, metanol, ácido acético e ácido butírico. Clonagem das sequências de genes indicaram que as comunidades microbianas foram caracterizadas pelos gêneros *Selenomonas* sp. e *Methanobacterium* sp.

Reis et al. (2015) operaram dois RALF a fim de avaliar a produção de H_2 e CH_4 utilizando vinhaça de cana-de-açúcar como substrato, sendo o reator R5 ($5,0 \text{ g DQO L}^{-1}$) e R10 ($10,0 \text{ g DQO L}^{-1}$). O TDH sofreu a mesma variação em ambos os reatores (6 – 1 h). O inóculo utilizado foi lodo anaeróbio proveniente de um reator UASB tratando águas residuárias de suinocultura, o qual foi submetido ao tratamento térmico. A temperatura foi mantida sob condições mesofílicas ($22 \text{ }^\circ\text{C}$), o pH na faixa de 4 a 5 e argila expandida foi utilizada como material suporte. Em R5 o conteúdo de hidrogênio no biogás apresentou redução durante a variação do TDH de 6 a 2 h, apresentando valor máximo de 34% no TDH de 1 h. De maneira oposta o conteúdo de metano no biogás apresentou aumento até o TDH de 2 h, no qual apresentou seu valor máximo, cessando sua produção no TDH de 1 h. Em R10 o conteúdo de hidrogênio apresentou comportamento semelhante a R5, com diminuição entre os TDH de 6 a 1 h e seu valor máximo ocorreu em 6 h. O conteúdo de metano apresentou comportamento irregular, mas com valores aproximadamente constantes. Em R5, tanto a produtividade volumétrica como a rendimento de H_2 apresentaram aumento com a diminuição do TDH, com valores máximos em 1 h ($0,57 \text{ L h}^{-1} \text{ L}^{-1}$ e $1,96 \text{ mmol H}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{removida}}$). No R10, de maneira contrária ao R5, tais parâmetros apresentaram de forma geral decaimento com a diminuição do TDH.

3.10 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Diante do cenário atual, a produção de biodiesel tende a aumentar cada vez mais no decorrer dos próximos anos. Essa situação pode acarretar no acúmulo de glicerol descartado ao meio ambiente pelas indústrias que produzem esse biocombustível. A utilização de glicerol como substrato no tratamento anaeróbio, é sugerida como opção atrativa, pois além de proporcionar a adequação ambiental é também responsável pela recuperação de energia na forma de H_2 e CH_4 , bem como outros subprodutos de elevado valor comercial, visto que os processos de purificação desse resíduo possuem custos elevados, inviabilizando muitas vezes sua utilização em indústria química que exigem alto teor de pureza.

O desenvolvimento e operação de reatores para a produção de H_2 e CH_4 sob condições termofílicas, ainda representam desafios e requerem pesquisas futuras. Sabe-se que do ponto de vista econômico e tecnológico a condição mesofílica é preferível comparada à termofílica. Entretanto, condições termofílicas para a produção de H_2 e CH_4 podem apresentar vantagens no tratamento de águas residuárias lançadas em temperaturas elevadas, como o glicerol bruto,

que por se tratar de um subproduto, deixa a etapa de destilação a altas temperaturas (70 °C), implicando em pouca dependência de energia para o sistema.

A configuração do reator (RALF) e a utilização do inóculo proveniente de lodo metanogênico termofílico de reator UASB utilizado para o tratamento de vinhaça, bem como a aplicação de um resíduo abundante e de baixo custo, vão de acordo com a ideia de redução de custos da planta de tratamento, valorizando a cadeia produtiva do biodiesel. De acordo com a literatura, o RALF apresenta um potencial elevado para a produção de bioenergia e metabólitos em processos biológicos, pois acumula grande quantidade de biomassa no sistema e facilita a transferência de massa entre o substrato e o microrganismo.

Frente à escassez de pesquisas envolvendo a obtenção de bioenergia a partir do tratamento anaeróbio de glicerol em reatores contínuos, este trabalho tem o intuito de contribuir para o desenvolvimento de pesquisas relacionadas com a produção contínua de H₂ e CH₄ sob condições termofílicas, a partir desse resíduo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo estão apresentados os equipamentos e metodologias utilizados durante o desenvolvimento desse trabalho. A abordagem vai desde a configuração do sistema utilizado para a realização do experimento, a caracterização da água residuária (glicerol bruto), a fonte de inóculo para a produção biológica de hidrogênio, metano e metabólitos até os procedimentos da fase de adaptação do inóculo e as condições operacionais dos reatores termofílicos. Apresenta-se ainda o detalhamento e a frequência das análises físico-químicas, e por último, as fórmulas referentes aos indicadores de desempenho para avaliar a produção biológica de hidrogênio e metano.

Para melhor compreensão e praticidade ao longo da apresentação da metodologia e dos respectivos resultados, os reatores foram identificados por siglas:

- RA – RALF acidogênico com concentração afluyente de glicerol bruto de $10,0 \text{ g L}^{-1}$ e TDH variando entre 8 a 0,5 h.
- RM1 – RALF metanogênico com concentração afluyente de glicerol bruto variando entre $1,0$ a $7,0 \text{ g L}^{-1}$ e TDH fixo em 24 h.
- RM2 – RALF metanogênico com concentração afluyente de glicerol bruto de $10,0 \text{ g L}^{-1}$ e TDH variando entre 36 a 6 h.

4.1 REATOR ANAERÓBIO DE LEITO FLUIDIZADO

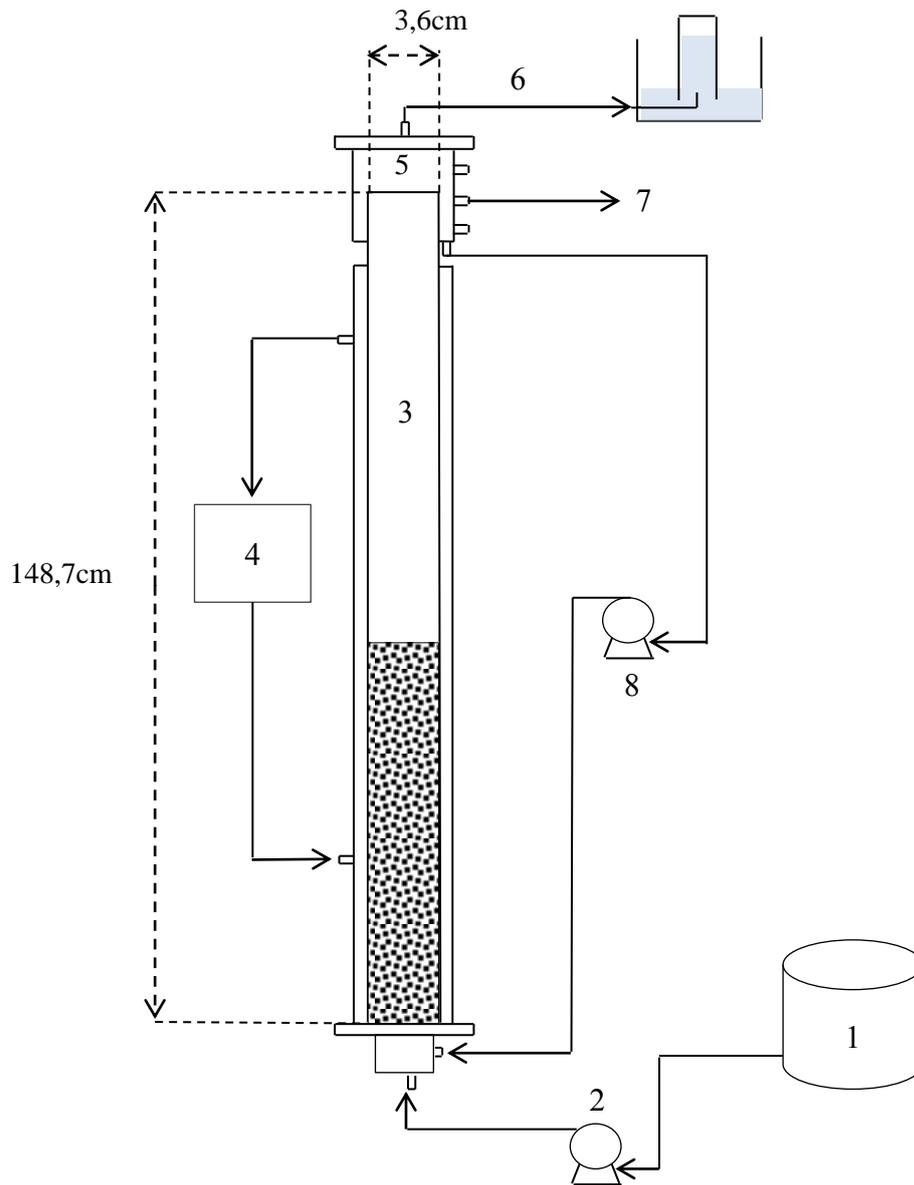
Para a realização desse trabalho foram utilizados três reatores anaeróbios de leito fluidizado construídos em aço inox de 2 mm de espessura, com 148,7 cm de altura, diâmetro interno de 3,6 cm e 1,55 L de capacidade total individual (volume total).

Os reatores possuíam sistema de controle de temperatura por meio de banho ultratermostatizado, operando em faixa termofílica, especificamente a $55 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. A troca de calor para manutenção da temperatura ocorreu por meio de encamisamento na parte exterior e serpentina em formato de “U” no interior do reator, por onde circulava a água proveniente do banho. Na alimentação dos reatores foram utilizadas bombas dosadoras e, para a recirculação, fez-se uso de bomba diafragma.

O esquema do RALF termofílico (configuração idêntica para os três reatores), Figuras 4.1 e 4.2, apresenta a composição do sistema: (1) tanque de água residuária (afluyente), (2)

bomba de alimentação do afluente¹, (3) reator de leito fluidizado, (4) banho ultratermostatizado², (5) compartimento de separação gás-líquido, (6) saída para medição e análise de gases, (7) saída do efluente e (8) bomba de recirculação³.

Figura 4.1 – Instalação experimental (modo contínuo) do RALF.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

¹ RA - Bomba dosadora ETATRON, modelo DLX – MA/AD. Vazão_{máxima}: 8 L h⁻¹. Pressão: 10 bar; RM1 e RM2 - Bomba dosadora EXATTA, modelo EX 00504. Vazão_{máxima}: 0,5 L h⁻¹. Pressão: 4 bar.

² Banho ultratermostatizado Marconi, modelo MA-184.

³ Bomba de recirculação ECOSAN. Vazão: 10 a 200 L h⁻¹. Pressão: 6 kg cm⁻².

Figura 4.2 – Reator anaeróbio de leito fluidizado termofílico.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

4.2 MATERIAL SUPORTE

Os materiais suporte usados para imobilização e adesão da biomassa foram: argila expandida – cinasita utilizada no RA e pneu triturado no RM1 e RM2, mostrados na Figura 4.3. A justificativa para a escolha da cinasita como material suporte para o RA foi devido aos trabalhos realizados pelo grupo de pesquisa do LCAII/DEQ/UFSCar (BARROS et al. 2010 e BARROS et al. 2012), os quais relataram elevado rendimento de hidrogênio e maior quantidade de biomassa aderida, ao utilizar argila expandida quando comparado a outros materiais suporte, como poliestireno, polietileno e pneu triturado. Para o RM1 e RM2 foi definido o pneu triturado como material suporte, pois o mesmo mostrou-se eficiente em trabalhos como Niciura (2005). Foi utilizada 364,5 g de cinasita, proporcionando altura inicial de 50 cm de leito fixo no RA e 207,1 g de pneu triturado, proporcionando altura inicial de 40 cm de leito fixo no RM1 e RM2.

Figura 4.3 – (A) Partículas de argila expandida (cinasita) utilizadas no RA. (B) Partículas de pneu triturado utilizadas no RM1 e RM2.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

A granulometria das partículas não uniformes de cinasita e pneu foi conseguida pelo peneiramento desses materiais. Após essa seleção, a cinasita foi imersa em água e as partículas com densidade superior a densidade da água foram selecionadas e secas em estufa a 55 °C. Já as partículas de pneu foram mergulhadas em hidróxido de sódio a $7,4 \cdot 10^{-3}$ M, por cerca de 30 minutos, em seguida lavadas com água e secas em estufa a 40 °C, com o objetivo de eliminar os resíduos de óleo encontrados nesse material (BARROS, 2009). Estes procedimentos realizados para a cinasita e para o pneu foram executados três vezes.

As condições fluidodinâmicas dos reatores, tais como velocidade mínima de fluidização e vazão de recirculação para os materiais suporte, foram calculadas a partir de dados experimentais de velocidade superficial e perda de carga descritas por Amorim (2009) para a argila expandida (cinasita) e Barros (2009) para o pneu triturado. As características destes materiais suporte estão apresentadas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Características físicas dos materiais suporte.

Partícula	D_p (mm)	ρ_p (g.cm ⁻³)	Porosidade (%)	V_{mf} (cm.s ⁻¹)
Argila expandida (cinasita)	2,8 – 3,35	1,5	23	1,24
Pneu triturado	2,8 – 3,35	1,14	18	1,18

D_p : Diâmetro da partícula; ρ_p : Densidade da partícula

Fonte: AMORIM et al. (2009); BARROS et al. (2010); BARROS et al. (2012).

A vazão de recirculação nos reatores termofílicos foi mantida em $60,6 \text{ L h}^{-1}$ no RA e $57,6 \text{ L h}^{-1}$ no RM1 e RM2, ambos com expansão de 30% e velocidade superficial 1,30 vez a velocidade mínima de fluidização.

4.3 ÁGUA RESIDUÁRIA

O substrato utilizado como fonte de carbono neste trabalho foi o glicerol bruto. Tal glicerol, bidestilado, é proveniente da indústria Biobrotas Oleoquímica, localizada no município de Brotas – SP. As concentrações afluente de glicerol aplicadas aos reatores serão detalhadas nos tópicos subsequentes. As características da solução preparada de glicerol bruto, utilizada no presente trabalho, são mostradas na Tabela 4.2. Tem-se que a concentração de $1,0 \text{ g L}^{-1}$ de glicerol equivale a aproximadamente $1,07 \text{ g DQO L}^{-1}$, portanto, as taxas de carregamento orgânico (TCO) aplicadas na unidade glicerol e DQO são consideradas equivalentes.

Tabela 4.2 – Caracterização da solução de glicerol bruto ($\sim 5,0 \text{ g L}^{-1}$).

Parâmetros	Glicerol Bruto (mg L^{-1})
Teor de Glicerol (%)	82,6
DQO	5330
Carbono Orgânico Total	Não Medido
Cobre	0,005
Zinco	0,2
Magnésio	0,3
Cálcio	363,3
Potássio	3,0
Fosfato	2,5
Metanol	33,6
Nitrogênio Kjeldahl	73,0

Fonte: PARANHOS (2016).

4.4 MEIO NUTRICIONAL

Durante a operação do RALF acidogênico e dos RALF metanogênicos, o sistema foi alimentado com água residuária sintética composta por glicerol além de meio nutricional com objetivo de suprir as necessidades metabólicas dos microrganismos. A alimentação do RA foi composta pela adição de meio nutricional proposto por Barbirato et al. (1995) e solução de elementos traços (SL7), proposta por Biebl & Pfennig (1981), na concentração de 2,0 mL SL7 L_{afluente}^{-1} . Os componentes do meio nutricional estão listados na Tabela 4.3 e a SL7 é apresentada na Tabela 4.4.

Tabela 4.3 – Composição do meio nutricional adicionado ao RA.

Composto	Concentração ($g L^{-1}$)
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	3,4
KH_2PO_4	1,3
$(NH_4)_2SO_4$	2,0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,02
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,005

Fonte: BARBIRATO et al. (1995).

Tabela 4.4 – Composição da solução de elementos traços (SL7) adicionada ao RA.

Composto	Concentração ($mg L^{-1}$)
$ZnCl_2$	70,0
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	100,0
$H_3BO_3 \cdot 6H_2O$	60,0
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	200,0
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	20,0
$NiCl_2 \cdot 6H_2O$	20,0
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	40,0
HCl (25%, v/v)	1 mL

Fonte: BIEBL & PFENNIG (1981).

Nos reatores RM1 e RM2 houve adição de solução adicional com nutrientes, proposta por Del Nery (1987), apresentada na Tabela 4.5.

Tabela 4.5 – Composição da solução de nutrientes adicionada ao RM1 e RM2.

Composto	Concentração (mg L⁻¹)
CH ₄ N ₂ O	125,0
NiSO ₄ .6H ₂ O	1,0
FeSO ₄ .7H ₂ O	5,0
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,5
CaCl ₂ .2H ₂ O	47,0
CoCl ₂	0,08
SeO ₂	0,07
KH ₂ PO ₄	85,0
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	21,7
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	33,4

Fonte: adaptada de DEL NERY (1987).

4.5 INÓCULO

A fonte de inóculo utilizada para a partida operacional dos RALF termofílicos foi proveniente de lodo metanogênico termofílico de reator anaeróbico de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB) utilizado para o tratamento de vinhaça, localizado na Usina São Martinho (Pradópolis – SP).

A fim de se obter culturas produtoras de hidrogênio, no RA foi realizado o método de pré-tratamento térmico da biomassa proposto por Kim et al. (2006) promovendo a supressão da metanogênese, por meio da eliminação de células vegetativas metanogênicas e favorecendo a permanência de células acidogênicas por meio da formação de endósporos.

Nos reatores RM1 e RM2, cujo objetivo é produzir metano, o lodo utilizado como inóculo não foi submetido ao pré-tratamento, pois a presença dos microrganismos metanogênicos é desejada para que o processo de digestão anaeróbia ocorra de maneira efetiva.

4.6 FASE DE ADPTAÇÃO DO INÓCULO

O procedimento de adaptação do inóculo ao glicerol nos RALF termofílicos teve início com a etapa de inoculação do sistema. Os barriletes contendo o afluente foram constituídos de glicerol bruto e do meio nutricional em concentrações previamente estabelecidas, e do inóculo na concentração de 10% (v/v).

Para o RA, o barrilete foi inicialmente preparado adicionando-se o glicerol em concentração de $2,0 \text{ g L}^{-1}$ e o pH foi ajustado entre 4,5 e 5,0. Este valor foi alcançado mediante a adição de HCl (30% v/v), sendo adicionado o valor máximo de 2 mL HCl L^{-1} , além de ácido acético puro (CH_3COOH), se necessário, a fim de manter o pH nesse intervalo, ideal ao desenvolvimento dos microrganismos acidogênicos e limitante aos metanogênicos.

No RM1, a concentração de glicerol no barrilete foi mantida em $1,0 \text{ g L}^{-1}$ e o pH foi ajustado entre 7,5 e 8,5 adicionando-se NaHCO_3 na relação de $1,0 \text{ g NaHCO}_3 \text{ g}^{-1} \text{ glicerol L}^{-1}$. Para o RM2, o barrilete foi inicialmente preparado com glicerol em concentração de $2,0 \text{ g L}^{-1}$ e o pH foi ajustado pelo mesmo procedimento do RM1.

Após a conexão dos barriletes aos respectivos reatores, estes foram operados inicialmente em modo batelada com recirculação do efluente, sendo RA e RM2 operados por 28 dias e RM1 por 5 dias. Este procedimento inicial foi necessário para garantir a adesão da biomassa ao material suporte bem como a adaptação do inóculo ao glicerol. Durante o período em sistema fechado, diferentes concentrações de glicerol ($2,0$; $3,5$; $5,0$ e $7,5 \text{ g L}^{-1}$) foram aplicadas em RA e RM2, sendo que a concentração era aumentada sempre que o consumo de glicerol era de cerca de 80% do introduzido inicialmente. No RM1 adotou-se outra estratégia para a inoculação, a concentração de glicerol no barrilete foi mantida constante em $1,0 \text{ g L}^{-1}$ e houve reposição do lodo sempre que o consumo de glicerol era de cerca de 80%, procedimento este necessário pra evitar o acúmulo de ácidos voláteis durante a inoculação.

Durante o período de inoculação, a concentração de glicerol foi periodicamente monitorada e o pH foi medido de maneira intermitente, sendo realizadas diariamente análises de alcalinidade bicarbonato (AB) e ácidos graxos voláteis (AGV) nos reatores RM1 e RM2. 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 apresentadas todas as condições impostas aos reatores para alcançar os objetivos propostos. Em cada reator foi avaliado um aspecto operacional, seja ele o TDH ou a concentração de glicerol aplicada. O período em que determinado aspecto operacional era avaliado se denomina fase. A mudança de fase era executada quando fosse percebida a estabilidade nos parâmetros de produção de hidrogênio ou metano (composição, rendimento, produção volumétrica) e consumo de substrato.

4.7.1 RALF acidogênico – RA

O RA foi operado mantendo a concentração afluente de glicerol constante em $10,0 \text{ g L}^{-1}$ e o pH efluente entre 4,5 e 5,5. O controle do pH afluente foi realizado mediante a adição de HCl (30% v/v), sendo o máximo acrescentado estabelecido em 2 mL L^{-1} , além de $\text{CH}_3\text{COOH P.A.}$, se necessário, a fim de manter o pH efluente nesse intervalo. Neste reator foi avaliada a produção de hidrogênio e metabolitos solúveis em diferentes tempos de detenção hidráulica (TDH), os quais foram reduzidos de 8 a 0,5 h. A justificativa para a escolha dessa faixa de TDH para a operação do RA se deu devido aos estudos envolvendo a produção de hidrogênio em RALF no grupo de pesquisa do LCAII/DEQ/UFSCar (AMORIM et al., 2009; SHIDA et al., 2009; REIS et al., 2011; SANTOS et al., 2014c), os quais relatam elevadas produtividades e rendimentos de H_2 , nesta faixa de TDH aplicada. Os TDH e TCO aplicados estão descritos na Tabela 4.6.

Tabela 4.6 – Condições operacionais do RA.

Fase	TDH (h)	TCO ($\text{kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$)
1	8	30,0
2	6	40,0
3	4	60,0
4	2	120,0
5	1	240,0
6	0,5	480,0

Concentração afluente de glicerol = $10,0 \text{ g L}^{-1}$

Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

4.7.2 RALF metanogênico – RM1

A concentração de glicerol no afluente do RM1 sofreu variação de 1,0 a 7,0 g L⁻¹ e o pH efluente entre 7,0 a 8,0. O controle do pH afluente se deu pela adição de NaHCO₃, na relação de 1,0 g NaHCO₃ g⁻¹ glicerol L⁻¹. Neste reator foi avaliada a produção de metano em TDH fixo de 24 h, variando-se a TCO'. A justificativa para a escolha do TDH de 24 h para a operação do RM1 se deu devido ao trabalho realizado pelo grupo de pesquisa do LCAII/DEQ/UFSCar (SIQUEIRA et al., 2013), o qual relatou a operação sob elevadas TCO' na degradação anaeróbia da vinhaça em RALF. As concentrações de glicerol e TCO' aplicadas são descritos na Tabela 4.7.

Tabela 4.7 – Condições operacionais do RM1.

Fase	Glicerol (g L ⁻¹)	TCO' (kg DQO m ⁻³ d ⁻¹)
1	1,0	1,0
2	2,0	2,0
3	3,0	3,0
4	4,0	4,0
5	5,0	5,0
6	7,0	7,0

TDH = 24 h

Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

4.7.3 RALF metanogênico – RM2

O afluente do RM2 foi mantido a concentração de glicerol constante em 10,0 g L⁻¹ e o pH efluente entre 7,0 a 8,0. O controle do pH afluente se deu pela adição de NaHCO₃, na relação de 0,7 g NaHCO₃ g⁻¹ glicerol L⁻¹. Neste reator foi avaliada a produção de metano em diferentes TDH, os quais foram reduzidos de 36 a 6 h. Os TDH e TCO' aplicados são descritos na Tabela 4.8.

Tabela 4.8 – Condições operacionais do RM2.

Fase	TDH (h)	TCO' (kg DQO m ⁻³ d ⁻¹)
1	36	6,7
2	30	8,0
3	24	10,0
4	18	13,3
5	12	20,0
6	6	40,0

Concentração afluyente de glicerol = 10,0 g L⁻¹

Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

4.8 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.8.1 Determinação da Concentração de Glicerol

A quantificação de glicerol no afluyente e efluyente dos reatores foi determinada por meio de metodologia adaptada pela técnica espectrofotométrica proposta por Bondioli e Della Bella (2005).

4.8.2 Análises Físico-Químicas

As medidas de pH, demanda química de oxigênio (DQO), sólidos suspensos voláteis (SSV) e totais (SST), foram realizadas com base no *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (1998).

4.8.3 Medida de produção volumétrica de biogás

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

4.8.4 Composição do Biogás

A análise para determinação dos componentes presentes no biogás produzido foi realizada por Cromatografia Gasosa. Para tanto, 1,0 mL de amostra do biogás foi coletada no topo dos reatores utilizando-se uma seringa *gas tight*. O gás coletado foi analisado em cromatógrafo gasoso marca Shimadzu modelo GC-2010, Japan, equipado com detector de condutividade térmica (TCD) e coluna capilar Carboxen 1010 PLOT (30 m x 0,53 mm) Sigma-Aldrich, sendo o argônio utilizado como gás de arraste.

As condições cromatográficas que serão utilizadas encontram-se descritas:

- Temperatura do injetor: 220 °C
- Temperatura do detector: 230 °C
- Temperatura da coluna: 130 °C
- Fluxo do gás de arraste (Ar): 5,66 mL min⁻¹

4.8.5 Monitoramento de Ácidos Graxos Voláteis e Alcalinidade Bicarbonato

As análises de ácidos graxos voláteis (AGV) foram realizadas de acordo com a metodologia proposta por DiLallo e Albertson (1961) e a determinação de alcalinidade bicarbonato (AB) feita conforme metodologia modificada de Ripley et al (1986).

4.8.6 Determinação de Álcoois e Ácidos Orgânicos Voláteis

A determinação e quantificação de álcoois e ácidos orgânicos voláteis foi realizada por Cromatografia Gasosa, segundo método por *headspace*, com sistema acoplado amostrador automático de injeção de amostras. O gás coletado do *headspace* foi analisado em cromatógrafo gasoso marca Shimadzu, modelo GC-17A equipado com detector de ionização por chama (FID, *Flame Ionization Detector*) e coluna capilar DB-WAX (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⁻¹ 42°C (0') 20 °C min⁻¹ 75 °C (0') 35 °C min⁻¹ 120 °C (1') 10 °C min⁻¹ 170 °C (2').
- Temperatura do Injetor: 250 °C
- Temperatura do Detector: 280 °C
- Razão de Split: 10,0

- Fluxo do gás de arraste (H_2): 50 mL min^{-1}
- Fluxo do make-up ou gás auxiliar (N_2): 35 mL min^{-1}
- Fluxo do gás de chama (Ar sintético): 500 mL min^{-1}
- Fluxo da coluna: $1,56 \text{ mL min}^{-1}$
- Velocidade linear: $34,3 \text{ cm s}^{-1}$

4.9 FREQUÊNCIA DAS ANÁLISES

A pesquisa foi dividida em fases operacionais, conforme a diminuição do TDH aplicado ao RA e RM1 e aumento da concentração de glicerol no RM2, de acordo com as especificações abordadas nos itens anteriores. Ao longo do procedimento operacional dos reatores termofílicos, foram realizadas análises para o monitoramento dos mesmos. A Tabela 4.9 apresenta a frequência de coleta e análise de amostras para todas as fases deste estudo.

Tabela 4.9 – Frequência de análises de monitoramento dos reatores ao longo da realização do experimento.

Análise	Frequência		Metodologia/Equipamento
	RA	RM1 e RM2	
Vazão Efluente	Diária	Diária	-
pH	Diária	Diária	Standard Methods for
DQO	3x semana	3x semana	Examination of Water and
Sólidos Suspensos _(totais, fixos e voláteis)	3x semana	3x semana	Wastewater (1998)
Concentração de Glicerol	3x semana	3x semana	Bondioli e Della Bella (2005)
Ácidos Orgânicos e Álcoois	3x semana	3x semana	Shimadzu GC-17A
Conteúdo do Biogás _(H_2, CH_4 e CO_2)	3x semana	3x semana	Shimadzu GC-2010
Produção do Biogás	3x semana	3x semana	Walker et al. (2009)
Alcalinidade Bicarbonato (AB)	-	Diária	Ripley et al. (1986)
Ácidos Graxos Voláteis (AGV)	-	Diária	DiLallo e Albertson (1961)

Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

4.10 CÁLCULO DOS PRINCIPAIS INDICADORES DE DESEMPENHO

Este item apresenta as principais fórmulas utilizadas para a análise desse estudo, os quais abrangem a taxa de carregamento orgânico aplicada teórica (1), a taxa de carregamento orgânico removida (2), a produção volumétrica de H₂/CH₄ (3), o rendimento de H₂/CH₄ em mol de glicerol consumido (4), o rendimento de CH₄ em kg de DQO aplicada (5), a produção volumétrica de 1,3-PDO (6), o rendimento de 1,3-PDO em mol de glicerol consumido (7) e o rendimento de 1,3-PDO em grama de glicerol consumido (8).

$$(1) \text{TCO}_{\text{aplicada teórica}} = \left[\frac{\text{Concentração de Glicerol (kg m}^{-3}\text{)}}{\text{TDH}_{\text{teórico}}(\text{d})} \right] \quad \text{kg m}^{-3} \text{d}^{-1}$$

$$(2) \text{TCO}_{\text{removida}}' = \left[\frac{\text{DQO}_{\text{aflu}} (\text{kg DQO m}^{-3}) * X_A}{\text{TDH}_{\text{teórico}}(\text{d})} \right] \quad \text{kg DQO m}^{-3} \text{d}^{-1}$$

onde: X_A é a remoção de DQO

$$(3) \text{PVH/PVM} = \left[\frac{\text{Volume de H}_2/\text{CH}_4(\text{L})\text{produzido}}{\text{tempo}(\text{h})} \right] \quad \text{L h}^{-1} \text{L}^{-1}$$

$$(4) \text{HY/MY}' = \left[\frac{\text{PVH/PVM (mol H}_2/\text{CH}_4 \text{ d}^{-1} \text{m}^{-3})}{\text{Glicerol}_{\text{consumido}}(\text{mol}_{\text{gli.}} \text{d}^{-1} \text{m}^{-3})} \right] \quad \text{mol mol}^{-1} \text{ glicerol}_{\text{consumido}}$$

$$(5) \text{MY} = \left[\frac{\text{PVM (m}^3 \text{CH}_4 \text{ d}^{-1} \text{m}^{-3})}{\text{DQO}_{\text{aplicada}}(\text{kg DQO d}^{-1} \text{m}^{-3})} \right] \quad \text{m}^3 \text{CH}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ DQO}_{\text{aplicada}}$$

$$(6) \text{PV}_{1,3} - \text{PD} = \left[\frac{\text{Concentração de 1,3-PDO (g L}^{-1}\text{) produzido}}{\text{TDH}_{\text{teórico}}(\text{h})} \right] \quad \text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$$

$$(7) 1,3 - \text{PDY} = \left[\frac{\text{Concentração de 1,3-PDO (mol L}^{-1}\text{) produzido} * \text{Vazão média}_{\text{reator}}(\text{L d}^{-1})}{\text{Glicerol}_{\text{consumido}}(\text{mol}_{\text{gli.}} \text{d}^{-1})} \right]$$

mol 1,3 - PDO mol⁻¹ glicerol_{consumido}

$$(8) 1,3 - \text{PDY}' = \left[\frac{1,3 - \text{PDY}(\text{mol 1,3-PDO mol}^{-1} \text{ glicerol}_{\text{consumido}}) * M_{1,3 - \text{PDO}}(\text{g}_{1,3 - \text{PDO}} \text{ mol}^{-1})}{M_{\text{Glicerol}}(\text{g}_{\text{gli.}} \text{ mol}^{-1})} \right]$$

g 1,3 - PDO g⁻¹ glicerol_{consumido}

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste item serão apresentados os resultados obtidos e a interpretação dos parâmetros analisados na operação dos três RALF termofílicos (RA, RM1 e RM2) utilizados no presente estudo para produção de hidrogênio e metano.

5.1 RALF ACIDOGÊNICO – RA

Neste tópico estão descritos os aspectos relativos à produção de H₂ em temperatura termofílica (55 °C) utilizando glicerol bruto como substrato orgânico. A operação do RA foi realizada mantendo a concentração afluente de glicerol constante em 10,0 g L⁻¹ em seis fases operacionais, conforme exposto na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 – Descrição das fases de operação do RA e suas características.

Fase	TDH (h)	TCO (kg m ⁻³ d ⁻¹)	Vazão (mL h ⁻¹)	Tempo de Operação (dia)
1	8	30,0	194,0	43
2	6	40,0	258,6	23
3	4	60,0	387,9	38
4	2	120,0	775,8	38
5	1	240,0	1551,7	29
6	0,5	480,0	3103,3	26

Concentração afluente de glicerol = 10,0 g L⁻¹

Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

5.1.1 Consumo de glicerol

As conversões médias de glicerol em cada fase operacional do RA são apresentadas na Tabela 5.2 e na Figura 5.1. A redução do TDH de 8 para 0,5 h acarretou em aumento da TCO de 30,0 para 480,0 kg m⁻³ d⁻¹, o que refletiu no consumo de glicerol. De acordo com a Figura 5.1 é possível observar que houve estabilidade no consumo de glicerol (21,9 ± 2,4 a 27,4 ± 1,5%) com a redução do TDH de 8 para 2 h, seguido por um ligeiro declínio (16,2 ± 2,1 e 14,1 ± 2,2%), quando o TDH foi reduzido para 1 e 0,5 h.

Tabela 5.2 – Concentrações e conversões médias de glicerol no RA.

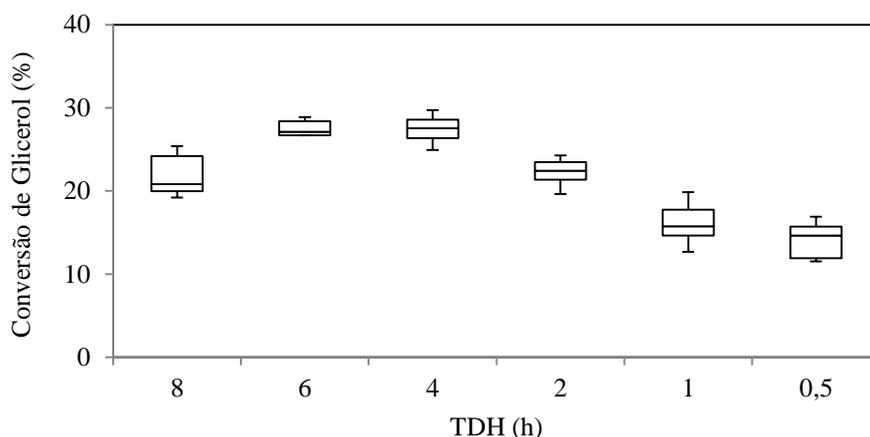
Fase	TDH (h)	TCO ($\text{kg m}^{-3} \text{d}^{-1}$)	G_{aflu} (g L^{-1})	G_{eflu} (g L^{-1})	Conversão (%)
1	8	30,0	$9,69 \pm 0,41^{(14)}$	$7,57 \pm 0,36^{(14)}$	$21,9 \pm 2,4^{(14)}$
2	6	40,0	$9,11 \pm 0,38^{(10)}$	$6,67 \pm 0,33^{(10)}$	$26,8 \pm 2,1^{(10)}$
3	4	60,0	$9,53 \pm 0,36^{(10)}$	$6,92 \pm 0,21^{(10)}$	$27,4 \pm 1,5^{(10)}$
4	2	120,0	$9,43 \pm 0,29^{(10)}$	$7,32 \pm 0,20^{(10)}$	$22,3 \pm 1,5^{(10)}$
5	1	240,0	$9,61 \pm 0,63^{(15)}$	$8,05 \pm 0,50^{(15)}$	$16,2 \pm 2,1^{(15)}$
6	0,5	480,0	$10,26 \pm 0,87^{(10)}$	$8,80 \pm 0,62^{(10)}$	$14,1 \pm 2,2^{(10)}$

G_{aflu} : glicerol afluyente; G_{eflu} : glicerol efluente.

Os números entre parênteses referem-se ao número de amostras utilizadas para média.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

Figura 5.1 – Boxplot das conversões de glicerol no RA.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

Dessa forma, uma hipótese que pode ser levantada para os baixos consumos de glicerol verificados ao longo do experimento, é o efeito da temperatura termofílica e o acúmulo de metabólitos dissolvidos produzidos ao longo da operação. Fazendo um paralelo com os trabalhos de Ferreira (2014) e Bosio (2014) realizados no LCAII/DEQ/UFSCar, que avaliaram a produção de H_2 em RALF termofílico ($55\text{ }^\circ\text{C}$) e mesofílico ($30\text{ }^\circ\text{C}$), respectivamente, ambos variando o TDH entre 14 a 1 h e mantendo a concentração afluyente de glicerol em $5,0\text{ g L}^{-1}$, observou-se que o RALF mesofílico apresentou ao longo de sua operação conversões de glicerol variando de $91,0 - 37,0\%$, sendo esses valores superiores aos encontrados no RALF termofílico ($55,4 - 15,8\%$). Vale destacar que o glicerol utilizado pelas autoras possuía pureza de $64,3\%$.

Uma possível explicação para este comportamento é o efeito da temperatura promover uma seleção de microrganismos capazes de converter o glicerol em determinado produto, porém devido à elevada temperatura proporcionada pela condição termofílica a taxa de crescimento desses microrganismos pode ser baixa, ao contrário do que pode ocorrer sob condição mesofílica, em que a taxa de crescimento desses microrganismos pode ser alta. Sendo necessária uma análise de biologia molecular, para a confirmação desta afirmação.

A fonte de carbono e a concentração afluyente do substrato também desempenham um papel importante no crescimento dos microrganismos e no rendimento dos produtos (KUMAR et al., 2011). Uma possível explicação para o comportamento do RA é o efeito denominado inibição pelo substrato e, como consequência, inibição por retroalimentação 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.

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.

De forma similar ao observado neste estudo, Mangayil et al. (2012) verificaram conversão de 27,2% com o aumento da concentração de glicerol bruto para 5,0 g L⁻¹ em ensaios batelada (37 °C). Valor este próximo aos apresentados nesta pesquisa, porém sob concentração de glicerol inferior.

Conversão incompleta de glicerol também foi verificada por Maru et al. (2013), que avaliaram o efeito da concentração de glicerol (2,5 a 40,0 g L⁻¹) em ensaio descontínuo (80 °C). Verificaram-se conversões de glicerol variando entre 82,9 a 10,4% e 91,6 a 14,2%, utilizando *T. maritima* e *T. neapolitana*, respectivamente, ao longo do aumento da concentração de glicerol.

Chookaew et al. (2014) observaram no geral uma diminuição da taxa de conversão de glicerol com a diminuição do TDH aplicado (12 – 2 h) em reator UASB (40 °C). Na concentração de 10 g L⁻¹ de glicerol bruto, a máxima conversão observada foi de 97,3% (TDH de 12 h) e a mínima conversão um pouco superior a 40% (no TDH de 2 h). Estes valores foram superiores aos encontrados nesta pesquisa sob a mesma concentração de glicerol bruto (10 g L⁻¹).

Dounavis et al. (2015) operando um reator UFCB (35 °C), na concentração de glicerol de 10 g L⁻¹ e TDH de 36 h, verificaram consumo máximo de glicerol de 96,1%. O menor valor de conversão de glicerol obtido neste estudo foi de 70,3%, na concentração de glicerol de 20 g L⁻¹ e TDH de 48h. Verifica-se que estes resultados foram superiores às conversões obtidas pelo RA durante toda a operação, entretanto os autores adotaram como estratégia de operação a utilização de elevados TDH.

Paranhos (2016) também observou conversões semelhantes às obtidas no RA, porém em TDH superiores aos aplicados no presente estudo. A autora operou dois RALF (30 °C), utilizando glicerol bruto (RGB) e glicerina pura (RGP) nas concentrações de 26,45 e 13,22 g L⁻¹, respectivamente. Variando o TDH entre 36 – 12 h, verificou-se que houve uma estabilidade no consumo de glicerol (17,2 – 24,3%) nos três primeiros TDH de operação do RGB, seguido por um declínio no TDH de 12 h, com valor de 8,1%. O RGP apresentou comportamento semelhante, o consumo de glicerol variou entre 22,6 – 39,8% nos três primeiros TDH (36 - 28), com diminuição para 7,7% no TDH de 12 h.

Rodrigues et al. (2016) operando reatores em batelada (37 °C), em concentração de glicerol de 10,0 g L⁻¹, utilizando como inóculo lodo granular de reator UASB termofílico utilizado no tratamento da vinhaça, obtiveram conversão de glicerol de 26,9%. Os autores concluíram que a presença de impurezas no glicerol bruto provavelmente causou inibição no crescimento microbiano, interferindo nas vias metabólicas, ocasionando o baixo consumo de glicerol bruto.

5.1.2 Composição do biogás

A composição do biogás produzido pelo RA em função do TDH aplicado ao mesmo, restringiu-se aos componentes H₂ e CO₂, o que ressalta a efetividade do pré-tratamento térmico aplicado ao inóculo, associado a outros fatores operacionais como o baixo pH e aplicação de elevadas TCO, para o não estabelecimento dos microrganismos metanogênicos, responsáveis pelo consumo de H₂ no sistema. A composição de H₂ obtida no biogás

produzido pelo RA manteve-se constante e elevada, com valores médios entre $66,1 \pm 1,9$ a $78,5 \pm 3,2\%$ durante as fases operacionais, de acordo com exposto na Tabela 5.3 e Figura 5.2.

Tabela 5.3 – Composição dos componentes do biogás produzido pelo RA.

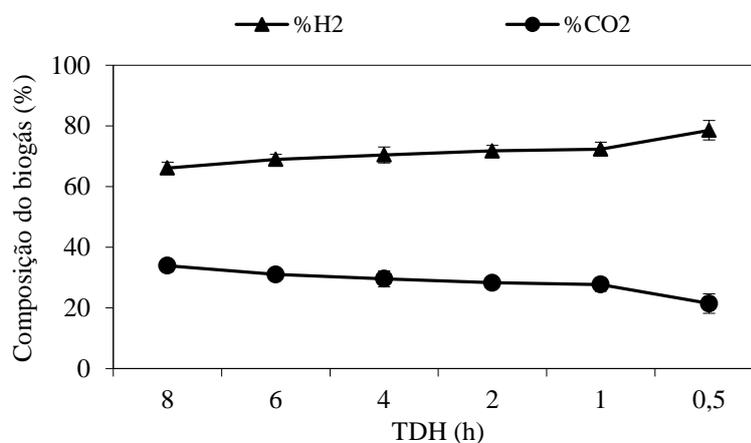
Fase	TDH (h)	TCO ($\text{kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$)	C_{H_2} (mmol L^{-1})	C_{CO_2} (mmol L^{-1})	H_2 (%)	CO_2 (%)
1	8	30,0	$7,64 \pm 1,00^{(16)}$	$3,94 \pm 0,60^{(16)}$	$66,1 \pm 1,9^{(16)}$	$33,9 \pm 1,9^{(16)}$
2	6	40,0	$8,55 \pm 1,98^{(16)}$	$3,93 \pm 1,19^{(16)}$	$69,0 \pm 1,7^{(16)}$	$31,0 \pm 1,7^{(16)}$
3	4	60,0	$8,37 \pm 1,64^{(18)}$	$3,61 \pm 1,13^{(18)}$	$70,4 \pm 2,6^{(18)}$	$29,6 \pm 2,6^{(18)}$
4	2	120,0	$8,68 \pm 1,82^{(18)}$	$3,48 \pm 0,98^{(18)}$	$71,7 \pm 1,8^{(18)}$	$28,3 \pm 1,8^{(18)}$
5	1	240,0	$8,75 \pm 0,42^{(12)}$	$3,36 \pm 0,32^{(12)}$	$72,3 \pm 2,2^{(12)}$	$27,7 \pm 2,2^{(12)}$
6	0,5	480,0	$9,30 \pm 0,86^{(11)}$	$2,59 \pm 0,62^{(11)}$	$78,5 \pm 3,2^{(11)}$	$21,5 \pm 3,2^{(11)}$

C_{H_2} : concentração de H_2 no biogás; C_{CO_2} : concentração de CO_2 no biogás.

Os números entre parênteses referem-se ao número de amostras utilizadas para média.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

Figura 5.2 – Composição do biogás produzido pelo RA em relação ao TDH aplicado.



Obs.: As linhas que ligam os pontos no gráfico foram utilizadas para melhor orientação visual.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

Analisando a Figura 5.2, constata-se que os valores do conteúdo de H_2 no biogás foram estáveis e com ligeiro aumento quando o TDH foi variado entre 8 e 1 h. Porém, com a redução do TDH para 0,5 h a fração molar de hidrogênio no biogás foi favorecida, apresentando valor máximo de $78,5 \pm 3,2\%$. Essa tendência de aumento do conteúdo de H_2 com a redução do TDH também foi observada na literatura para RALF (LIN et al., 2006;

AMORIM et al., 2009; BARROS et al., 2010; BARROS et al., 2011; FERREIRA, 2014; RAMOS et al., 2016).

No presente trabalho, o elevado conteúdo de hidrogênio constatado durante a operação do RA pode ser justificado pelo favorecimento da rota de produção do ácido butírico e/ou via oxidativa de fermentação do glicerol, visto que este composto foi obtido em concentrações elevadas nesse reator (descrição detalhada no item 5.1.5).

De forma a argumentar o resultado obtido, ressalta-se que para a formação de 1 mol de ácido butírico, 4 mol de H_2 são formados (equação 5 – item 3.6) e que os maiores rendimentos de produção de hidrogênio estão associados com a geração de ácido acético e butírico.

Por outro lado, alguns pesquisadores reportaram resultados próximos ao presente trabalho, em diferentes configurações de reatores, a partir de glicerol como substrato orgânico.

Selembo et al. (2009), comparando a produção de H_2 e 1,3-Propanodiol a partir de glicerol puro e bruto, ambos na concentração de $3,0 \text{ g L}^{-1}$, em ensaios em batelada ($30 \text{ }^\circ\text{C}$), verificaram que o maior percentual de H_2 no biogás foi obtido com o glicerol bruto do que com a glicerina pura (61% vs. 53%), após 18 h de fermentação.

De forma similar ao observado neste estudo, Lo et al. (2013), operando um reator CSTR ($35 \text{ }^\circ\text{C}$), verificaram que quando se utilizou glicerol bruto (10 g L^{-1}) em TDH de 12 h, o percentual de H_2 obtido foi em torno de 75%. O elevado percentual de H_2 atingido, próximo ao obtido neste trabalho sob condições termofílicas, pode ser justificado pelas condições operacionais adotadas, já que, para os autores, estas foram condições ótimas para a produção de hidrogênio.

Em condições mesofílicas, Reungsang et al. (2013) obtiveram em reator UASB ($37 \text{ }^\circ\text{C}$), utilizando glicerol puro e bruto ($25,0 \text{ g L}^{-1}$), conteúdo de H_2 máximo de 37,1% para o glicerol puro e de 24,2% para o glicerol bruto na TCO de $50,0 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. Chookaew et al. (2014) avaliaram a produção de H_2 a partir de glicerol bruto ($10 - 30 \text{ g L}^{-1}$) por meio de *Klebsiella* sp. TR17, com variação de TDH entre 12 – 2 h. Os autores obtiveram máximo conteúdo de H_2 no biogás (45%), que foi constante entre os TDH de 8 e 2 h.

Ao utilizarem glicerol bruto ($10 - 25 \text{ g L}^{-1}$) como fonte de carbono, Dounavis et al. (2015) sob condições mesofílicas ($35 \text{ }^\circ\text{C}$) em reator UFCB, variando o TDH entre 36 – 24 h, constataram que a composição de hidrogênio no biogás foi levemente afetada pelas mudanças operacionais, variando de 40,2 a 45,2%.

Poucos trabalhos na literatura relatam a produção de hidrogênio a partir de glicerol em reatores contínuos e menor ainda é a quantidade de trabalhos que abordam esse assunto sob

condições termofílicas. O trabalho de Ferreira (2014) realizado no LCAII/DEQ/UFSCar aborda esse assunto utilizando reator RALF em condições termofílicas (55 °C) e TDH variando de 14 a 1 h. A autora relata estabilidade no conteúdo de H₂ no biogás em torno de 60%, em todas as fases de operação do reator, tendo seu valor mínimo no TDH de 10 h (50%) e máximo no TDH de 1 h (70%).

Confrontando-se os valores de composição de H₂ no biogás em sistemas mesofílicos e termofílicos pode-se notar valores superiores para estes últimos, pois assim como cita O-Thong et al. (2009), há favorecimento termodinâmico, o que aumenta as reações químicas e biológicas.

5.1.3 Produção volumétrica de hidrogênio

Os valores obtidos neste estudo de produção volumétrica de hidrogênio (PVH) estão apresentados na Tabela 5.4 e Figura 5.3. Pode-se afirmar que houve um expressivo aumento da PVH condicionada à redução do TDH e consequente aumento da TCO aplicada. A PVH média aumentou de $0,08 \pm 0,01$ para $1,46 \pm 0,16$ L h⁻¹ L⁻¹ com a redução do TDH de 8 para 0,5 h.

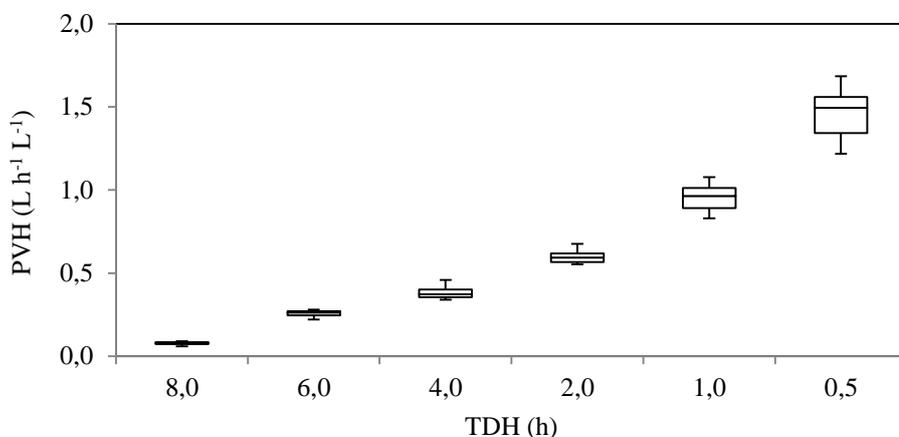
Tabela 5.4 – Valores médios de produção volumétrica de H₂ para os diferentes TDH aplicados.

Fase	TDH (h)	TCO (kg m ⁻³ d ⁻¹)	PVH (L h ⁻¹ L ⁻¹)	PVH' (mmol h ⁻¹ L ⁻¹)
1	8	30,0	$0,08 \pm 0,01^{(17)}$	$2,79 \pm 0,28^{(17)}$
2	6	40,0	$0,26 \pm 0,02^{(13)}$	$9,21 \pm 0,68^{(13)}$
3	4	60,0	$0,38 \pm 0,04^{(11)}$	$13,71 \pm 1,30^{(11)}$
4	2	120,0	$0,60 \pm 0,04^{(12)}$	$21,37 \pm 1,31^{(12)}$
5	1	240,0	$0,96 \pm 0,08^{(15)}$	$34,29 \pm 2,79^{(15)}$
6	0,5	480,0	$1,46 \pm 0,16^{(10)}$	$52,27 \pm 5,79^{(10)}$

PVH: Produção volumétrica de H₂ em L h⁻¹ L⁻¹; PVH': Produção volumétrica de H₂ em mmol L⁻¹ h⁻¹. Os números entre parênteses referem-se ao número de amostras utilizadas para média.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

Figura 5.3 – Boxplot da produção volumétrica de H₂ produzido pelo RA em relação ao TDH aplicado.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

A PVH manteve-se estável e com tendência de elevação ao longo do aumento das taxas de carregamento orgânico aplicadas (30,0 a 480,0 kg m⁻³ d⁻¹), aumentando assim a taxa de alimentação do substrato. Desta forma, mais substrato estava disponível para conversão em hidrogênio a valores mais baixos de TDH. Este comportamento de PVH crescente com o decréscimo do TDH também foi relatado em outros estudos sob condições mesofílicas, assim como observado por Zhang et al., (2007b); Shida et al., (2009); Amorim et al., (2009); Barros et al., (2010); e sob condições termofílicas, por Ferreira (2014); Santos et al., (2014a); Santos et al., (2014b); Santos et al., (2014c).

Resultados similares aos obtidos neste estudo também foram observados por Ito et al. (2005) em reator contínuo de leito fixo (37 °C) e concentração de glicerol de 10,13 g L⁻¹, os quais alcançaram utilizando glicerol puro, produção de hidrogênio de 80 mmol h⁻¹ L⁻¹ e utilizando glicerol bruto, 30 mmol h⁻¹ L⁻¹. Já nos experimentos com material suporte (Nagao Porcell) e concentração de glicerol de 10,0 g L⁻¹, os autores alcançaram a máxima produção de hidrogênio de 63 mmol h⁻¹ L⁻¹ utilizando glicerol bruto.

Salienta-se que os resultados alcançados para a PVH neste estudo são superiores quando comparados com outros trabalhos que utilizaram diferentes configurações de reatores contínuos, para produção de H₂ a partir de glicerol.

Reungsang et al. (2013) operando reator UASB alimentado com glicerina pura e buta, observaram um aumento na PVH quando a TCO aumentou de 25,0 a 50,0 kg m⁻³ d⁻¹, onde alcançou à máxima PVH de 9,0 mmol L⁻¹ h⁻¹. No entanto, ao continuar aumentando a TCO até 75,0 mmol L⁻¹ h⁻¹, houve declínio da PVH. Da mesma forma, utilizando glicerol bruto

como substrato, os autores verificaram PVH máxima de $6,2 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, na TCO de $50,0 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$.

Lo et al. (2013) avaliaram a produção de hidrogênio em CSTR a partir de *C. pasteurianum*, 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^{-1} e TDH de 12 h. Os autores observaram melhores resultados de PVH ao utilizarem o glicerol bruto ($3,98 \text{ L d}^{-1} \text{ L}^{-1}$), quando comparado com a glicerina pura ($2,47 \text{ L d}^{-1} \text{ L}^{-1}$).

Chookaew et al., (2014) investigaram a produção de hidrogênio pela imobilização de *Klebsiella* sp. TR17 em reatores UASB ($40 \text{ }^\circ\text{C}$) em diferentes TDH (12 – 2 h). Os autores verificaram que o TDH ótimo foi de 4 h, no qual foi atingida a máxima PVH ($242,15 \text{ mmol H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) para as concentrações de glicerol bruto de 30 e 10 g L^{-1} , respectivamente.

Dounavis et al., (2015) utilizaram um reator UFCB ($35 \text{ }^\circ\text{C}$) para a produção de hidrogênio e verificaram que nas condições de concentração de glicerol de 25 g L^{-1} e TDH de 24 h, a PVH máxima foi de $4,23 \text{ L d}^{-1} \text{ L}^{-1}$.

Os valores de produção biológica de hidrogênio verificados neste estudo podem ser atribuídos às vantagens operacionais e energéticas da temperatura termofílica. Sob condições termofílicas, Akutsu et al. (2009) relataram que a produção de H_2 pode ser aumentada em razão do favorecimento de transferência líquido-gás do H_2 , resultando em valores elevados de produtividade, assim como observado neste estudo, no qual foi possível atingir até $1,46 \pm 0,16 \text{ L h}^{-1} \text{ L}^{-1}$, no TDH de 0,5 h (TCO de $480,0 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$). Assim como relatado por Weiland (2010), o crescimento microbiano e a hidrólise de partículas sólidas podem ser aumentados em reatores termofílicos, a solubilidade do H_2 diminuída, aliviando o efeito inibitório causado pela alta pressão parcial de H_2 (OH et al., 2011; BASTIDAS-OYANEDEL et al., 2012).

As vantagens inerentes ao RALF também ficaram evidentes no presente estudo por meio da efetiva produção volumétrica de H_2 . Diversos fatores positivos são atribuídos a este tipo de configuração, como a possibilidade de aplicação de baixos TDH e boas características de mistura, otimizando a transferência de massa entre o substrato e os microrganismos (WU et al., 2003). Valores de PVH em função da redução do TDH utilizando RALF com diferentes substratos orgânicos apresentaram resultados próximos aos relatados neste estudo, conforme apresentado na Tabela 5.5.

Tabela 5.5 – PVH encontradas na literatura utilizando a configuração de reator RALF.

Substrato	T (°C)	C _{afllu} (g L ⁻¹)	TDH (h)	PVH (L h ⁻¹ L ⁻¹)	Referência
Glicose	37	10,0	4 – 0,5	2,22 (0,5 h)	Zhang et al., (2007b)
Glicose	30	2,0	8 – 1	1,28 (1 h)	Shida et al., (2009)
Glicose	30	2,0	8 – 1	0,97 (1 h)	Amorim et al., (2009)
Glicose	30	4,0	8 – 1	1,21 (1 h)	Barros et al., (2010)
Vinhaça	55	10,0*	8 – 1	1,96 (1 h)	Santos et al. (2014c)
Glicerol	55	5,0	14 – 1	1,51 (1 h)	Ferreira (2014)
Glicerol	55	10,0	8 – 0,5	1,46 (0,5)	Este estudo

*g DQO L⁻¹; C_{afllu}: concentração afluente do substrato utilizado.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

Dessa forma, devido à elevada concentração de matéria orgânica verificada no efluente do reator e o aumento na produção de H₂ com a redução do TDH e consequente aumento da TCO aplicada, uma alternativa para o maior aproveitamento do glicerol seria a produção contínua de bioenergia em reatores em série (reator acidogênico associado a reator metanogênico).

5.1.4 Rendimento de hidrogênio

A Tabela 5.6 e Figura 5.4 apresentam os valores e o comportamento dos rendimentos médios de hidrogênio em função do TDH aplicado.

Tabela 5.6 – Valores médios de rendimentos de H₂ para os diferentes TDH aplicados.

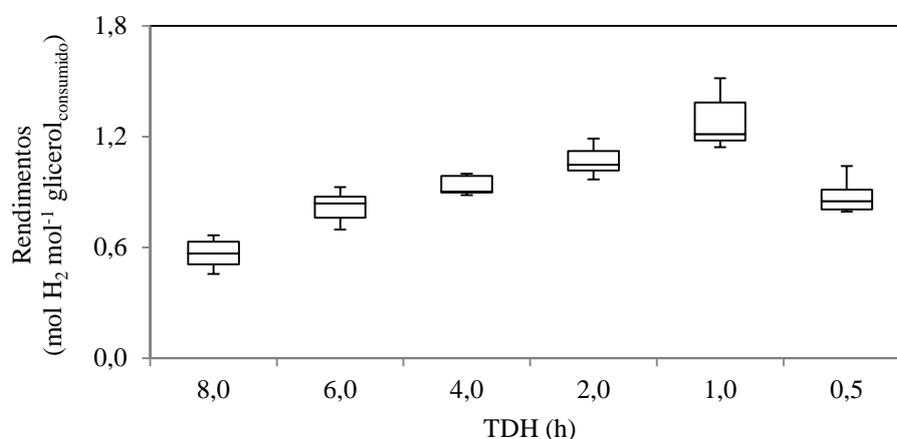
Fase	TDH (h)	TCO (kg m ⁻³ d ⁻¹)	HY (mol H ₂ mol ⁻¹ glicerol _{consumido})
1	8	30,0	0,56 ± 0,07 ⁽¹²⁾
2	6	40,0	0,82 ± 0,09 ⁽⁹⁾
3	4	60,0	0,94 ± 0,05 ⁽⁹⁾
4	2	120,0	1,06 ± 0,07 ⁽¹¹⁾
5	1	240,0	1,28 ± 0,14 ⁽⁸⁾
6	0,5	480,0	0,88 ± 0,10 ⁽⁸⁾

HY: rendimento de H₂.

Os números entre parênteses referem-se ao número de amostras utilizadas para média.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

Figura 5.4 – Boxplot para os rendimentos de H₂ produzidos pelo RA em relação ao TDH aplicado.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

A Figura 5.4 apresenta o comportamento dos rendimentos de hidrogênio (HY) em função da diminuição do TDH e conseqüente aumento da TCO aplicada. De maneira similar a produtividade volumétrica de hidrogênio, houve aumento do HY de $0,56 \pm 0,07$ para $1,28 \pm 0,14$ mol H₂ mol⁻¹ glicerol_{consumido} quando o TDH foi reduzido de 8 para 1 h. No entanto, com a diminuição do TDH para 0,5 h, o HY foi reduzido para $0,88 \pm 0,10$ mol H₂ mol⁻¹ glicerol_{consumido}. Assim, esta redução do valor do TDH para 0,5 h, com conseqüente aumento da taxa de carregamento orgânico, foi depreciativa ao rendimento de hidrogênio, o que pode ser atribuído às conseqüências de sobrecarga ao sistema.

Além disso, pode ser verificado que o HY máximo observado nesse estudo de $1,28 \pm 0,14$ mol H₂ mol⁻¹ glicerol_{consumido} foi compatível com os resultados encontrados em outros estudos que utilizaram glicerol como fonte de carbono para a produção de hidrogênio.

Ito et al. (2005) obtiveram um rendimento de $1,12$ mol H₂ mol⁻¹ glicerol_{consumido}, no qual a concentração de glicerol bruto era de $1,7$ g L⁻¹, utilizando cultura pura de *E. aerogenes* HU-101 em reator em batelada (37 °C). Em comparação com o resultado obtido no presente trabalho ($1,28 \pm 0,14$ mol H₂ mol⁻¹ glicerol_{consumido}), observa-se que eles permaneceram próximos.

Poucos estudos científicos têm focado na produção termofílica de hidrogênio a partir de glicerol, sendo a maioria realizada em reatores batelada. Ngo et al. (2011) investigaram a produção de hidrogênio pelo microrganismo hipertermofílico *Thermotoga neapolitana* DSM 4359, utilizando cultivo em batelada (75 °C) a partir de glicerol bruto ($5,0$ g L⁻¹). Observou-se

o rendimento máximo de H₂ de 2,73 mol H₂ mol⁻¹ glicerol_{consumido}. Maru et al. (2012) utilizando *T. marítima* DSM 3109 e *T. neapolitana* DSM 4359 a partir de glicerol bruto (2,5 g L⁻¹) em cultivos realizados em batelada (80 °C), verificaram rendimento de H₂ de 2,75 e 2,65 mols H₂ mol⁻¹ glicerol_{consumido} por *T. marítima* e *T. neapolitana*, respectivamente. Maru et al. (2013) utilizando glicerol bruto e *T. marítima* DSM 4359 em reator batelada (80 °C), observaram que *T. marítima* converteu glicerol principalmente a acetato, CO₂ e H₂, com rendimento máximo de H₂ de 2,84 mols H₂ mol⁻¹ glicerol_{consumido}. Os autores destes trabalhos também concluíram que a baixa diversidade em produtos finais da fermentação favoreceu a elevados rendimentos de H₂, que são superiores em comparação com aqueles normalmente observados para organismos mesofílicos. Salienta-se que o HY obtido pelo RA é inferior quando comparado aos resultados obtidos nestes estudos.

Os valores de HY encontrados no RA se mostraram análogos e até superiores quando comparado com outros trabalhos que utilizaram reatores contínuos.

Reungsang et al. (2013) ao utilizarem glicerina pura como substrato, observaram um aumento no HY quando a TCO aumentou de 25,0 a 50,0 kg m⁻³ d⁻¹, onde alcançou máximo rendimento de 0,41 mol H₂ mol⁻¹ glicerol_{consumido}. Da mesma forma, utilizando glicerol bruto como substrato, os autores verificaram que, apesar do rendimento (0,32 mol H₂ mol⁻¹ glicerol_{consumido}) ser inferior quando comparado com o observado a partir da glicerina pura, o HY apresenta seu valor máximo na TCO de 50,0 kg m⁻³ d⁻¹.

Lo et al. (2013) ao contrário de Reungsang et al. (2013), observaram melhores resultados de HY ao utilizarem o glicerol bruto (0,77 mol H₂ mol⁻¹ glicerol_{consumido}), quando comparado com a glicerina pura (0,50 mol H₂ mol⁻¹ glicerol_{consumido}).

Porém, Chookaew et al. (2014) verificaram que no TDH ótimo de 4 h, o máximo HY (4,08 mol H₂ mol⁻¹ glicerol_{consumido}) foi atingido.

Ferreira (2014) obteve rendimento superior aos verificados no RA ao avaliar a produção de H₂ em RALF termofílico (55 °C), utilizando glicerol bruto (5,0 g L⁻¹) como substrato. O HY manteve-se praticamente constante durante os TDH de 14 a 2 h, variando entre 1,2 a 1,4 mol H₂ mol⁻¹ glicerol_{consumido}. Entretanto, o máximo rendimento obtido, 3,0 mol H₂ mol⁻¹ glicerol_{consumido}, foi observado no TDH de 1 h.

Paranhos (2016), por sua vez, operando RALF em condições mesofílicas (30 °C), utilizando glicerol bruto (2,9 – 17,1 g L⁻¹) como fonte de carbono, obteve HY máximo de 0,17 mol H₂ mol⁻¹ glicerol_{consumido} no TDH de 5 h e concentração de glicerol de 17,1 g L⁻¹.

A Tabela 5.7 apresenta o desempenho na produção de hidrogênio do RA em comparação com outros trabalhos da literatura. É possível observar, que o conteúdo de H₂

obtido por este trabalho ($78,5 \pm 3,2\%$), encontra-se entre os mais elevados. A PVH do presente trabalho obteve resultados inferiores a Ito et al. (2005) e Ferreira (2014), porém superior aos demais trabalhos. Em relação ao HY, o RA apresentou resultados superiores aos de Lo et al. (2013) e Reungsang et al. (2013) em reatores contínuos e inferior aos obtidos pelos trabalhos realizados em batelada sob condições hipertermofílicas.

Tabela 5.7 - Comparação do desempenho na produção de hidrogênio entre o trabalho atual e os reportados na literatura.

Reator	Glicerol (g L ⁻¹)	Temperatura (°C)	TDH (h)	Inóculo	H ₂ (%)	HY (mol H ₂ mol ⁻¹ glicerol _{consumido})	PVH (mmol h ⁻¹ L ⁻¹)	Referência
Batelada	GP: 5,0					1,05	-	
	GB: 1,7					1,12		
Leito fixo (sem MS)	GP: 10,13	37	-	<i>E. aerogenes</i> HU-101	-	-	80	Ito et al. (2005)
	GB: 10,13					-	30	
Leito fixo (com MS)	GP: 10,0					-	63	
Batelada	GP 5,0	75	-	<i>T. neapolitana</i> DSM 4359	-	1,98	-	Ngo et al. (2011)
	GB 5,0					2,73		
Batelada	GB 2,5	80	-	<i>T. marítima</i> DSM 3109 <i>T. neapolitana</i> DSM 4359	-	2,75	-	Maru et al. (2012)
						2,65		
Batelada	GB 2,5	80	-	<i>T. marítima</i> DSM 4359	-	2,84	-	Maru et al. (2013)
UASB	GP 25,0	37	12	<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	37,1	0,41	9,00	Reungsang et al. (2013)
	GB 25,0					0,32	6,20	
CSTR	GP 10,0	35	12	<i>C. pasteurianum</i>	78,3	0,50	4,07*	Lo et al. (2013)
	GB 10,0					72,7	6,56*	
UASB	GB 10 – 30	40	12 – 2	<i>Klebsiella sp. TR17</i>	45,0 (4 h)	4,08* (4 h)	10,1 (4 h)	Chookaew et al. (2014)
RALF	GB 5,0	55	14 – 1	Cultura mista	70 (1 h)	3,0 (1 h)	61,1* (1 h)	Ferreira (2014)
UFCB	GB 10 – 25	35	24 – 48	Cultura mista	45,5 (24 h)	0,50 (24 h)	4,23 L d ⁻¹ L ⁻¹ (24 h)	Dounavis et al. (2015)
RALF	GB 10,0	55	8 – 0,5	Cultura mista	78,5 (0,5 h)	1,28 (1 h)	52,27 (0,5 h)	Este estudo

*calculado com base nas informações do artigo; GB: Glicerol bruto; GP: Glicerina pura; CSTR: *Continuous Stirred Tank Reactor*; UASB: *Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor*; RALF: Reator Anaeróbio de Leito Fluidizado; UFCB: *Anaerobic Up-flow Column Bioreactor*.
Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

5.1.5 Metabólitos solúveis produzidos

A quantificação dos metabólitos líquidos produzidos no RA, como os ácidos orgânicos voláteis e alcoóis, é necessária devido à atuação destes metabólitos como reguladores de possíveis rotas no metabolismo da comunidade microbiana, compreendendo os produtores e consumidores de hidrogênio e os competidores por substrato. Além disso, parte destes metabólitos podem ter papel tóxico ou inibitório para as populações de microrganismos produtores de hidrogênio.

Os principais metabólitos obtidos no presente trabalho foram: ácido butírico (HBu), 1,3-propanodiol (1,3-PDO), ácido propiônico (HPr), ácido acético (HAc) e butanol (ButOH). Na Tabela 5.8 estão apresentadas as concentrações de todos os metabólitos detectados no efluente do reator nas diferentes condições de operação.

Diante dos resultados apresentados, observa-se que houve um predomínio de ácido butírico durante a operação do reator. As concentrações desse composto apresentaram valores contantes, variando entre $1429,1 \pm 106,3$ e $1488,1 \pm 141,3$ mg L⁻¹, com a redução do TDH de 8 a 1 h. Porém, quando o TDH foi reduzido para 0,5 h a concentração de HBu diminuiu para $1180,7 \pm 124,2$ mg L⁻¹, sendo a esta a única fase operacional em que houve produção de HAc ($227,8 \pm 66,4$ mg L⁻¹). Comportamento semelhante foi verificado na concentração de ButOH, apresentando valores constantes, variando entre $103,7 \pm 1,6$ e $128,7 \pm 9,3$ mg L⁻¹, com a redução do TDH de 8 a 1 h, porém apresentando aumento com a redução do TDH para 0,5 h ($231,4 \pm 5,51$ mg L⁻¹).

Destaca-se também a concentração de HPr, a qual manteve-se com ligeira tendência de aumento, $254,9 \pm 16,4$ a $309,5 \pm 11,4$ mg L⁻¹, com a redução do TDH de 8 a 1 h. Entretanto, no TDH de 0,5 h houve aumento na concentração desse composto para $583,0 \pm 15,4$ mg L⁻¹. Baixas concentrações de MetOH, EtOH, HIsobu, HIsova, HVa e HCa foram verificadas. Além disso, salienta-se que 1,3-PDO foi produzido em elevada concentração apenas na segunda fase operacional (TDH de 6 h).

Na Tabela 5.8 e na Figura 5.5 destacam-se a porcentagem molar dos metabólitos em cada fase operacional realizada no reator RA. Nota-se que os máximos percentuais de HBu, 65,4, 54,4, 62,9 e 61,0% , foram alcançados nos TDH de 8, 4, 2 e 1 h, respectivamente. Nas demais fases houve favorecimento na produção de 1,3-PDO (45,0%) no TDH de 6 h; HAc (11,2%) e HPr (23,2%) no TDH de 0,5 h.

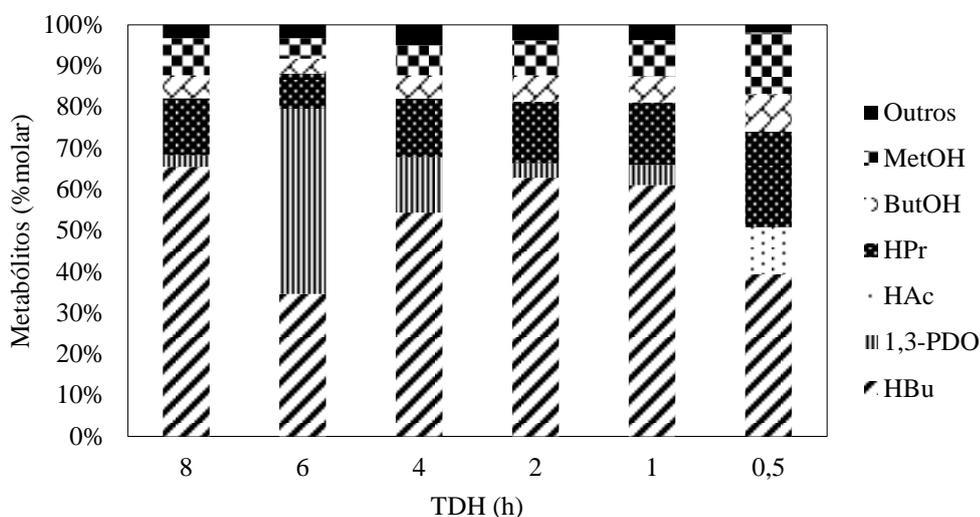
Tabela 5.8 – Concentração (g L⁻¹) e fração molar (%) dos metabólitos detectados durante a operação do RA.

Metabólitos		TDH (h)					
		8	6	4	2	1	0,5
mg L ⁻¹	1,3-PDO	52,5 ± 8,7 ⁽⁹⁾	1625,6 ± 253,1 ⁽¹⁰⁾	309,0 ± 126,5 ⁽¹⁰⁾	70,7 ± 28,5 ⁽¹⁰⁾	102,1 ± 45,0 ⁽⁹⁾	ND
%		2,8	45,0	13,4	3,5	4,9	
mg L ⁻¹	MetOH	71,4 ± 0,8 ⁽¹²⁾	76,1 ± 3,9 ⁽⁹⁾	70,8 ± 5,5 ⁽¹⁴⁾	73,2 ± 2,6 ⁽¹¹⁾	77,4 ± 1,7 ⁽¹¹⁾	161,2 ± 3,2 ⁽¹²⁾
%		9,0	5,0	7,3	8,5	8,8	14,9
mg L ⁻¹	EtOH	ND	31,73 ± 2,98 ⁽⁸⁾	ND	ND	ND	ND
%				1,5			
mg L ⁻¹	ButOH	103,7 ± 1,6 ⁽¹²⁾	127,4 ± 8,1 ⁽⁹⁾	127,1 ± 12,7 ⁽¹⁴⁾	127,2 ± 4,3 ⁽¹¹⁾	128,7 ± 9,3 ⁽¹¹⁾	231,4 ± 5,5 ⁽¹²⁾
%		5,6	3,6	5,7	6,4	6,3	9,2
mg L ⁻¹	HAc	ND	ND	ND	ND	ND	227,80 ± 66,41 ⁽⁹⁾
%							
mg L ⁻¹	HPr	254,9 ± 16,4 ⁽¹²⁾	299,1 ± 10,0 ⁽⁹⁾	319,9 ± 42,0 ⁽¹³⁾	298,5 ± 17,1 ⁽¹¹⁾	309,5 ± 11,4 ⁽¹¹⁾	583,0 ± 15,5 ⁽¹¹⁾
%		13,9	8,5	14,3	15,0	15,2	23,2
mg L ⁻¹	HIsoBu	37,8 ± 5,8 ⁽⁹⁾	46,4 ± 11,5 ⁽¹⁴⁾	36,4 ± 5,7 ⁽¹¹⁾	44,5 ± 9,3 ⁽¹¹⁾	34,1 ± 3,1 ⁽⁹⁾	39,6 ± 2,8 ⁽⁸⁾
%		1,7	1,1	1,4	1,9	1,4	1,3
mg L ⁻¹	HBu	1429,1 ± 106,3 ⁽¹²⁾	1446,7 ± 177,9 ⁽⁸⁾	1447,9 ± 120,8 ⁽¹⁰⁾	1488,1 ± 141,3 ⁽¹¹⁾	1474,1 ± 157,6 ⁽⁹⁾	1180,7 ± 124,2 ⁽⁸⁾
%		65,4	34,6	54,4	62,9	61,0	39,6
mg L ⁻¹	HIsoVa	14,0 ± 2,7 ⁽¹²⁾	13,9 ± 3,0 ⁽¹²⁾	22,7 ± 5,2 ⁽¹⁰⁾	20,8 ± 4,1 ⁽¹¹⁾	18,7 ± 4,1 ⁽⁹⁾	17,4 ± 3,1 ⁽⁹⁾
%		0,6	0,3	0,7	0,8	0,7	0,5
mg L ⁻¹	HVa	12,7 ± 1,2 ⁽⁹⁾	14,4 ± 3,7 ⁽¹⁰⁾	74,0 ± 9,8 ⁽¹⁰⁾	21,8 ± 5,8 ⁽⁹⁾	32,8 ± 11,5 ⁽⁹⁾	2,7 ± 1,3 ⁽⁸⁾
%		0,5	0,3	2,4	0,8	1,2	0,1
mg L ⁻¹	HCa	13,3 ± 6,3 ⁽⁷⁾	6,6 ± 2,9 ⁽⁸⁾	16,2 ± 3,2 ⁽⁸⁾	11,7 ± 2,1 ⁽⁹⁾	14,7 ± 6,4 ⁽⁷⁾	ND
%		0,5	0,1	0,5	0,4	0,5	

1,3-PDO: 1,3-propanodiol; MetOH: metanol; EtOH: etanol; ButOH: butanol; HAc: ácido acético; HPr: ácido propiônico; HIsoBu: ácido isobutírico; HBu: ácido butírico; HIsoVa: ácido isovalérico; HVa: ácido valérico; HCa: ácido capríco; ND: não detectado.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

Figura 5.5 – Porcentagem molar dos principais metabólitos produzidos pelo RA em relação ao TDH aplicado.



Retomando os resultados obtidos acerca do rendimento e conteúdo de hidrogênio, discutidos anteriormente, é possível observar, com maior clareza, que a elevada concentração de HBU verificada, apresentando valores constantes ao longo da operação do reator, foi acompanhada por um ligeiro aumento simultâneo no rendimento e conteúdo de H_2 no biogás, os quais permaneceram elevados em todas as fases operacionais. Sabe-se que, de acordo com a equação (5), apresentada por ZENG, 1995 e ZENG et al. (1996) e reescrita no tópico 3.6 desta dissertação, a formação de HBU a partir de glicerol resulta na formação de 2 mol de H_2 por mol de glicerol, o que justifica a elevada produção de hidrogênio diante do alto teor de HBU produzido.

Vale salientar que 1,3-PDO foi o principal produto metabólico durante a operação no TDH de 6 h. De acordo com equação (11) no tópico 3.6 desta dissertação, a formação de 1 mol de 1,3-PDO a partir de glicerol resulta no consumo de 1 mol de H_2 por mol de glicerol. Uma hipótese para a produção simultânea de H_2 e 1,3-PDO no TDH de 6 h, foram as baixas conversões de glicerol obtidas ao longo do experimento. Segundo BIEBL et al. (1999), quando a concentração de glicerol é o fator limitante, a formação de biomassa celular é otimizada e grandes quantidades de etanol são produzidas, mas à medida que glicerol aparece no meio, devido ao aumento da inibição pelos subprodutos, a formação de etanol cessa e o rendimento de 1,3-PDO se aproxima do seu valor máximo.

A Tabela 5.9 apresenta os rendimentos e produtividades volumétricas de todos os metabólitos detectados em cada fase operacional do RA.

Tabela 5.9 – Produção volumétrica ($\text{g h}^{-1} \text{L}^{-1}$) e rendimentos (mol mol^{-1}) dos metabólitos detectados durante a operação do RA.

Metabólitos		TDH (h)					
		8	6	4	2	1	0,5
$\text{g h}^{-1} \text{L}^{-1}$	1,3-PDO	$0,01 \pm 0,00^{(9)}$	$0,27 \pm 0,04^{(10)}$	$0,08 \pm 0,03^{(10)}$	$0,04 \pm 0,01^{(10)}$	$0,10 \pm 0,04^{(9)}$	ND
mol mol^{-1}		$0,03 \pm 0,01^{(9)}$	$0,80 \pm 0,15^{(10)}$	$0,14 \pm 0,06^{(10)}$	$0,04 \pm 0,02^{(10)}$	$0,08 \pm 0,04^{(9)}$	
$\text{g h}^{-1} \text{L}^{-1}$	MetOH	$0,01 \pm 0,00^{(12)}$	$0,01 \pm 0,00^{(9)}$	$0,02 \pm 0,00^{(14)}$	$0,04 \pm 0,00^{(11)}$	$0,08 \pm 0,00^{(11)}$	$0,32 \pm 0,01^{(12)}$
mol mol^{-1}		$0,10 \pm 0,01^{(12)}$	$0,09 \pm 0,01^{(9)}$	$0,08 \pm 0,02^{(14)}$	$0,10 \pm 0,01^{(11)}$	$0,14 \pm 0,02^{(11)}$	$0,32 \pm 0,06^{(12)}$
$\text{g h}^{-1} \text{L}^{-1}$	EtOH	ND	$0,01 \pm 0,00^{(8)}$	ND	ND	ND	ND
mol mol^{-1}		$0,03 \pm 0,00^{(8)}$					
$\text{g h}^{-1} \text{L}^{-1}$	ButOH	$0,01 \pm 0,00^{(12)}$	$0,02 \pm 0,00^{(9)}$	$0,03 \pm 0,00^{(14)}$	$0,06 \pm 0,00^{(11)}$	$0,13 \pm 0,01^{(11)}$	$0,46 \pm 0,01^{(12)}$
mol mol^{-1}		$0,06 \pm 0,01^{(12)}$	$0,06 \pm 0,01^{(9)}$	$0,06 \pm 0,01^{(14)}$	$0,08 \pm 0,01^{(11)}$	$0,10 \pm 0,02^{(11)}$	$0,20 \pm 0,04^{(12)}$
$\text{g h}^{-1} \text{L}^{-1}$	HAc	ND	ND	ND	ND	ND	$0,46 \pm 0,13^{(9)}$
mol mol^{-1}							$0,24 \pm 0,05^{(9)}$
$\text{g h}^{-1} \text{L}^{-1}$	HPr	$0,03 \pm 0,00^{(12)}$	$0,05 \pm 0,00^{(9)}$	$0,08 \pm 0,01^{(13)}$	$0,15 \pm 0,01^{(11)}$	$0,31 \pm 0,01^{(11)}$	$1,17 \pm 0,03^{(11)}$
mol mol^{-1}		$0,15 \pm 0,02^{(12)}$	$0,15 \pm 0,02^{(9)}$	$0,15 \pm 0,03^{(13)}$	$0,18 \pm 0,02^{(11)}$	$0,25 \pm 0,04^{(11)}$	$0,50 \pm 0,09^{(11)}$
$\text{g h}^{-1} \text{L}^{-1}$	HISOBu	$0,00 \pm 0,00^{(9)}$	$0,01 \pm 0,00^{(14)}$	$0,01 \pm 0,00^{(11)}$	$0,02 \pm 0,00^{(11)}$	$0,03 \pm 0,00^{(9)}$	$0,08 \pm 0,01^{(8)}$
mol mol^{-1}		$0,02 \pm 0,00^{(9)}$	$0,02 \pm 0,01^{(14)}$	$0,01 \pm 0,00^{(11)}$	$0,02 \pm 0,01^{(11)}$	$0,02 \pm 0,00^{(9)}$	$0,03 \pm 0,01^{(8)}$
$\text{g h}^{-1} \text{L}^{-1}$	HBu	$0,18 \pm 0,01^{(12)}$	$0,24 \pm 0,03^{(8)}$	$0,36 \pm 0,03^{(10)}$	$0,74 \pm 0,07^{(11)}$	$1,47 \pm 0,16^{(9)}$	$2,36 \pm 0,25^{(8)}$
mol mol^{-1}		$0,70 \pm 0,11^{(12)}$	$0,62 \pm 0,10^{(8)}$	$0,58 \pm 0,12^{(10)}$	$0,74 \pm 0,11^{(11)}$	$0,99 \pm 0,18^{(9)}$	$0,86 \pm 0,18^{(8)}$
$\text{g h}^{-1} \text{L}^{-1}$	HISOVa	$0,00 \pm 0,00^{(12)}$	$0,00 \pm 0,00^{(12)}$	$0,01 \pm 0,00^{(10)}$	$0,01 \pm 0,00^{(11)}$	$0,02 \pm 0,00^{(9)}$	$0,03 \pm 0,01^{(9)}$
mol mol^{-1}		$0,01 \pm 0,00^{(12)}$	$0,01 \pm 0,00^{(12)}$	$0,01 \pm 0,00^{(10)}$	$0,01 \pm 0,00^{(11)}$	$0,01 \pm 0,00^{(9)}$	$0,01 \pm 0,00^{(9)}$
$\text{g h}^{-1} \text{L}^{-1}$	HVa	$0,00 \pm 0,00^{(9)}$	$0,00 \pm 0,00^{(10)}$	$0,02 \pm 0,00^{(10)}$	$0,01 \pm 0,00^{(9)}$	$0,03 \pm 0,01^{(9)}$	$0,01 \pm 0,00^{(8)}$
mol mol^{-1}		$0,01 \pm 0,00^{(9)}$	$0,01 \pm 0,00^{(10)}$	$0,03 \pm 0,01^{(10)}$	$0,01 \pm 0,00^{(9)}$	$0,02 \pm 0,01^{(9)}$	$0,00 \pm 0,00^{(8)}$
$\text{g h}^{-1} \text{L}^{-1}$	HCa	$0,00 \pm 0,00^{(7)}$	$0,00 \pm 0,00^{(8)}$	$0,00 \pm 0,00^{(8)}$	$0,01 \pm 0,00^{(9)}$	$0,01 \pm 0,01^{(7)}$	ND
mol mol^{-1}		$0,00 \pm 0,00^{(7)}$	$0,00 \pm 0,00^{(8)}$	$0,00 \pm 0,00^{(8)}$	$0,00 \pm 0,00^{(9)}$	$0,01 \pm 0,00^{(7)}$	

1,3-PDO: 1,3-propanodiol; MetOH: metano; EtOH: etanol; ButOH: butanol; HAc: ácido acético; HPr: ácido propiônico; HISOBu: ácido isobutírico; HBu: ácido butírico; HISOVa: ácido isovalérico; HVa: ácido valérico; HCa: ácido capríco; ND: não detectado.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

Comportamento semelhante na produção de 1,3-PDO foi verificado no trabalho de Vlassis et al. (2012) que avaliaram a produção de H_2 em ensaios em batelada. Os autores verificaram que na condição de pH inicial de 4,5 – 6,5, que exibiram rendimentos elevados de H_2 , o glicerol não foi completamente consumido e 1,3-PDO (30 – 40%) foi o produto metabólito dominante. Além disso, HAc e HBU, também apresentaram teores significativos. Também foi observado que o aumento das concentrações de HAc e HBU foi acompanhado por um aumento simultâneo do rendimento de HY.

Como exemplo de estudo desenvolvido em reatores contínuos, destaca-se o trabalho de Lo et al. (2013), que avaliou a produção de H_2 em reator CSTR, utilizando glicerol bruto e puro ($10,0 \text{ g L}^{-1}$) como substrato, por meio de *C. pasteurianum* CH4. Os principais metabólitos solúveis produzidos utilizando glicerol puro e bruto como fonte de carbono, foram 1,3-PDO (30,4 e 23,5%), HBU (25,7 e 16,6%), ButOH (25,7 e 23,3%), HAc (2,4 e 4,1%) e HLa (19,3 e 14,9%). Os autores concluíram que a elevada concentração de HBU e ButOH produzidos se correlaciona com os altos conteúdos e rendimentos de H_2 obtidos.

Chookaew et al. (2014) verificaram que nas três concentrações de glicerol adotadas (10, 20 e 30 g L^{-1}), houve a predominância de 1,3-PDO em todos os TDH operados. O máximo teor de 1,3-PDO, foi alcançado no TDH de 12h, para todas as concentrações de glicerol testadas, e o máximo valor foi de $9,0 \text{ g L}^{-1}$ para $20,0 \text{ g L}^{-1}$ de glicerol. De maneira conjunta ácido acético, etanol e 2,3-butanodiol também foram produzidos, em menores concentrações.

Ferreira (2014) obteve majoritariamente HBU ($2705,8 \text{ mg L}^{-1}$), seguido por 1,3-PDO ($700,0 \text{ mg L}^{-1}$), HAc ($237,5 \text{ mg L}^{-1}$), EtOH ($142,3 \text{ mg L}^{-1}$) e HPr ($76,6 \text{ mg L}^{-1}$) no TDH de 4 h. No entanto, ao reduzir o TDH para 1 h, a autora verificou o favorecimento da produção de ácido propiônico, atingindo as frações molares, em porcentagem, de 56% de HPr, 30% de 1,3-PDO, 11% de HAc e 3% de outros produtos.

De maneira análoga, Dounavis et al. (2015) também obteve elevada produção de 1,3-PDO ($7,0 \text{ g L}^{-1}$), seguida por HBU ($3,36 \text{ g L}^{-1}$), além de baixas concentrações de HAc ($0,93 \text{ g L}^{-1}$), e EtOH ($0,14 \text{ g L}^{-1}$). Nesta condição foi verificado o rendimento máximo de H_2 ($0,53 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ glicerol}_{\text{consumido}}$).

Na prática, a fermentação anaeróbia de glicerol por consórcios microbianos mistos gera muitos metabólitos diferentes, causando uma variabilidade do HY observado. As culturas acidogênicas mesofílicas derivadas de lodo anaeróbio são usualmente dominadas por *Clostridium* sp., sendo o rendimento máximo teórico de H_2 considerado como sendo

3,0 mol H₂ mol⁻¹ glicerol_{consumido}. No entanto, o HY medido é geralmente relatado variando entre 0,38 a 1,12 mol H₂ mol⁻¹ glicerol_{consumido} (LO et al., 2013), muito abaixo do máximo teórico. Isto ocorre quando o glicerol é utilizado como substrato a partir de *Clostridium* sp., em que as concentrações intracelulares de ATP e NADH aumentam, e o metabolismo é encaminhado para a produção de 1,3-PDO. Consequentemente a produção de ácidos graxos de cadeia curta e de hidrogênio diminui, e assim também o HY obtido (Grupe e Gottschalk, 1992). De fato, na maioria dos estudos em que se utilizaram espécies *Clostridium* sp., a concentração de 1,3-PDO representa mais de 50% dos produtos microbianos solúveis totais, enquanto quantidades consideráveis de outros metabolitos solúveis além de acetato e butirato tais como butanol, lactato, propionato e etanol em menor grau também são detectados (Akutsu et al., 2009b; Lo et al., 2013; Han et al., 2012; Vlassis et al., 2012).

Por outro lado, alguns trabalhos que visaram à produção de hidrogênio, a partir do glicerol, reportaram ácido butírico e butanol como principais produtos da fermentação. Como exemplo, pode-se citar o estudo de Bravo et al. (2014), que avaliaram a influência da COV aplicada na produção de H₂ em reator AnSBBR (30 °C). Os autores observaram máxima produção molar de H₂ quando o reator foi operado no tempo de ciclo de 4 h e concentração de glicerol de 5000,0 mg DQO L⁻¹ (COV de 12,9 mg DQO L⁻¹ d⁻¹), obtendo majoritariamente HBU (42%) e ButOH (30%) como subprodutos da fermentação, além de baixas concentrações de HAc (7%), HPr (4%) e HCa (6%). Esta condição também foi verificada no presente trabalho, uma vez que, nas fases operacionais (1, 3, 4 e 5) também foram constatados teores significativos de ácido butírico e butanol.

Lovato et al. (2015), por sua vez, reporta elevados percentuais de HBU e HAc em reator AnSBBR (30 °C). Os autores verificaram rendimento e composição máximos de H₂, 1,19 mol H₂ mol⁻¹ glicerol_{consumido} e 68%, respectivamente, quando o reator foi operado no tempo de ciclo de 3 h e concentração de glicerol de 5000,0 mg DQO L⁻¹ (COV de 17,1 kg DQO m⁻³ d⁻¹), obtendo majoritariamente HBU (45,8%) e HAc (30,3%) como subprodutos da fermentação, além de baixas concentrações de ButOH (8,7%), EtOH (6,8%) e HPr (3,9%).

Diante do que foi abordado ao longo deste tópico, é possível observar que, em cada fase experimental, nas quais foram atribuídas diferentes condições operacionais, houve o favorecimento de uma rota metabólica em detrimento da outra. Isso resultou, em diferentes concentrações de 1,3-PDO ao longo do experimento. De modo a direcionar a discussão apenas para o 1,3-PDO, o tópico subsequente aborda o rendimento e produtividade obtidos para este composto.

5.1.5.1 Produção volumétrica e rendimento de 1,3-propanodiol

A Tabela 5.10 ressalta a produção volumétrica (PV1,3-PD) e o rendimento (1,3-PDY) de 1,3-PDO obtido ao longo da operação do reator.

Tabela 5.10 – Produção volumétrica e rendimento de 1,3-PDO obtidos no RA para os diferentes TDH aplicados.

Fase	TDH (h)	TCO (kg m ⁻³ d ⁻¹)	PV1,3-PD (g L ⁻¹ h ⁻¹)	1,3-PDY (mol 1,3-PDO mol ⁻¹ glicerol _{consumido})	1,3-PDY' (g 1,3-PDO g ⁻¹ glicerol _{consumido})
1	8	30,0	0,01 ± 0,00 ⁽⁹⁾	0,03 ± 0,01 ⁽⁹⁾	0,02 ± 0,01 ⁽⁹⁾
2	6	40,0	0,27 ± 0,04 ⁽¹⁰⁾	0,80 ± 0,15 ⁽¹⁰⁾	0,66 ± 0,12 ⁽¹⁰⁾
3	4	60,0	0,08 ± 0,03 ⁽¹⁰⁾	0,14 ± 0,06 ⁽¹⁰⁾	0,12 ± 0,05 ⁽¹⁰⁾
4	2	120,0	0,04 ± 0,01 ⁽¹⁰⁾	0,04 ± 0,02 ⁽¹⁰⁾	0,03 ± 0,01 ⁽¹⁰⁾
5	1	240,0	0,10 ± 0,04 ⁽⁹⁾	0,08 ± 0,04 ⁽⁹⁾	0,07 ± 0,03 ⁽⁹⁾
6	0,5	480,0	ND	ND	ND

PV1,3-PD: Produção volumétrica de 1,3-PDO; 1,3-PDY: Rendimento de 1,3-PDO em mol; 1,3-PDY': Rendimento de 1,3-PDO em grama; ND: não detectado.

Os números entre parênteses referem-se ao número de amostras utilizadas para média. Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

É possível notar, por meio da Tabela 5.10, que as máximas produção volumétrica ($0,27 \pm 0,04 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) e rendimento ($0,80 \pm 0,15 \text{ mol 1,3-PDO mol}^{-1} \text{ glicerol}_{\text{consumido}}$) de 1,3-PDO ocorreram no TDH de 6 h.

Alguns pesquisadores relataram significativas produções volumétricas de 1,3-PDO, 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.

González-Pajuelo et al. (2005) avaliando os efeitos da taxa de diluição (D) e da concentração de glicerina pura na produção de 1,3-PDO, por meio de *Clostridium butyricum* VPI 3266, verificaram que na condição de de $D = 0,30 \text{ h}^{-1}$ e 60 g L^{-1} de glicerina a concentração de 1,3-PDO foi de $30,9 \text{ g L}^{-1}$ e foi verificada a máxima produtividade e rendimento de 1,3-PDO, iguais a $10,3 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e $0,65 \text{ mol 1,3-PDO mol}^{-1} \text{ glicerol}_{\text{consumido}}$, respectivamente.

Cheng et al. (2007) avaliaram a produção de 1,3-PDO em batelada alimentada, utilizando *K. pneumoniae*. Os melhores resultados para esse sistema foram de uma produção

de 58,8 g L⁻¹ de 1,3-PDO, com um rendimento e produtividade de 1,3-PDO equivalente a 0,53 mol 1,3-PDO mol⁻¹ glicerol_{consumido} e 0,92 g L⁻¹ h⁻¹, respectivamente.

Zhang et al. (2007a) avaliaram a produção de 1,3-PDO por *Klebsiella pneumoniae*, a partir de glicerina pura (20,0 g L⁻¹) e utilizando 6,0 g L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, como fonte de nitrogênio. Para as fermentações em batelada, os autores obtiveram 12,2 g L⁻¹ de 1,3-PDO, produtividade de 1,53 g L⁻¹ h⁻¹ e rendimento de 0,75 mol 1,3-PD mol⁻¹ glicerol_{consumido}. No entanto, para as fermentações em batelada alimentada, a concentração de 1,3-PDO apresentou um máximo de 38,1 g L⁻¹, enquanto a produtividade e rendimento decresceram (0,79 g L⁻¹ h⁻¹ e 0,70 mol 1,3-PDO mol⁻¹ glicerol_{consumido}).

Gonen et al. (2012) avaliaram o efeito de diferentes meios suportes, na imobilização de *Klebsiella pneumoniae* para a fermentação de glicerol bruto (45,0 g L⁻¹), em Reator Anaeróbio de Leito Fixo (37 °C), variando-se o TDH de 0,5 a 16 h. A concentração máxima de 1,3-PDO obtida (19,7 g L⁻¹) foi alcançada utilizando espuma de poliuretano no TDH de 8 h. O reator imobilizado com pedra-pomes apresentou os melhores resultados de produtividade (8,5 g L⁻¹ h⁻¹ – TDH: 1 h) e rendimento (0,45 g g⁻¹ glicerol_{alimentado} – TDH: 4 h).

Gonen et al. (2013) avaliaram a produção de 1,3-PDO, a partir de glicerol bruto (45,0 g L⁻¹), na imobilização de *Clostridium beijerinckii* NRRL B-593 em Reator Anaeróbio de Leito Fixo, variando-se o TDH de 1 a 16 h. Os melhores resultados foram obtidos para o reator operado com anéis Rasching, em que a máxima concentração de 1,3-PDO foi de 30,0 g L⁻¹ (TDH de 8 h). Em relação à produtividade, o máximo valor atingido foi no TDH de 2 h, correspondente a 6,4 g L⁻¹ h⁻¹ e o máximo rendimento obtido foi verificado no TDH de 8 h (0,77 mol 1,3-PDO mol⁻¹ glicerol_{consumido}).

Gallardo et al. (2014) produziram 1,3-PDO a partir de glicerol residual (25,0 g L⁻¹) em três reatores EGSB (37 °C), variando-se o TDH de 24 a 3 h. O reator inoculado com lodo granular, apresentou rendimento máximo de 1,3-PDO (0,49 g 1,3-PDO g⁻¹ glicerol_{consumido} ou 0,59 mol 1,3-PDO mol⁻¹ glicerol_{consumido}) e produtividade máxima (82 g L⁻¹ d⁻¹) no TDH de 12 e 3 h, respectivamente.

A Tabela 5.11 apresenta um resumo da literatura mencionada, com objetivo de produzir 1,3-PDO, utilizando glicerol como substrato. Observa-se que, os valores de concentração máxima de 1,3-PDO e de produtividade encontrados nos trabalhos citados são todos superiores ao máximo encontrado neste estudo. Entretanto, o rendimento de 1,3-PDO observado nesta pesquisa (0,80 ± 0,15 mol 1,3-PDO mol⁻¹ glicerol_{consumido}) apresenta-se superior aos trabalhos mencionados.

Tabela 5.11 – Comparação do desempenho na produção de 1,3-PDO entre o trabalho atual e os reportados na literatura.

Reator	Glicerol (g L ⁻¹)	TDH (h)	Inóculo	1,3-PDO (g L ⁻¹)	1,3-PDY (mol 1,3-PDO mol ⁻¹ glicerol _{consumido})	PV1,3-PD (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Referência
CSTR	GP: 60,0	3	<i>C. butyricum</i> HU-101	30,9	0,65	10,30	González-Pajuelo et al. (2005)
Fermentador 3 estágios	GP: 15-40 (5000 L)	18	<i>K. pneumoniae</i> M5al	58,8	0,53	0,92	Cheng et al. (2007)
Batelada				12,2	0,75	1,53	
Batelada alimentada	GP: 20,0	8	<i>K. pneumoniae</i>	38,1	0,70	0,79	Zhang et al. (2007a)
Leito fixo	GB: 45,0	16 - 0,5	<i>K. pneumoniae</i>	PU: 19,7 (8 h) PP: 18,4 (6 h)	0,30 (6 h)* 0,54 (4 h)*	6,0 (1 h) 8,5 (1 h)	Gonen et al. (2012)
Leito fixo	GB: 45,0	16 – 1	<i>C. beijerinckii</i> NRRL B-593	AR: 30,0 (8 h) GS: 28,0 (8 h)	0,77 (6 h)* 0,69 (4 h)*	6,4 (2 h) 6,1 (2 h)	Gonen et al. (2013)
EGSB	GB: 25,0	24 – 3	Misto	-	0,52 (12 h)	2,37 (3 h)	Gallardo et al. (2014)
RALF	GB: 2,9-17,1	9,24 – 17,1	Misto	4,47 (10,0 g L ⁻¹ ; 9,24 h)	1,05 (10g L ⁻¹ ; 9,24 h)	1,04 (15g L ⁻¹ ; 9,24 h)	Paranhos (2016)
RALF	GB: 10,0	8 – 0,5	Misto	1,63 (6 h)	0,80 (6 h)	0,27 (6 h)	Este estudo

GP: glicerol puro; GB: glicerol bruto; PU: espuma de poliuretano; PP: pedra-pomes; AR: anéis de Rasching; GS: esferas de vidro.

*Calculado com base em informações apresentadas no artigo.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

5.1.6 Remoção de DQO, pH e sólidos suspensos

Por se tratar de uma fermentação, com formação de metabólitos reduzidos dissolvidos no caldo fermentado, há uma sutil conversão da DQO. A partir da Tabela 5.12 e Figura 5.6 observa-se que a remoção de carga orgânica manteve-se constante ao longo das quatro primeiras fases de operação, atingindo valores médios de eficiência entre $2,7 \pm 0,7$ e $7,5 \pm 1,6\%$. Porém, na última fase operacional a remoção de DQO apresentou-se praticamente nula ($0,8 \pm 0,7\%$).

Tabela 5.12 – Concentrações afluentes, efluente e sua respectiva remoção de DQO no RA.

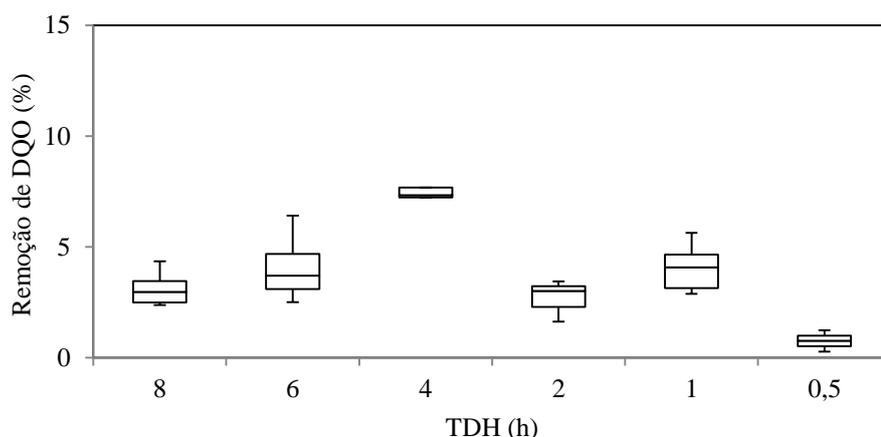
Fase	TDH (h)	TCO' (kg DQO m ⁻³ d ⁻¹)	DQO _{aflu} (g DQO L ⁻¹)	DQO _{efflu} (g DQO L ⁻¹)	Remoção (%)
1	8	30,0	12,81 ± 0,47 ⁽⁹⁾	12,41 ± 0,44 ⁽⁹⁾	3,2 ± 0,7 ⁽⁹⁾
2	6	40,0	11,51 ± 1,68 ⁽⁷⁾	11,04 ± 0,03 ⁽⁷⁾	4,1 ± 1,7 ⁽⁷⁾
3	4	60,0	12,52 ± 0,41 ⁽⁸⁾	11,59 ± 0,44 ⁽⁸⁾	7,5 ± 1,6 ⁽⁸⁾
4	2	120,0	12,05 ± 0,74 ⁽⁷⁾	11,72 ± 0,74 ⁽⁷⁾	2,7 ± 0,7 ⁽⁷⁾
5	1	240,0	13,86 ± 0,47 ⁽⁶⁾	13,29 ± 0,31 ⁽⁶⁾	4,1 ± 1,1 ⁽⁶⁾
6	0,5	480,0	12,63 ± 0,77 ⁽⁵⁾	12,53 ± 0,67 ⁽⁵⁾	0,8 ± 0,7 ⁽⁵⁾

DQO_{aflu}: DQO afluente; DQO_{efflu}: DQO efluente.

Os números entre parênteses referem-se ao número de amostras utilizadas para média.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

Figura 5.6 – Boxplot das remoções de DQO no RA.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

Com o objetivo de produzir hidrogênio, apenas os açúcares são convertidos, produzindo metabólitos (ácidos e álcoois) que não são oxidados por completo para a produção de metano. Assim, os baixos valores médios da conversão de matéria orgânica estão relacionados à eficiência de remoção de açúcares e correspondem à fração de matéria orgânica que foi convertida em CO_2 , H_2 e metabólitos, estes representados pela DQO efluente em conjunto com outros compostos não convertidos.

Ferreira (2014) ao avaliar a produção de H_2 em RALF termofílico, a partir de glicerol bruto, obteve valores médios de remoção de DQO entre 17,7 e 13,6 % para os TDH de 14 a 4 h, seguindo por um decréscimo na eficiência no TDH de 2h (10,4 %) e 1h (11,0 %). A redução na eficiência da DQO no TDH de 1 h está relacionada ao choque de carga orgânica aplicada aos reatores, o que, de acordo com Aquino e Chernicharo (2005), forneceria mais energia aos microrganismos acidogênicos, resultando em maior produção de H_2 e ácidos orgânicos.

A elevada concentração de matéria orgânica verificada no efluente do reator e o aumento na produção de H_2 com a redução do TDH aplicado evidenciam boas condições para a produção contínua de metano em sistema seqüencial (reator acidogênico associado a reator metanogênico) a partir de glicerol em condições termofílicas.

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).

Os valores de pH medidos nas amostras afluentes e efluentes ao longo das diferentes condições operacionais são apresentados na Tabela 5.13.

Tabela 5.13 – Valores médios de pH afluente e efluente para o RA.

Fase	TDH (h)	TCO (kg m ⁻³ d ⁻¹)	pH _{afluente}	pH _{efluente}
1	8	30,0	4,81 ± 0,09 ⁽⁴³⁾	4,85 ± 0,08 ⁽⁴³⁾
2	6	40,0	5,10 ± 0,19 ⁽²³⁾	4,93 ± 0,07 ⁽²³⁾
3	4	60,0	5,43 ± 0,16 ⁽²⁶⁾	4,93 ± 0,13 ⁽²⁷⁾
4	2	120,0	5,44 ± 0,14 ⁽³²⁾	4,99 ± 0,12 ⁽³¹⁾
5	1	240,0	5,33 ± 0,13 ⁽²⁹⁾	5,02 ± 0,08 ⁽²⁹⁾
6	0,5	480,0	5,37 ± 0,08 ⁽²⁶⁾	5,06 ± 0,10 ⁽²⁶⁾

Os números entre parênteses referem-se ao número de amostras utilizadas para média.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

Observa-se que tanto os valores de pH afluente quanto o pH efluente mantiveram-se similares e constantes durante as diferentes condições operacionais dentro da faixa estabelecida entre $4,81 \pm 0,09$ e $5,44 \pm 0,14$, no afluente e entre $4,85 \pm 0,08$ e $5,06 \pm 0,10$, no efluente. O controle do pH afluente foi realizado pela adição de solução de HCl 30% (máximo de 2 mL L^{-1}) e, se necessário, adição de $\text{CH}_3\text{COOH P.A.}$, para que o pH efluente se mantivesse na faixa de 4,5 – 5,0, o que é tido como um pH ótimo para a produção de H_2 (AMORIM et al., 2009; ROSA et al., 2014; NAZARETH, 2015). No trabalho realizado por Reungsang et al., (2013) operando reator UASB com glicerol bruto, o pH efluente foi mantido entre 4,3 e 5,0, valores próximos ao observado nesta pesquisa.

A mínima concentração de sólidos suspensos verificada no efluente do RA 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 $0,09 \pm 0,01$ a $0,15 \pm 0,02 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, conforme se pode observar na Tabela 5.14.

Tabela 5.14 – Valores médios de Sólidos suspensos totais (SST), fixos (SSF) e voláteis (SSV) no efluente do RA.

Fase	TDH (h)	TCO (kg m ⁻³ d ⁻¹)	SST (µg L ⁻¹)	SSF (µg L ⁻¹)	SSV (µg L ⁻¹)	SSV' (%)
1	8	30,0	0,26 ± 0,05 ⁽⁷⁾	0,14 ± 0,04 ⁽⁷⁾	0,15 ± 0,02 ⁽⁷⁾	59,2 ± 12,5 ⁽⁷⁾
2	6	40,0	0,19 ± 0,03 ⁽⁷⁾	0,07 ± 0,01 ⁽⁷⁾	0,14 ± 0,01 ⁽⁷⁾	71,4 ± 12,7 ⁽⁷⁾
3	4	60,0	0,17 ± 0,02 ⁽⁵⁾	0,07 ± 0,01 ⁽⁵⁾	0,12 ± 0,03 ⁽⁵⁾	71,9 ± 17,6 ⁽⁵⁾
4	2	120,0	0,16 ± 0,03 ⁽⁸⁾	0,07 ± 0,02 ⁽⁸⁾	0,10 ± 0,01 ⁽⁸⁾	63,0 ± 11,6 ⁽⁸⁾
5	1	240,0	0,16 ± 0,01 ⁽⁶⁾	0,07 ± 0,01 ⁽⁶⁾	0,09 ± 0,01 ⁽⁶⁾	58,9 ± 9,9 ⁽⁶⁾
6	0,5	480,0	0,17 ± 0,02 ⁽⁵⁾	0,06 ± 0,01 ⁽⁵⁾	0,11 ± 0,02 ⁽⁵⁾	65,8 ± 13,2 ⁽⁵⁾

SST: Sólidos Suspensos Totais; SSF: Sólidos Suspensos Fixos; SSV: Sólidos Suspensos Voláteis.
Os números entre parênteses referem-se ao número de amostras utilizadas para média.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

Diante dos resultados obtidos na Tabela 5.14, 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 total dos metabólitos solúveis presentes no efluente, do glicerol remanescente e dos sólidos suspensos voláteis (SSV). A diferença entre a DQO total e a DQO medida no reator são apresentados na Tabela 5.15. Pode-se notar que nas fases operacionais (1, 3, 4 e 5), a diferença percentual apresenta-se relativamente baixa, porém nas fases (2 e 6) a diferença é maior, o que indica que podem ter ocorrido erros ou imprecisões na amostragem dos metabólitos.

Tabela 5.15 – Balanço de DQO para as 6 fases operacionais realizadas no RA.

Fase	DQO (mg DQO L ⁻¹)													DQO _{total}	DQO _{medida}	Dif. (%)
	1,3-PDO	MetOH	EtOH	ButOH	HAc	HPr	HIsoBu	HBu	HIsoVa	HVa	HCa	G _{eflu} '	SSV			
1	88,46	107,14	0,00	268,98	0,00	385,85	68,76	2598,29	28,48	25,97	29,36	9215,07	0,00	12816,35	12407,59	+3,3
2	2737,88	114,09	66,22	330,55	0,00	452,71	84,33	2630,45	28,25	29,37	14,51	8115,34	0,00	14603,70	11036,43	+32,3
3	520,37	106,19	0,00	329,64	0,00	484,09	66,13	2632,52	46,20	150,95	35,68	8419,02	0,00	12790,79	11585,17	+10,4
4	119,01	109,72	0,00	330,02	0,00	451,70	80,87	2705,59	42,50	44,41	25,78	8915,63	0,00	12825,22	11722,41	+9,4
5	171,88	116,08	0,00	333,97	0,00	468,38	62,01	2680,28	38,14	66,81	32,46	9796,34	0,00	13766,34	13291,33	+3,6
6	0,00	241,73	0,00	600,46	243,00	882,37	72,06	2146,82	35,49	5,47	0,00	10716,06	0,00	14943,46	12528,63	+19,3

1,3-PDO: 1,3-propanodiol; MetOH: metanol; EtOH: etanol; ButOH: butanol; HAc: ácido acético; HPr: ácido propiônico; HIsoBu: ácido isobutírico; HBu: ácido butírico; HIsoVa: ácido isovalérico; HVa: ácido valérico; HCa: ácido capríco; G_{eflu}': glicerol efluente em DQO; SSV: sólidos suspensos voláteis.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

5.2 RALF METANOGÊNICO – RM1 e RM2

Neste tópico estão descritos os aspectos relativos à produção de CH₄ em temperatura termofílica (55 °C) utilizando glicerol bruto como substrato orgânico. A operação do RM1 foi realizada variando-se a concentração afluyente de glicerol entre 1,0 e 7,0 g L⁻¹ e mantendo o TDH fixo em 24 h. O RM2, por outro lado, foi operado mantendo a concentração afluyente de glicerol constante em 10,0 g L⁻¹, variando-se o TDH entre 36 e 6 h. A operação dos dois reatores foi realizada em seis fases operacionais, conforme exposto na Tabela 5.16.

Tabela 5.16 – Descrição das fases de operação do RM1 e RM2 e suas características.

Fase	TDH (h)	TCO (kg m ⁻³ d ⁻¹)	Vazão (mL h ⁻¹)	Tempo de Operação (dia)
RM1				
1		1,0		22
2		2,0		21
3	24	3,0	64,7	38
4		4,0		38
5		5,0		26
6		7,0		29
RM2				
1	36	6,7	43,1	43
2	30	8,0	51,7	23
3	24	10,0	64,7	38
4	18	13,3	86,2	38
5	12	20,0	129,3	26
6	6	40,0	258,6	29

RM1: Concentração afluyente de glicerol = 1,0 a 7,0 g L⁻¹

RM2: Concentração afluyente de glicerol = 10,0 g L⁻¹

Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

5.2.1 Consumo de glicerol

Os valores médios das concentrações afluyente e efluyente de glicerol, além das conversões de glicerol nas diferentes condições operacionais impostas aos dois reatores, estão apresentados na Tabela 5.17.

Tabela 5.17 – Concentrações e conversões médias de glicerol no RM1 e RM2.

Fase	TDH (h)	TCO (kg m ⁻³ d ⁻¹)	G _{aflu} (g L ⁻¹)	G _{eflu} (g L ⁻¹)	Conversão (%)
RM1					
1		1,0	0,91 ± 0,02 ⁽¹⁰⁾	0,04 ± 0,01 ⁽¹⁰⁾	95,4 ± 0,5 ⁽¹⁰⁾
2		2,0	1,86 ± 0,10 ⁽¹⁶⁾	0,04 ± 0,00 ⁽¹⁶⁾	97,8 ± 0,2 ⁽¹⁶⁾
3	24	3,0	2,79 ± 0,28 ⁽¹⁸⁾	0,04 ± 0,01 ⁽¹⁸⁾	98,5 ± 0,3 ⁽¹⁸⁾
4		4,0	3,73 ± 0,25 ⁽²¹⁾	0,05 ± 0,02 ⁽²¹⁾	98,7 ± 0,6 ⁽²¹⁾
5		5,0	4,87 ± 0,36 ⁽¹⁵⁾	0,04 ± 0,00 ⁽¹⁵⁾	99,1 ± 0,1 ⁽¹⁵⁾
6		7,0	6,60 ± 0,28 ⁽¹⁴⁾	0,05 ± 0,02 ⁽¹⁴⁾	99,2 ± 0,3 ⁽¹⁴⁾
RM2					
1	36	6,7	9,94 ± 0,38 ⁽²³⁾	0,06 ± 0,02 ⁽²³⁾	99,4 ± 0,2 ⁽²³⁾
2	30	8,0	9,43 ± 0,48 ⁽¹⁶⁾	0,11 ± 0,11 ⁽¹⁶⁾	98,8 ± 1,1 ⁽¹⁶⁾
3	24	10,0	9,19 ± 0,86 ⁽¹⁸⁾	0,18 ± 0,13 ⁽¹⁸⁾	98,0 ± 1,4 ⁽¹⁸⁾
4	18	13,3	9,53 ± 0,75 ⁽¹²⁾	0,49 ± 0,17 ⁽¹²⁾	94,8 ± 1,8 ⁽¹²⁾
5	12	20,0	9,69 ± 0,54 ⁽¹³⁾	0,66 ± 0,41 ⁽¹³⁾	93,2 ± 4,2 ⁽¹³⁾
6	6	40,0	9,21 ± 0,34 ⁽¹⁵⁾	2,00 ± 0,38 ⁽¹⁵⁾	78,3 ± 3,8 ⁽¹⁵⁾

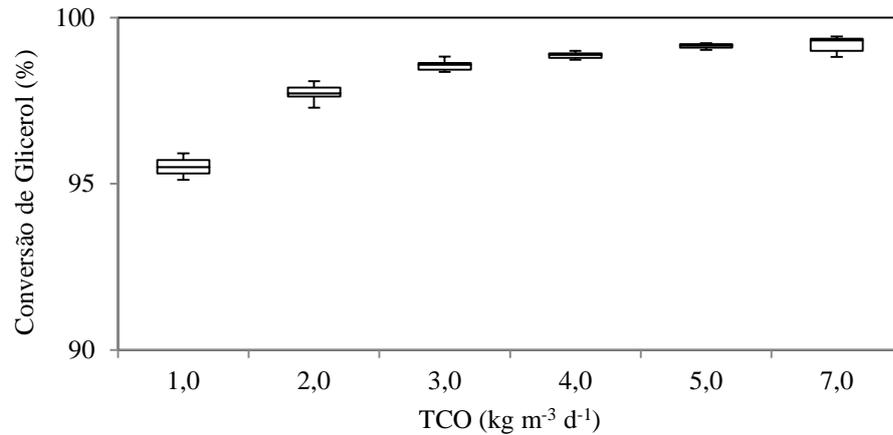
G_{aflu}: Glicerol afluente; G_{eflu}: Glicerol efluente.

Os números entre parênteses referem-se ao número de amostras utilizadas para média.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

A concentração afluente de glicerol no RM1 variou entre $0,91 \pm 0,02$ e $6,60 \pm 0,28$ g L⁻¹ enquanto o intervalo de concentração efluente foi de $0,04 \pm 0,01$ a $0,05 \pm 0,02$ g L⁻¹. O aumento da TCO de 1,0 para 7,0 kg m⁻³ d⁻¹ não influenciou o consumo de glicerol, mantendo a conversão de glicerol constante e elevada (>95%) ao longo da operação do reator, conforme Tabela 5.17 e Figura 5.7.

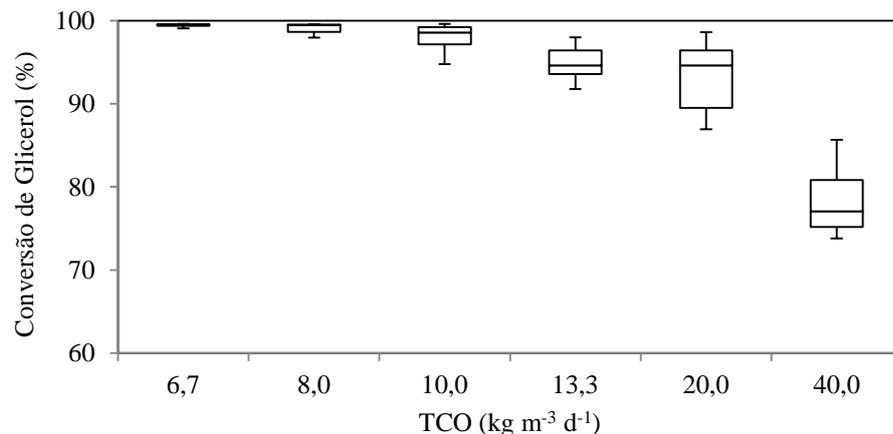
Figura 5.7 – Boxplot das conversões de glicerol no RM1.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

A concentração afluyente de glicerol no RM2 permaneceu entre $9,94 \pm 0,38$ e $9,21 \pm 0,34$ g L⁻¹ enquanto o intervalo de concentração efluyente foi de $0,06 \pm 0,02$ a $2,00 \pm 0,38$ g L⁻¹. A redução do TDH de 36 para 12 h e conseqüente aumento da TCO de 6,7 para 20,0 kg m⁻³ d⁻¹ promoveu ligeira diminuição no consumo de glicerol, o qual manteve-se superior a 93% ao longo das cinco primeiras fases de operação. Porém, com a diminuição do TDH para 6 h (TCO de 40,0 kg m⁻³ d⁻¹), os valores de conversão de glicerol foram reduzidos para $78,3 \pm 3,8\%$, evidente na Tabela 5.17 e Figura 5.8.

Figura 5.8 – Boxplot das conversões de glicerol no RM2.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

Nos dois reatores a conversão de glicerol manteve-se acima de 90% em todas as fases de operação, indicando eu houve boa adaptação da comunidade microbiana acidogênica com o glicerol bruto. Entretanto, no RM2, com a diminuição do TDH para 6 h, o glicerol não foi completamente consumido, o que por sua vez implica, sob estas condições, a fermentação de glicerol foi limitada cineticamente. Outra hipótese para a diminuição na conversão de glicerol no TDH de 6 h é o arraste da biomassa, devido ao baixo TDH aplicado ao RM2.

Alguns trabalhos reportados na literatura destacam suas elevadas conversões de glicerol, como as encontradas neste estudo. Phukingngam et al. (2011) avaliando o desempenho de reatores ABR (27 °C) alcançaram conversão de glicerol entre 98 – 100% aplicando TCO de 0,5 – 1,5 kg DQO m⁻³ d⁻¹. No entanto, o aumento da TCO para 2,1 – 3,0 kg DQO m⁻³ d⁻¹ reduziu a eficiência na remoção de glicerol variando entre 70 – 80%. Além disso, eles reportaram que elevadas concentrações de glicerol podem inibir a sua conversão.

Vlassis et al. (2013), operando CSTR, ao redefinir a TCO para o valor inicial de 0,25 g DQO L⁻¹ d⁻¹ e atingir novamente o estado estacionário, observaram uma concentração de glicerol no efluente inferior a 0,03 g L⁻¹, indicando uma conversão de mais de 99%, visto que a concentração de glicerol afluente era de 5 g L⁻¹. Os mesmos autores, operando um PABR, na TCO de 0,30 g DQO L⁻¹ d⁻¹, também verificaram comportamento semelhante, com conversão superior a 99%.

Zhang et al. (2015) também observaram conversões semelhantes as obtidas neste estudo. Durante a operação do reator CSTR (70 °C) a conversão de glicerol foi superior a 90%, em todas as concentrações de glicerol afluente aplicadas (5,0 - 13,0 g L⁻¹). Os autores concluíram que a elevada taxa de conversão significa alta atividade microbiana para a degradação de glicerol, e inibição limitada pelos produtos de fermentação.

5.2.2 Remoção de DQO

Os valores médios da DQO afluente e efluente, além das remoções de DQO e taxas de carregamento orgânico removidas (TCO_{removida}) nas diferentes condições operacionais impostas aos dois RALF metanogênicos, estão apresentados na Tabela 5.18.

Tabela 5.18 – DQO (afluente e efluente) e remoções de DQO médias no RM1 e RM2.

Fase	TDH (h)	TCO' (kg DQO m ⁻³ d ⁻¹)	DQO _{afllu} (g DQO L ⁻¹)	DQO _{eflu} (g DQO L ⁻¹)	Remoção (%)	TCO _{removida} ' (kg DQO m ⁻³ d ⁻¹)
RM1						
1		1,0	1,15 ± 0,06 ⁽¹⁰⁾	0,11 ± 0,02 ⁽¹⁰⁾	90,3 ± 2,2 ⁽¹⁰⁾	1,0 ± 0,1 ⁽¹⁰⁾
2		2,0	2,15 ± 0,18 ⁽¹⁵⁾	0,14 ± 0,05 ⁽¹⁵⁾	93,7 ± 1,8 ⁽¹⁵⁾	2,0 ± 0,1 ⁽¹⁵⁾
3	24	3,0	3,48 ± 0,32 ⁽¹⁶⁾	0,21 ± 0,03 ⁽¹⁶⁾	94,0 ± 0,8 ⁽¹⁶⁾	3,3 ± 0,3 ⁽¹⁶⁾
4		4,0	4,69 ± 0,34 ⁽¹²⁾	0,92 ± 0,18 ⁽¹²⁾	80,4 ± 3,2 ⁽¹²⁾	3,8 ± 0,3 ⁽¹²⁾
5		5,0	6,32 ± 0,21 ⁽⁹⁾	1,87 ± 0,13 ⁽⁹⁾	70,4 ± 2,1 ⁽⁹⁾	4,5 ± 0,2 ⁽⁹⁾
6		7,0	7,98 ± 0,46 ⁽¹⁰⁾	3,00 ± 0,21 ⁽¹⁰⁾	62,3 ± 3,5 ⁽¹⁰⁾	5,0 ± 0,5 ⁽¹⁰⁾
RM2						
1	36	6,7	12,41 ± 0,52 ⁽¹⁰⁾	7,96 ± 0,50 ⁽¹⁰⁾	36,0 ± 2,1 ⁽¹⁰⁾	3,0 ± 0,2 ⁽¹⁰⁾
2	30	8,0	11,06 ± 1,06 ⁽⁸⁾	7,29 ± 0,97 ⁽⁸⁾	34,1 ± 5,1 ⁽⁸⁾	3,0 ± 0,5 ⁽⁸⁾
3	24	10,0	11,57 ± 0,78 ⁽¹⁰⁾	9,18 ± 0,76 ⁽¹⁰⁾	20,5 ± 5,7 ⁽¹⁰⁾	2,4 ± 0,7 ⁽¹⁰⁾
4	18	13,3	11,66 ± 0,67 ⁽¹¹⁾	9,47 ± 0,59 ⁽¹¹⁾	18,8 ± 2,8 ⁽¹¹⁾	2,9 ± 0,5 ⁽¹¹⁾
5	12	20,0	12,90 ± 0,88 ⁽⁹⁾	10,82 ± 0,74 ⁽⁹⁾	16,1 ± 2,9 ⁽⁹⁾	4,2 ± 0,9 ⁽⁹⁾
6	6	40,0	11,02 ± 0,22 ⁽¹⁰⁾	9,88 ± 0,28 ⁽¹⁰⁾	10,3 ± 2,5 ⁽¹⁰⁾	4,6 ± 1,1 ⁽¹⁰⁾

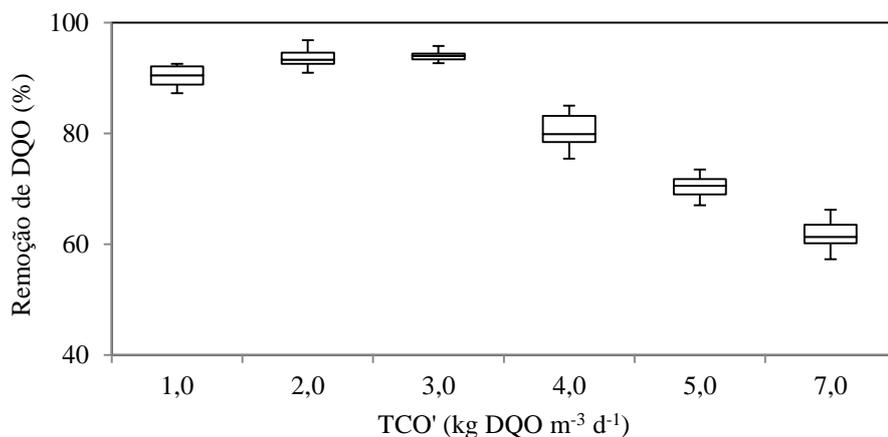
DQO_{afllu}: DQO afluente; DQO_{eflu}: DQO efluente.

Os números entre parênteses referem-se ao número de amostras utilizadas para média.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

O plano de operação do RM1 teve como meta elevar gradativamente a TCO' até alcançar o valor máximo de projeto (7,0 kg DQO m⁻³ d⁻¹). A Tabela 5.18 e Figura 5.9 apresentam a variação da DQO afluente e efluente, além da eficiência de remoção de matéria orgânica em função da TCO aplicada. Durante a operação nas três primeiras fases o RM1 apresentou desempenho estável, com variação da eficiência de remoção de matéria orgânica entre 90,3 ± 2,2 e 94,0 ± 0,8%. Porém, houve diminuição na remoção de matéria orgânica para 80,4 ± 3,2, 70,4 ± 2,1 e 62,3 ± 3,5% com o aumento da TCO' para 4,0, 5,0 e 7,0 kg DQO m⁻³ d⁻¹, respectivamente.

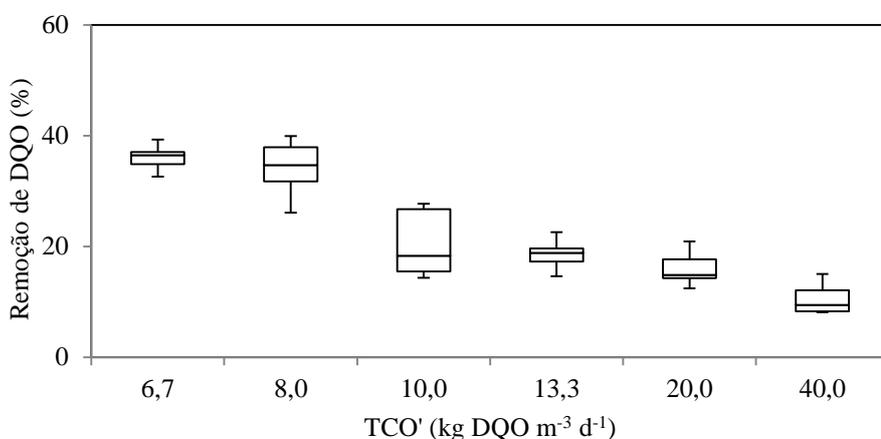
Figura 5.9 – Boxplot das remoções de DQO no RM1.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

A fim de avaliar a redução do TDH sobre a remoção de matéria orgânica, o RM2 apresentou baixo desempenho no que tange à remoção de DQO durante o experimento. Conforme a Tabela 5.18 e Figura 5.10, com a diminuição do TDH de 36 para 30 h e consequente aumento da TCO' de 6,7 para 8,0 kg DQO m⁻³ d⁻¹, a remoção de DQO apresentou valores constantes de $36,0 \pm 2,1$ e $34,1 \pm 5,1\%$, respectivamente. Entretanto, com a diminuição do TDH para 24, 18, 12 e posteriormente 6 h (aumento da TCO' de 10,0 para 40,0 kg DQO m⁻³ d⁻¹), houve queda na remoção de DQO para $20,5 \pm 5,7$, $18,8 \pm 2,8$, $16,1 \pm 2,9$ e $10,3 \pm 2,5\%$, respectivamente.

Figura 5.10 – Boxplot das remoções de DQO no RM2.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

As baixas remoções de DQO alcançadas pelo RM2 apontam uma sobrecarga da biomassa, possivelmente metanogênica, em responder ao aumento da carga orgânica, fato também observado por Bodik et al. (2008) e Hutnan et al. (2013a). Entretanto, a deterioração do processo parece ter sido mais influenciada pela diminuição do TDH. Uma hipótese é de que o aumento da vazão do resíduo dentro do reator, ocasionado pela redução do TDH, pode ter provocado o “washout” ou lavagem da biomassa.

Outra hipótese para as baixas remoções e DQO obtidas no RM2 é o fato da biomassa utilizada, proveniente de lodo metanogênico termofílico de reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB) utilizado para o tratamento de vinhaça, estar adaptada a este resíduo, o qual apresenta DQO total de 25,0 g DQO L⁻¹ e baixa concentração de glicerol (2,0 g L⁻¹). Fazendo um paralelo com os valores de remoção de DQO obtidos pelo RM1, observam-se valores elevados, porém obtidos sob baixas cargas orgânicas, quando comparado as cargas aplicadas no RM2.

Tal fenômeno também foi observado por Albuquerque (2014), que avaliou a redução do TDH (24 – 12 h) sobre a remoção de matéria orgânica residual, comparando o desempenho de reatores UASB sob temperatura de 35 °C e reatores UASB mantidos à temperatura ambiente, ambos alimentados com glicerol bruto (1,0 g L⁻¹). Nas duas situações, a diminuição do TDH de 24 para 12 h foi capaz de prejudicar significativamente o desempenho dos reatores em relação à remoção de DQO. Porém, Nuchdang et al. (2012) avaliando o efeito do aumento da carga orgânica através da diminuição progressiva do TDH, verificaram que a diminuição da eficiência de remoção de matéria orgânica foi temporária, se reestabelecendo após alguns dias na nova situação.

De forma similar ao observado no RM1, Yang et al. (2008) operando reatores de leito fixo (55 °C), verificaram que com o aumento da TCO de 0,25 para 0,7 kg DQO m⁻³ d⁻¹, a remoção de DQO manteve-se estável entre 80,6 - 90,0%. Quando a TCO foi aumentada para 1,0 g L⁻¹ d⁻¹, a eficiência de remoção de DQO máxima foi de 86,7%. Os autores também concluíram que a eficiência de remoção de DQO foi estável e mais elevada em condições termofílicas do que mesofílicas, durante o período de fermentação contínua.

Bezerra et al. (2011) operando um reator AnSBBR (30 °C), observaram que o aumento da TCO resultou em queda na eficiência de remoção de matéria orgânica e aumento na concentração de AGV no efluente. As TCO de 1,5 - 6,0 g DQO L⁻¹ d⁻¹ resultaram em eficiências de remoção de 92 – 50%, respectivamente.

A influência do aumento da TCO sobre a remoção de matéria orgânica também foi estudada por Lovato et al. (2012), que avaliaram o efeito de diferentes tempos de alimentação sobre a performance de um reator AnSBBR (30 °C). As maiores eficiências de remoção de matéria orgânica obtidas foram na TCO de 4,5 g DQO L⁻¹ d⁻¹ de 87%, em tempo de alimentação de 4 h. Os autores concluíram que os tempos de alimentação mais longos favorecerão a minimização da concentração total de AGV durante o ciclo, assim como no efluente, garantindo a estabilidade e a segurança do processo.

Vlassis et al. (2012) em um reator CSTR (35 °C), observaram que o aumento da TCO (0,25 - 0,5 g DQO L⁻¹ d⁻¹), diminuiu a produção de metano gradualmente, acompanhado pela redução da conversão de DQO e acúmulo de AGV (cerca de 3,0 g DQO L⁻¹). Quando a TCO foi reduzida e redefinida para a condição inicial de 0,25 g DQO L⁻¹ d⁻¹, o sistema atingiu novamente o estado estacionário e a remoção de DQO alcançou 94%. Vlassis et al. (2013) verificaram o mesmo comportamento no reator PABR (35 °C), sob variação da TCO (1,0 – 3,75 g DQO L⁻¹ d⁻¹). Quando a TCO alcançou 3,75 g DQO L⁻¹ d⁻¹, houve acúmulo de AGV e o sistema entrou em colapso. Com isso, a TCO foi redefinida para 3,0 g DQO L⁻¹ d⁻¹, obtendo remoção de DQO de 95%.

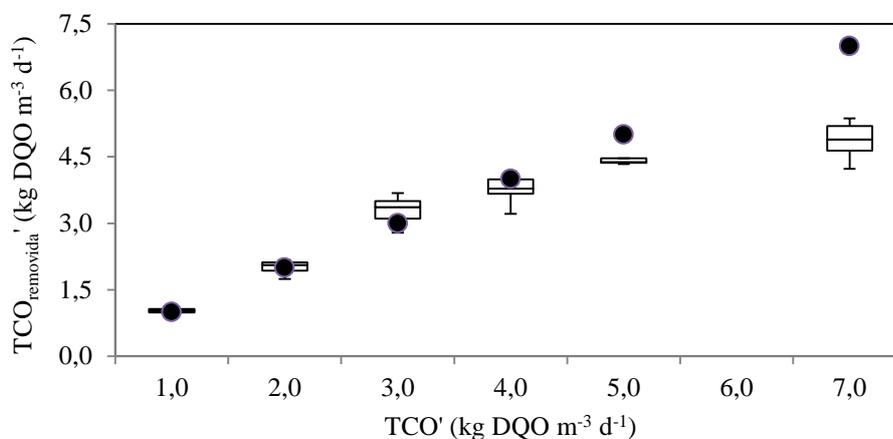
No trabalho de Boonsawang et al. (2015), em reator metanogênico considerando de fase única, operado com TDH e TCO de 46 h e 8,8 g DQO L⁻¹ d⁻¹, respectivamente, alcançaram remoção de DQO de 87,1%. Verifica-se que este resultado foi elevado quando comparado às remoções obtidas pelo RM1 e RM2 durante toda a operação, entretanto os autores adotaram como estratégia de operação a utilização de elevado TDH, possibilitando um maior contato entre os microrganismos e o substrato.

Para complementar e compreender o comportamento da remoção de DQO nos RALF metanogênicos analisou-se também, o efeito do parâmetro taxa de carregamento orgânico aplicada (TCO') sobre a taxa de carregamento orgânico removida (TCO_{removida}').

A taxa de carregamento orgânico removida (TCO_{removida}') 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 fórmula (2), apresentada no tópico 4.10 desta dissertação.

Na Tabela 5.18 e Figura 5.11 compara-se o efeito da taxa de carregamento orgânico aplicada (TCO') sobre a taxa de carregamento orgânico removida (TCO_{removida}') nas fases de operação do RM1.

Figura 5.11 – Boxplot das relações entre taxa de carregamento orgânico aplicada (TCO') e taxa de carregamento orgânico removida ($TCO_{removida}'$) para o RM1.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

Nota-se no RM1, que o comportamento gráfico ideal da relação das variáveis TCO' e $TCO_{removida}'$ é um comportamento linear, em que a $TCO_{removida}'$ é diretamente proporcional a TCO' (pontos cheios na Figura 5.11). Ainda diante da Figura 5.11, é possível observar que a $TCO_{removida}'$ variou de $1,04 \pm 0,07$ a $4,98 \pm 0,53$ kg DQO m⁻³ d⁻¹, atingindo o seu valor máximo na última fase operacional (fase 6). Comparando-se os valores ideais (pontos cheios na Figura 5.11) e os obtidos no presente trabalho para a $TCO_{removida}'$, verifica-se a tendência de desequilíbrio do reator em função da sobrecarga orgânica a partir da aplicação da TCO' de 7,0 kg DQO m⁻³ d⁻¹. Logo, pode-se inferir que não houve mudança no “modelo cinético global”, o que indica que as velocidades estão sendo aumentadas proporcionalmente às quantidades alimentadas de substrato.

Em relação ao RM2 (Tabela 5.18), operado sem adaptação, observa-se que houve sobrecarga em todas as fases operacionais, uma vez que o aumento na taxa de carregamento orgânico aplicada (TCO') não foi proporcional a taxa de carregamento orgânico removida ($TCO_{removida}'$), o que indica que houve limitação cinética do sistema e elevado desequilíbrio do reator.

Comparando-se o ensaio 6 (6ª fase operacional) do RM1 e o ensaio 1 (1ª fase operacional) do RM2, ambos sob a mesma taxa de carregamento orgânico aplicada (7,0 e 6,7 kg DQO m⁻³ d⁻¹, respectivamente), é possível observar que o RM1 apresentou valores superiores de remoção de DQO e taxa de carregamento orgânico removida ($TCO_{removida}'$), o que pode ser explicado pela estratégia de adaptação em diferentes concentrações afluente de

glicerol utilizada durante a operação do RM1. A análise detalhada a respeito da comparação dos indicadores de desempenhos dos RALF metanogênicos sob a mesma taxa de carregamento orgânico aplicada será abordada no item 5.2.7.

5.2.3 Avaliação do pH, alcalinidade bicarbonato e ácidos graxos voláteis

Os parâmetros pH, alcalinidade bicarbonato e ácidos graxos voláteis estão intimamente relacionados entre si, sendo igualmente importantes para o controle e a operação adequada dos processos anaeróbios. Os valores dos parâmetros pH e AB (afluente e efluente) para o RM1 e RM2 estão apresentados na Tabela 5.19.

Tabela 5.19 – Valores médios de pH e AB afluente e efluente para o RM1 e RM2.

Fase	TDH (h)	TCO' (kg DQO m ⁻³ d ⁻¹)	pH _{afluente}	pH _{efluente}	AB _{afluente} (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	AB _{efluente} (mg CaCO ₃ L ⁻¹)
RM1						
1		1,0	7,72 ± 0,13 ⁽¹⁶⁾	7,96 ± 0,27 ⁽¹⁶⁾	607 ± 46 ⁽³⁾	794 ± 31 ⁽¹⁰⁾
2		2,0	7,94 ± 0,11 ⁽²¹⁾	7,98 ± 0,24 ⁽²¹⁾	1172 ± 27 ⁽³⁾	1321 ± 81 ⁽¹⁵⁾
3	24	3,0	7,98 ± 0,09 ⁽²⁶⁾	7,91 ± 0,11 ⁽²⁶⁾	1670 ± 69 ⁽⁴⁾	1893 ± 59 ⁽¹⁸⁾
4		4,0	8,07 ± 0,07 ⁽³²⁾	7,97 ± 0,13 ⁽³¹⁾	2232 ± 33 ⁽⁴⁾	2327 ± 127 ⁽⁹⁾
5		5,0	8,13 ± 0,06 ⁽²⁶⁾	7,99 ± 0,08 ⁽²⁶⁾	2821 ± 91 ⁽³⁾	2934 ± 108 ⁽⁸⁾
6		7,0	8,15 ± 0,09 ⁽²⁹⁾	8,03 ± 0,16 ⁽²⁷⁾	4160 ± 171 ⁽³⁾	3773 ± 89 ⁽¹¹⁾
RM2						
1	36	6,7	8,20 ± 0,11 ⁽⁴³⁾	7,73 ± 0,34 ⁽⁴³⁾	4052 ± 168,57 ⁽⁴⁾	1334 ± 75 ⁽⁹⁾
2	30	8,0	8,17 ± 0,06 ⁽²³⁾	7,71 ± 0,30 ⁽²³⁾	3856 ± 52,29 ⁽³⁾	1334 ± 166 ⁽⁸⁾
3	24	10,0	8,15 ± 0,07 ⁽²⁵⁾	7,53 ± 0,16 ⁽²⁶⁾	3950 ± 170 ⁽⁴⁾	1188 ± 56 ⁽⁹⁾
4	18	13,3	8,14 ± 0,04 ⁽²⁴⁾	7,44 ± 0,20 ⁽²⁴⁾	3900 ± 42 ⁽⁴⁾	778 ± 110 ⁽⁸⁾
5	12	20,0	8,14 ± 0,06 ⁽²⁴⁾	7,43 ± 0,16 ⁽²⁴⁾	3922 ± 52 ⁽⁵⁾	680 ± 146 ⁽⁸⁾
6	6	40,0	8,05 ± 0,10 ⁽²⁹⁾	7,42 ± 0,22 ⁽²⁷⁾	4062 ± 30 ⁽³⁾	2055 ± 83 ⁽¹⁰⁾

AB_{aflu.}: alcalinidade bicarbonato afluente; AB_{efflu.}: alcalinidade bicarbonato efluente.

Os números entre parênteses referem-se ao número de amostras utilizadas para média.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

Os microrganismos produtores de metano têm um crescimento ótimo na faixa de pH entre 6,6 e 7,4, embora se possa conseguir estabilidade, na formação e metano, em uma faixa mais ampla de pH, entre 6,0 e 8,0. Valores de pH abaixo de 6,0 e acima de 8,3 devem ser evitados, uma vez que estes podem inibir por completo os microrganismos formadores de metano. O pH ótimo depende do tipo de microrganismos envolvido no processo de digestão, como também do tipo de substrato (LETTINGA et al., 1996).

Observa-se pela Tabela 5.19 que os valores médios do pH efluente ($7,91 \pm 0,11 - 8,03 \pm 0,16$) do RM1 estiveram dentro da faixa ideal para a digestão anaeróbia, sendo o pH afluente ($7,72 \pm 0,13 - 8,15 \pm 0,09$) controlado por meio da adição de NaHCO_3 . Para o RM2 os valores médios de pH efluente ($7,42 \pm 0,22 - 7,73 \pm 0,34$) também estiveram dentro da faixa ideal para digestão anaeróbia, porém apresentaram valores inferiores aos verificados no RM1. O ajuste do pH afluente ($8,05 \pm 0,10 - 8,20 \pm 0,11$) foi realizado por meio da adição de NaHCO_3 .

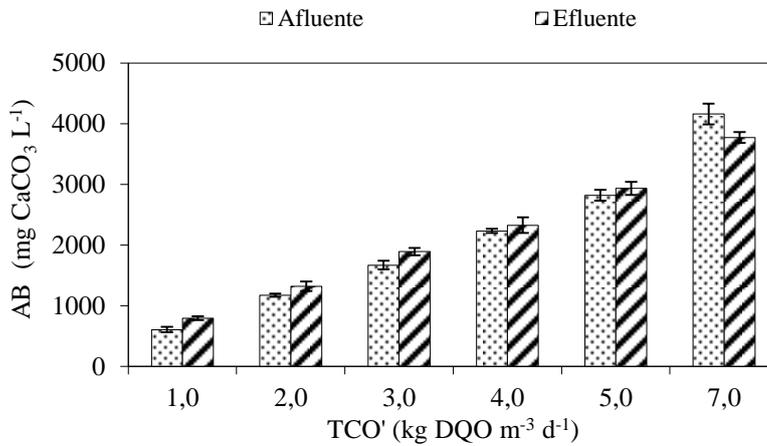
Assim como no presente trabalho, nenhum problema relacionado ao pH foi constatado por Siles López et al. (2009) durante a digestão anaeróbia de glicerol residual, com valores variando entre 7,72 e 7,81, de acordo com os tipos de glicerol e inóculo utilizados nos experimentos.

A importância em se adicionar um agente tampão a um sistema degradando glicerol residual foi comprovada por Yang et al. (2008), em que o pH diminuiu gradualmente durante o início da fermentação. No 55º dia, o pH estava em 4,7 e 5,4 sob condições termofílicas e mesofílicas, respectivamente. Após o 55º dia, $4,2 \text{ g L}^{-1}$ de NaHCO_3 foi adicionado a cada reator para aumentar a capacidade tampão. O pH manteve-se em torno de 7,5 nos reatores termofílicos, No entanto, sob as mesmas condições operacionais, o pH era inferior a 7,0 a partir do 175º dia nos reatores mesofílicos. Houve uma tendência de pH instável e inferior nas condições mesofílicas em relação às condições termofílicas.

Hutňan et al. (2013a) e Hutňan et al. (2013b) também precisaram adicionar NaHCO_3 para aumentar o pH de 6,0 para 7,0 ao degradar glicerol residual utilizando reator anaeróbio de mistura e UASB, mostrando a incapacidade do glicerol residual em neutralizar os ácidos produzidos pelos microrganismos acidogênicos.

Durante a operação dos reatores metanogênicos (RM1 e RM2) o sistema também exigiu a adição de NaHCO_3 como tampão, sendo realizada na relação de $1,0 \text{ g NaHCO}_3 \text{ g}^{-1} \text{ glicerol L}^{-1}$ para o RM1 e $0,7 \text{ g NaHCO}_3 \text{ g}^{-1} \text{ glicerol L}^{-1}$ no RM2. Na Tabela 5.19 e Figura 5.12 observa-se que para o RM1 a AB do efluente mostrou-se superior à do afluente e proporcional ao aumento da TCO' aplicada durante a operação do reator. As concentrações das alcalinidades afluente e efluente variaram entre $607 \pm 46 - 4160 \pm 171 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ e $794 \pm 31 - 3773 \pm 89 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$, respectivamente, indicando geração de AB ao longo do aumento da TCO' de $1,0$ a $5,0 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ e consumo de AB apenas na TCO' de $7,0 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$.

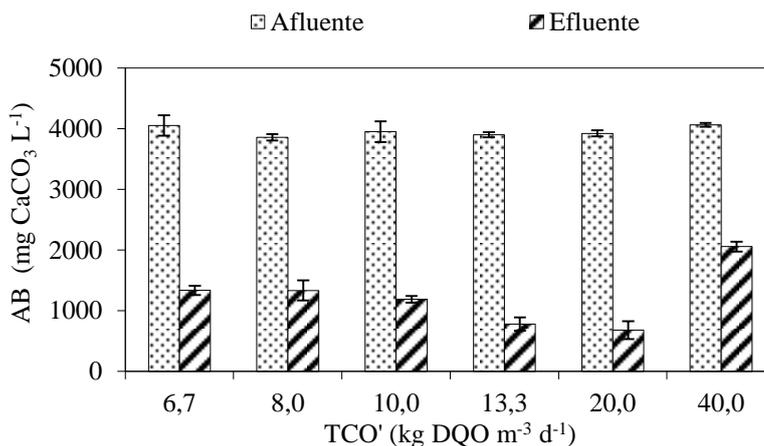
Figura 5.12 – Valores médios de AB afluente e efluente para o RM1.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

Conforme apresentado na Tabela 5.19 e Figura 5.13, para o RM2 a AB do efluente apresentou-se inferior à do afluente com a redução do TDH aplicado e consequente aumento da TCO' aplicada. As concentrações das alcalinidades afluente e efluente variaram entre $3856 \pm 52 - 4062 \pm 30$ mg CaCO₃ L⁻¹ e $680 \pm 146 - 2055 \pm 83$ mg CaCO₃ L⁻¹, respectivamente, indicando consumo de AB ao longo da diminuição do TDH.

Figura 5.13 – Valores médios de AB afluente e efluente para o RM2.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

No trabalho de Bezerra et al. (2011) na TCO de 1,5 e 3,0 g DQO L⁻¹ d⁻¹, a suplementação de alcalinidade para o afluente era de 0,50 g NaHCO₃ g⁻¹ DQO, o que correspondeu a AB média no afluente de 472 e 907 mg CaCO₃ L⁻¹, respectivamente, enquanto na TCO de 4,5 e 6,0 g DQO L⁻¹ d⁻¹, a suplementação de alcalinidade para o afluente era de

1,30 g NaHCO₃ g⁻¹ DQO, o que correspondeu a AB média no afluente de 2802 e 3759 mg CaCO₃ L⁻¹, respectivamente. O pH do efluente manteve-se entre 7,3 a 8,2, indicando que a AB fornecida pelo afluente foi suficiente para neutralizar os ácidos formados e manter a estabilidade em todas as condições impostas.

Segundo Wang et al. (1999) e Ahring et al. (1995), a concentração de AGV é um parâmetro eficiente para indicar instabilidade do processo anaeróbio, pois o acúmulo destes ácidos no sistema indica que eles não estão sendo convertidos a metano na mesma proporção em que estão sendo produzidos. Os valores dos parâmetros AGV e relação AI/AP (afluente e efluente) para o RM1 e RM2 estão apresentados na Tabela 5.20.

Tabela 5.20 – Valores médios de AGV e relação AI/AP afluente e efluente para o RM1 e RM2.

Fase	TDH (h)	TCO' (kg DQO m ⁻³ d ⁻¹)	AGV _{afluente} (mg HAc L ⁻¹)	AGV _{efluente} (mg HAc L ⁻¹)	AI/AP _{afluente}	AI/AP _{efluente}
RM1						
1		1,0	58 ± 4 ⁽³⁾	46 ± 3 ⁽¹²⁾	0,20 ± 0,01 ⁽³⁾	0,29 ± 0,12 ⁽¹²⁾
2		2,0	57 ± 12 ⁽³⁾	46 ± 8 ⁽¹⁵⁾	0,20 ± 0,02 ⁽³⁾	0,32 ± 0,07 ⁽¹⁵⁾
3	24	3,0	60 ± 2 ⁽⁴⁾	49 ± 4 ⁽¹⁸⁾	0,31 ± 0,02 ⁽⁴⁾	0,30 ± 0,06 ⁽¹⁸⁾
4		4,0	59 ± 5 ⁽⁴⁾	110 ± 23 ⁽¹⁵⁾	0,29 ± 0,06 ⁽⁴⁾	0,38 ± 0,03 ⁽¹⁵⁾
5		5,0	63 ± 20 ⁽³⁾	130 ± 10 ⁽¹⁵⁾	0,33 ± 0,04 ⁽³⁾	0,29 ± 0,06 ⁽¹⁵⁾
6		7,0	56 ± 2 ⁽³⁾	383 ± 44 ⁽¹¹⁾	0,19 ± 0,01 ⁽³⁾	0,37 ± 0,05 ⁽¹¹⁾
RM2						
1	36	6,7	92 ± 5 ⁽⁴⁾	2615 ± 232 ⁽¹¹⁾	0,21 ± 0,13 ⁽⁴⁾	1,14 ± 0,10 ⁽¹¹⁾
2	30	8,0	82 ± 2 ⁽³⁾	2846 ± 257 ⁽⁹⁾	0,18 ± 0,03 ⁽³⁾	1,17 ± 0,09 ⁽⁹⁾
3	24	10,0	90 ± 8 ⁽⁴⁾	3006 ± 77 ⁽¹¹⁾	0,21 ± 0,08 ⁽⁴⁾	1,22 ± 0,04 ⁽¹¹⁾
4	18	13,3	85 ± 1 ⁽⁴⁾	3415 ± 123 ⁽¹⁰⁾	0,20 ± 0,07 ⁽⁴⁾	1,36 ± 0,13 ⁽¹⁰⁾
5	12	20,0	73 ± 16 ⁽⁵⁾	3436 ± 161 ⁽¹²⁾	0,21 ± 0,09 ⁽⁵⁾	1,37 ± 0,11 ⁽¹²⁾
6	6	40,0	53 ± 2 ⁽³⁾	1969 ± 81 ⁽¹³⁾	0,20 ± 0,02 ⁽³⁾	0,85 ± 0,09 ⁽¹³⁾

AGV_{aflu.}: ácidos graxos voláteis afluente; AGV_{eflu.}: ácidos graxos voláteis efluente; AI: alcalinidade intermediária; AP: alcalinidade parcial.

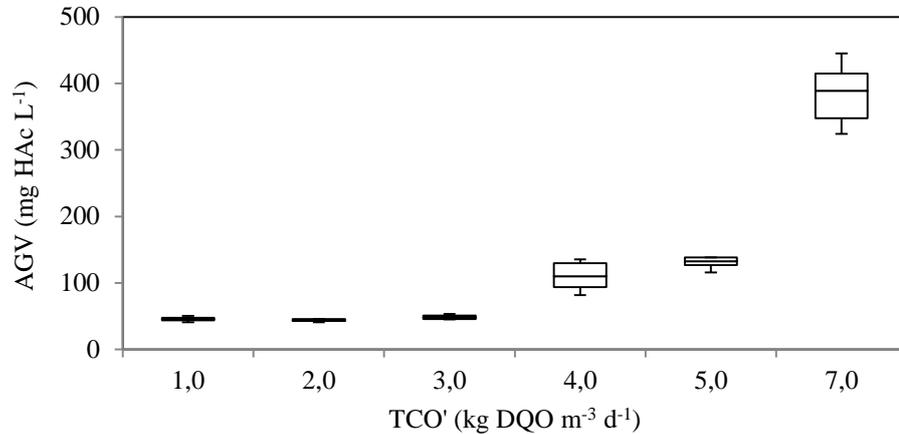
Os números entre parênteses referem-se ao número de amostras utilizadas para média.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

Conforme apresentado na Tabela 5.20 e Figura 5.14, o aumento na TCO' de 1,0 a 3,0 kg DQO m⁻³ d⁻¹ no RM1, não promoveu acúmulo dos AGV produzidos no efluente do reator, os quais foram completamente consumidos, apresentando concentrações de AGV efluente variando entre 46 ± 3 – 49 ± 4 mg HAc L⁻¹. Porém, com o aumento da TCO' para

4,0, 5,0 e 7,0 kg DQO m⁻³ d⁻¹, houve aumento na concentração de AGV no efluente, apresentado valores de 110 ± 23, 130 ± 10 e 383 ± 44 mg HAc L⁻¹, respectivamente.

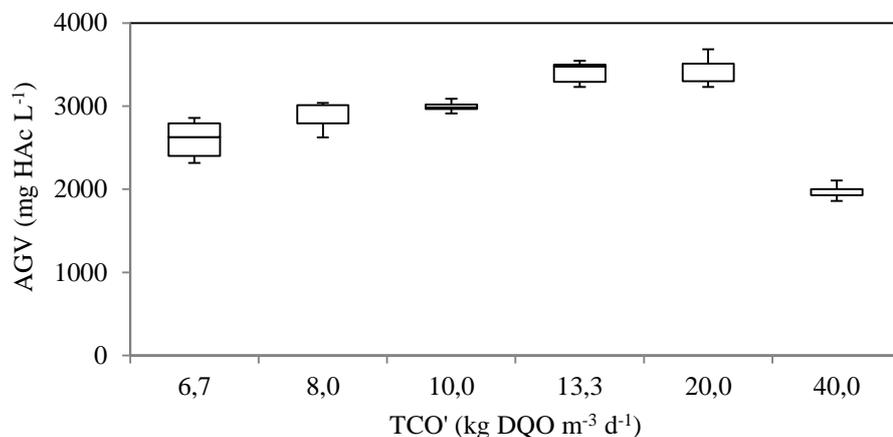
Figura 5.14 – Boxplot das concentrações de AGV no efluente do RM1.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

Na Tabela 5.20 e Figura 5.15 observa-se que a redução no TDH de 36 para 12 h (aumento da TCO' de 6,7 para 20,0 kg DQO m⁻³ d⁻¹) no RM2, promoveu elevado acúmulo de AGV no efluente, apresentando ligeiro aumento ao longo das cinco primeiras fases operacionais, variando entre 2615 ± 232 – 3436 ± 161 mg HAc L⁻¹. Entretanto, a diminuição do TDH para 6 h (TCO' de 40,0 kg DQO m⁻³ d⁻¹), causou redução na concentração de AGV no efluente (1969 ± 81 mg HAc L⁻¹), o que pode ser explicado pela ocorrência de arraste da biomassa, devido ao baixo TDH aplicado.

Figura 5.15 – Boxplot das concentrações de AGV no efluente do RM2.

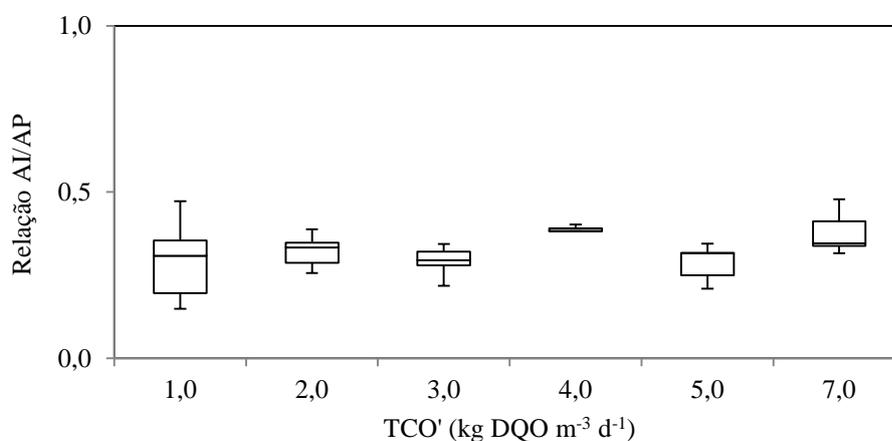


Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

A relação AI/AP é definida como a alcalinidade intermediária, relativa a ácidos voláteis em sua forma ionizada e a alcalinidade parcial, devido principalmente a bicarbonatos (FORESTI, 1994). Ripley et al. (1986) estabelecem a relação AI/AP como um importante parâmetro de monitoramento, já que quanto maior for o valor dessa razão, maior o desbalanceamento ocasionado pela elevada produção de AGV. Eles relatam também que o valor da relação AI/AP, quando se encontra próximo a 0,3, é um indicador de estabilidade do processo, embora Foresti (1994) relate que é possível que a estabilidade do processo ocorra em valores de AI/AP diferentes de 0,3, sendo aconselhável a verificação caso a caso.

A Tabela 5.20 e Figura 5.16 apresentam os valores e o comportamento obtidos para a relação AI/AP relacionados às instabilidades ocorridas ao longo da operação dos reatores. Para o RM1 esta relação apresentou valores constantes, variando entre $0,29 \pm 0,06$ – $0,38 \pm 0,03$ para o efluente desse reator, ao longo do aumento da TCO'. Estes resultados indicam que o RM1 apresentou comportamento estável, mesmo com o aumento na concentração de AGV no efluente, com a elevação da TCO' de 4,0 – 7,0 kg DQO m⁻³ d⁻¹.

Figura 5.16 – Boxplot das relações AI/AP no efluente do RM1.

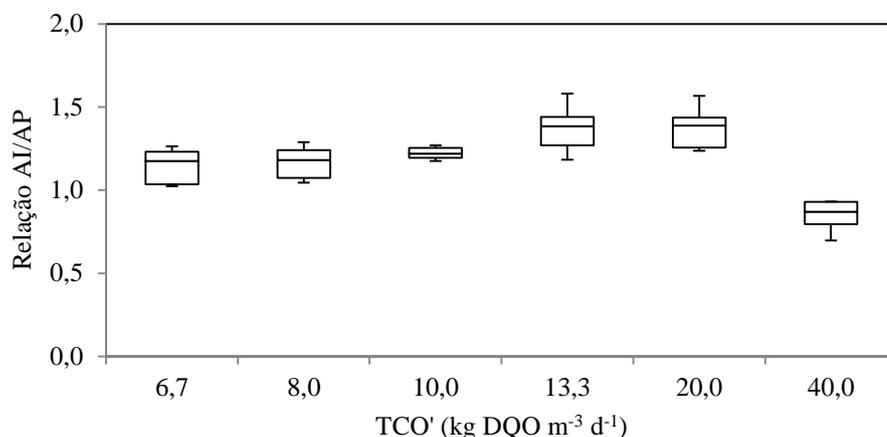


Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

A relação AI/AP manteve-se elevada para o efluente do RM2, apresentando valores crescentes entre $1,14 \pm 0,10$ – $1,37 \pm 0,11$, com a redução do TDH de 36 para 12 h (TCO' de 6,7 – 20,0 kg DQO m⁻³ d⁻¹), acompanhado de elevado acúmulo de AGV no efluente do reator. Já no TDH de 6 h (TCO' de 40,0 kg DQO m⁻³ d⁻¹), a relação AI/AP apresentou diminuição ($0,85 \pm 0,09$), confirmando sua relação direta com a concentração de AGV no efluente, o qual

apresentou diminuição nesta fase. A Tabela 5.20 e Figura 5.17 apresentam os valores e o comportamento obtidos para a relação AI/AP no RM2.

Figura 5.17 – Boxplot das relações AI/AP no efluente do RM2.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

Desse modo, observa-se que a estratégia de operação adotada para adaptação da metanogênese no RM1 apresentou resultados positivos quando comparado à adaptação imposta ao RM2. O aumento na TCO' de 1,0 a 3,0 kg DQO m⁻³ d⁻¹ no RM1 não influenciou a concentração de AGV no efluente, o qual foi completamente consumido, mantendo a eficiência de remoção de DQO elevada (>90%). Porém o aumento da TCO' de 4,0 a 7,0 kg DQO m⁻³ d⁻¹, resultou em ligeiro aumento na concentração de AGV no efluente e consequente diminuição na eficiência de remoção de DQO. Já o RM2 apresentou elevado acúmulo de AGV no efluente com a diminuição do TDH de 36 – 12 h (TCO' de 6,7 – 20,0 kg DQO m⁻³ d⁻¹), apresentando baixa remoção de DQO e valores da relação AI/AP relacionados à instabilidade do sistema. No TDH de 6 h (TCO' de 40,0 kg DQO m⁻³ d⁻¹), houve redução no acúmulo de AGV no efluente, devido ao arraste da biomassa, mas a remoção de DQO permaneceu baixa. Vale ressaltar que mesmo com a diminuição da eficiência de alguns parâmetros (DQO e porcentagem de CH₄ no biogás, por exemplo) o reator não foi considerado em colapso, pois manteve uma constância nos valores de concentração de AGV obtidos, ou seja, sem muitas flutuações. Nota-se a necessidade de um reator sequencial ao RM2 para o consumo desses ácidos acumulados.

Observa-se que mesmo com o acúmulo de AGV no efluente, mediante a aplicação de elevadas TCO' e diminuição do desempenho do reator, o aumento da TCO' foi executado

com o objetivo de caracterizar o comportamento do mesmo, a fim de alcançar uma condição de máxima quantidade tratada de glicerol. Além disso, o trabalho desenvolvido no grupo de pesquisa LCAII/DEQ/UFSCar por Siqueira et al. (2013), com o objetivo de produção de metano em RALF mesofílico utilizando vinhaça como substrato orgânico, aplicou TCO's elevadas no sistema (3,33 a 26,19 kg DQO m⁻³ d⁻¹) e, mesmo com acúmulo de ácidos, verificou produção de metano.

O acúmulo de AGV a partir do aumento da TCO também foi observado por Bezerra et al. (2011), que investigaram o efeito da TCO aplicada sobre a eficiência, estabilidade e produção de metano em um reator AnSBBR (30 °C). O aumento da TCO resultou em queda na eficiência de remoção de matéria orgânica e aumento dos AGV no efluente. As TCO de 1,5 - 6,0 g DQO L⁻¹ d⁻¹ resultaram na elevação da concentração total de AGV no efluente de 42 - 729 mg HAc L⁻¹, respectivamente.

Lovato et al. (2012) investigaram o efeito de diferentes tempos de alimentação (2 – 6 h) sobre a performance de um reator AnSBBR (30 °C). Os autores observaram que o ligeiro aumento nos AGV estava relacionado com a taxa mais elevada em que o afluente era alimentado, que pode ter causado um aumento na velocidade à qual os ácidos são gerados em relação ao aumento dos tempos de alimentação. Na TCO de 4,5 g DQO L⁻¹ d⁻¹ e tempo de alimentação de 2 h (melhor condição para produção de metano), a concentração de AGV foi de 174,5 mg HAc L⁻¹. Valor este superior ao encontrado pelo RM1 na condição de TCO (5,0 kg m⁻³ d⁻¹), próxima à relatada neste estudo.

Vlassis et al. (2012) em um reator CSTR (35 °C), sob diferentes TCO (0,25 - 0,5 g DQO L⁻¹ d⁻¹), observou que na TCO de 0,5 g DQO L⁻¹ d⁻¹ houve aumento na concentração de AGV no efluente, que provocou a queda do pH abaixo de 6,7, causando a inibição da metanogênese e a cessação da produção de metano. A TCO ótima foi então definida como 0,25 g DQO L⁻¹ d⁻¹, na qual a concentração de AGV foi de 0,26 g HAc L⁻¹. Entretanto, os reatores RM1 e RM2 no presente trabalho, suportaram cargas orgânicas superiores as relatadas neste trabalho.

Boonsawang et al. (2015), em reator metanogênico considerando de fase única, operado com TDH e TCO de 46 h, e 8,8 g DQO L⁻¹ d⁻¹ (DQO com afluente de 17,3 g L⁻¹), respectivamente, verificou a concentração de AGV de 3,01 g HAc L⁻¹ no efluente do reator de uma fase. Valor este elevado e próximo ao obtido durante a operação do RM2.

De forma geral, é possível que as inibições termodinâmicas ocasionadas pelo aumento da pressão de hidrogênio (devido ao aumento da atividade fermentativa acidogênica), em

função da maior carga orgânica aplicada, sejam as responsáveis pelo maior acúmulo de AGV no RM2. Assim, sugere-se que a etapa limitante neste cenário seja a acetogênese e metanogênese, as quais ocorrem sabidamente sob pressões reduzidas de hidrogênio (AQUINO e CHERNICHARO, 2005). A baixa atividade destes dois grupos favorece o versátil metabolismo das acidogênicas resultando em acúmulo de subprodutos como os ácidos orgânicos e solventes. Segundo Anderson et al. (1994), uma alternativa para solucionar o problema apresentado por consórcios microbianos presentes em reatores de uma fase (paralelo) seria a utilização de reatores anaeróbios de duas fases (série), capazes de selecionar e enriquecer diferentes tipos de microrganismos separadamente. Tal estratégia possibilitaria, ao mesmo tempo, uma baixa produção de AGV e elevada produção de metano.

5.2.4 Composição do biogás, produtividade volumétrica e rendimento de metano

A produção de metano é um forte indicador do desempenho de um reator anaeróbio, pois caracteriza a atividade metabólica de um sistema metanogênico. A composição de CH₄ no biogás para o RM1 e RM2, está descrita na Tabela 5.21.

Tabela 5.21 – Composição dos componentes do biogás produzido pelo RM1 e RM2.

Fase	TDH (h)	TCO' (kg DQO m ⁻³ d ⁻¹)	C _{CH₄} (mmol L ⁻¹)	C _{CO₂} (mmol L ⁻¹)	CH ₄ (%)	CO ₂ (%)
RM1						
1		1,0	8,76 ± 0,64 ⁽¹⁰⁾	1,42 ± 0,25 ⁽¹⁰⁾	86,2 ± 1,6 ⁽¹⁰⁾	13,8 ± 1,6 ⁽¹⁰⁾
2		2,0	10,04 ± 1,72 ⁽¹¹⁾	2,99 ± 0,74 ⁽¹¹⁾	77,6 ± 2,2 ⁽¹¹⁾	22,4 ± 2,2 ⁽¹¹⁾
3	24	3,0	9,44 ± 2,44 ⁽¹⁸⁾	4,55 ± 1,39 ⁽¹⁸⁾	67,8 ± 1,6 ⁽¹⁸⁾	32,3 ± 1,6 ⁽¹⁸⁾
4		4,0	9,52 ± 2,24 ⁽¹²⁾	5,12 ± 1,26 ⁽¹²⁾	65,2 ± 2,0 ⁽¹²⁾	34,8 ± 2,0 ⁽¹²⁾
5		5,0	8,52 ± 1,26 ⁽¹⁵⁾	4,98 ± 0,81 ⁽¹⁵⁾	63,2 ± 1,3 ⁽¹⁵⁾	36,8 ± 1,3 ⁽¹⁵⁾
6		7,0	8,73 ± 2,80 ⁽¹⁶⁾	6,60 ± 2,07 ⁽¹⁶⁾	57,0 ± 1,9 ⁽¹⁶⁾	43,0 ± 1,9 ⁽¹⁶⁾
RM2						
1	36	6,7	6,17 ± 0,78 ⁽²⁰⁾	5,63 ± 0,90 ⁽²⁰⁾	52,2 ± 3,6 ⁽²⁰⁾	47,8 ± 3,6 ⁽²⁰⁾
2	30	8,0	5,31 ± 1,24 ⁽¹³⁾	5,66 ± 1,28 ⁽¹³⁾	48,2 ± 6,1 ⁽¹³⁾	51,8 ± 6,1 ⁽¹³⁾
3	24	10,0	3,39 ± 1,38 ⁽¹⁸⁾	7,31 ± 2,03 ⁽¹⁸⁾	31,0 ± 8,5 ⁽¹⁸⁾	69,0 ± 8,5 ⁽¹⁸⁾
4	18	13,3	3,62 ± 1,07 ⁽¹¹⁾	8,66 ± 3,13 ⁽¹¹⁾	30,9 ± 8,0 ⁽¹¹⁾	69,1 ± 8,0 ⁽¹¹⁾
5	12	20,0	2,45 ± 0,82 ⁽¹²⁾	11,66 ± 2,09 ⁽¹²⁾	17,1 ± 3,7 ⁽¹²⁾	82,9 ± 3,7 ⁽¹²⁾
6	6	40,0	1,54 ± 0,43 ⁽¹⁰⁾	11,33 ± 2,27 ⁽¹⁰⁾	11,8 ± 1,2 ⁽¹⁰⁾	88,2 ± 1,2 ⁽¹⁰⁾

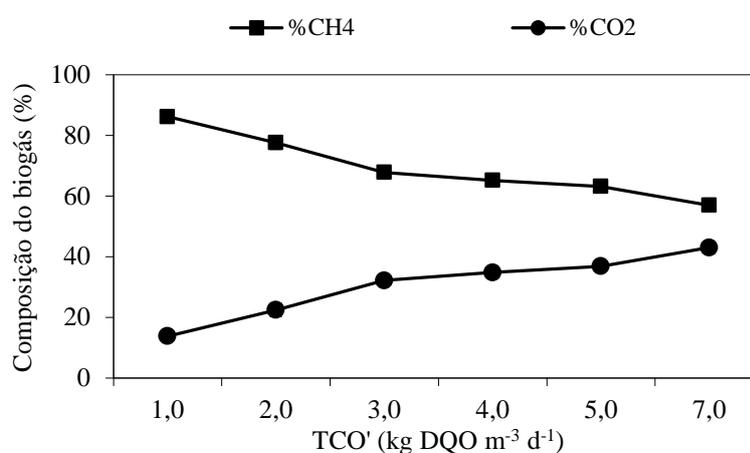
C_{CH₄}: concentração de CH₄ no biogás; C_{CO₂}: concentração de CO₂ no biogás.

Os números entre parênteses referem-se ao número de amostras utilizadas para média.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

A composição de CH_4 no biogás produzido pelo RM1 diminuiu de $86,2 \pm 1,6$ para $77,6 \pm 2,2\%$, com o aumento da TCO' de 1,0 para 2,0 $\text{kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, respectivamente, e manteve valores constantes, $67,8 \pm 1,6 - 63,2 \pm 1,3\%$, com o aumento da TCO' de 3,0 para 5,0 $\text{kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, respectivamente. Porém, com o aumento da TCO' para 7,0 $\text{kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, houve redução na composição de CH_4 no biogás produzido, apresentado valor médio de $57,0 \pm 1,9\%$, conforme apresentado na Tabela 5.21 e Figura 5.18.

Figura 5.18 – Composição do biogás produzido pelo RM1 em relação à TCO' aplicada.

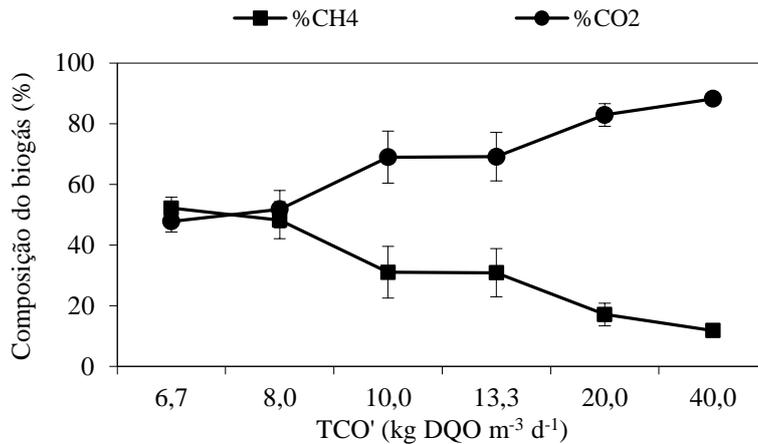


Obs.: As linhas que ligam os pontos no gráfico foram utilizadas para melhor orientação visual.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

Para o RM2 é possível observar progressiva redução da composição de CH_4 consequente da redução do TDH e aumento da TCO' aplicada. Com a diminuição do TDH de 36 para 30 h (aumento da TCO' de 6,7 para 8,0 $\text{kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$), a composição de CH_4 no biogás do RM1 apresentou valores constantes de $52,2 \pm 3,6$ e $48,2 \pm 6,1\%$, respectivamente. A diminuição do TDH para 24 e 18 h (aumento da TCO' de 10,0 para 13,3 $\text{kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$), também apresentou valores constantes de $31,0 \pm 8,5$ e $30,9 \pm 8,0\%$, respectivamente. Por fim, houve redução no conteúdo de CH_4 no biogás produzido para $17,1 \pm 3,7$ e $11,8 \pm 1,2\%$, com a diminuição do TDH para 12 e 6 h (aumento da TCO' de 20,0 para 40,0 $\text{kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$), conforme apresentado na Tabela 5.21 e Figura 5.19.

Figura 5.19 – Composição do biogás produzido pelo RM2 em relação à TCO' aplicada.



Obs.: As linhas que ligam os pontos no gráfico foram utilizadas para melhor orientação visual.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

Nota-se que tanto o aumento da TCO' consequente da elevação da concentração afluyente de glicerol, quanto do decréscimo do TDH em concentração constante de glicerol, a concentração de CH₄ no biogás entra em declínio. A queda no percentual de CH₄ pode ser explicada pelo aumento da carga orgânica aplicada que pode ter sobrecarregado o sistema, causando aumento da concentração de AGV, principalmente ácido propiônico e butírico, inibidores da metanogênese. A queda na composição de CH₄ no biogás foi mais acentuada no RM2, o que ocorreu devido as maiores TCO' aplicadas, em decorrência da diminuição do TDH e devido à estratégia de operação sem adaptação da metanogênese, gerando elevado acúmulo de AGV no efluente desse reator, impossibilitando a sua recuperação.

Valores de conteúdo de metano próximo ao máximo verificado na primeira fase operacional do RM1 (86,2%) são encontrados na literatura quando glicerol é utilizado como substrato, como os obtidos por Yang et al. (2008), que operando um reator de leito fixo semi-contínuo (55 °C), sob variação de TCO de 0,25 a 1,0 g L⁻¹ d⁻¹, alcançaram composição máxima de CH₄ no biogás produzido variando entre 70 – 90%.

Phukingngamet al. (2011) em um reator ABR (27 °C) obtiveram porcentagens variando entre 64 a 74%, variando a TCO de 0,5 a 3,0 kg DQO m⁻³ d⁻¹. Lovato et al. (2012) encontrou em um AnSBBR (30 °C), porcentagem de metano no biogás de 75%, no tempo de alimentação de 2 h e TCO de 4,5 g DQO L⁻¹ d⁻¹.

Já Hutňan et al. (2013a) em reatores anaeróbios de mistura (37 °C), variando a TCO de 6 a 8,0 g DQO L⁻¹ d⁻¹, alcançou conteúdo de CH₄ no biogás produzido de 61,1% no reator com glicerol bruto (GB_{NT}). No reator com glicerol bruto pré-tratado (GB_{PT}), variando a TCO

de 1,2 a 3,6 g DQO L⁻¹ d⁻¹, a concentração média de CH₄ foi de 57,5 %. Os resultados alcançados pelos autores foram próximos ao máximo encontrado pelo RM2 sob TCO de 6,7 kg m⁻³ d⁻¹.

Tangkathitipong et al. (2014) operando ASBR de 1 estágio obteve composição de CH₄ inferior à máxima obtida pelo reator RM1 e RM2. Quando o sistema foi considerado em 1 estágio, a TCO de 9,64 kg DQO m⁻³ d⁻¹ foi considerada ótima, na qual foi encontrada composição máxima de CH₄ (38,1%). Porém, no sistema de 2 estágio, sob TCO de 11,3 kg DQO m⁻³ d⁻¹, a máxima composição de CH₄ foi de 74,8%.

A produção volumétrica de metano (PVM) e os rendimentos de metano em DQO (MY) e glicerol (MY'), calculados com base nas condições operacionais impostas no presente estudo, estão descritos na Tabela 5.22.

Tabela 5.22 – Valores médios de produção volumétrica e rendimentos de CH₄ em DQO e glicerol para o RM1 e RM2.

Fase	TDH (h)	TCO' (kg DQO m ⁻³ d ⁻¹)	PVM (L d ⁻¹ L ⁻¹)	MY (m ³ CH ₄ kg ⁻¹ DQO _{aplicada})	MY' (mol CH ₄ mol ⁻¹ glicerol _{consumido})
RM1					
1	24	1,0	0,44 ± 0,09 ⁽¹¹⁾	0,23 ± 0,03 ⁽¹¹⁾	0,99 ± 0,12 ⁽¹¹⁾
2		2,0	1,74 ± 0,22 ⁽⁹⁾	0,38 ± 0,04 ⁽⁹⁾	1,49 ± 0,16 ⁽⁹⁾
3		3,0	2,71 ± 0,12 ⁽⁹⁾	0,47 ± 0,02 ⁽⁹⁾	1,74 ± 0,14 ⁽⁹⁾
4		4,0	3,05 ± 0,28 ⁽⁸⁾	0,29 ± 0,02 ⁽⁸⁾	1,25 ± 0,13 ⁽⁸⁾
5		5,0	3,37 ± 0,18 ⁽⁹⁾	0,27 ± 0,01 ⁽⁹⁾	1,04 ± 0,13 ⁽⁹⁾
6		7,0	4,27 ± 0,36 ⁽¹¹⁾	0,22 ± 0,01 ⁽¹¹⁾	0,92 ± 0,11 ⁽¹¹⁾
RM2					
1	36	6,7	1,98 ± 0,17 ⁽¹⁰⁾	0,13 ± 0,01 ⁽¹⁰⁾	0,52 ± 0,06 ⁽¹⁰⁾
2	30	8,0	1,87 ± 0,22 ⁽⁸⁾	0,10 ± 0,01 ⁽⁸⁾	0,41 ± 0,04 ⁽⁸⁾
3	24	10,0	1,43 ± 0,17 ⁽⁹⁾	0,06 ± 0,01 ⁽⁹⁾	0,26 ± 0,04 ⁽⁹⁾
4	18	13,3	1,33 ± 0,20 ⁽⁸⁾	0,04 ± 0,01 ⁽⁸⁾	0,19 ± 0,03 ⁽⁸⁾
5	12	20,0	1,24 ± 0,24 ⁽¹⁰⁾	0,02 ± 0,00 ⁽¹⁰⁾	0,11 ± 0,02 ⁽¹⁰⁾
6	6	40,0	1,14 ± 0,11 ⁽¹¹⁾	0,01 ± 0,00 ⁽¹¹⁾	0,07 ± 0,01 ⁽¹¹⁾

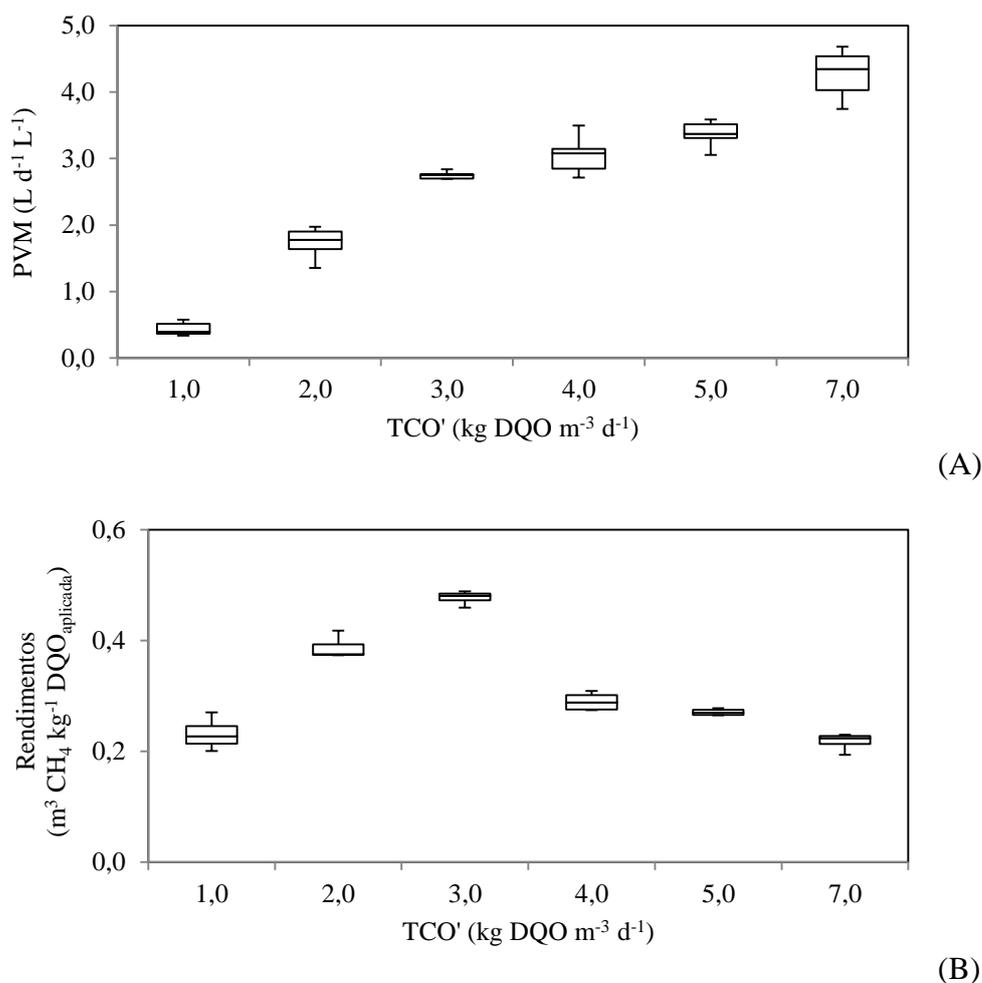
PVM: produção volumétrica de CH₄; MY: rendimento de CH₄ em DQO; MY': rendimento de CH₄ em glicerol. Os números entre parênteses referem-se ao número de amostras utilizadas para média.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

A PVM obtida pelo RM1 manteve-se estável e com tendência de elevação ao longo do aumento da TCO' aplicada. A PVM média aumentou de 0,44 ± 0,09 para 4,27 ± 0,36 L d⁻¹ L⁻¹

com o aumento da TCO' de 1,0 a 7,0 kg DQO m⁻³ d⁻¹. Em relação ao MY obtido pelo RM1, verificou-se aumento com o incremento da TCO' de 1,0 a 3,0 kg DQO m⁻³ d⁻¹, comportamento similar ao observado para a PVM nestas condições. O rendimento máximo alcançado foi de $0,47 \pm 0,02$ m³ CH₄ kg⁻¹ DQO_{aplicada} na TCO' de 3,0 kg DQO m⁻³ d⁻¹, valor este em MY' ($1,74 \pm 0,14$ mol CH₄ mol⁻¹ glicero_{consumido}) próximo ao teórico (equação 13 – item 3.6), indicando o elevado desempenho atingido pelo RM1. Com o aumento da TCO' para 4,0 – 7,0 kg DQO m⁻³ d⁻¹, ocorreu uma ligeira diminuição desse parâmetro para $0,29 \pm 0,02$ – $0,22 \pm 0,01$ m³ CH₄ kg⁻¹ DQO_{aplicada}, conforme apresentado na Tabela 5.22 e Figura 5.20.

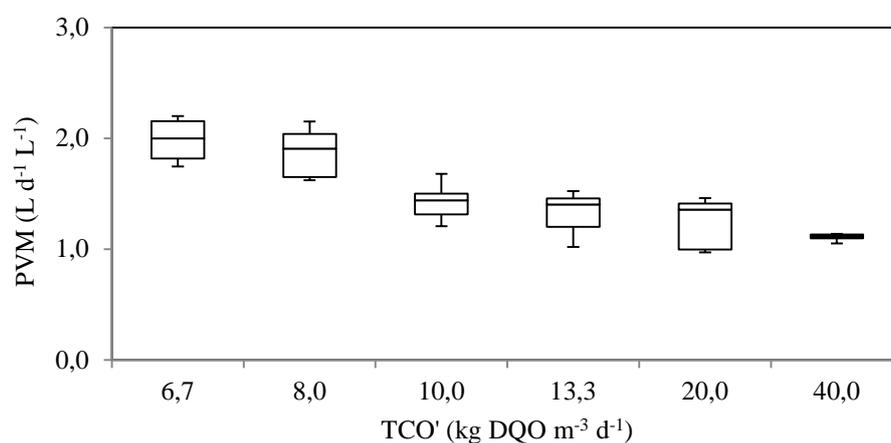
Figura 5.20 – (A) Boxplot da produção volumétrica de CH₄ no RM1. (B) Boxplot para os rendimentos de CH₄ produzidos pelo RM1.



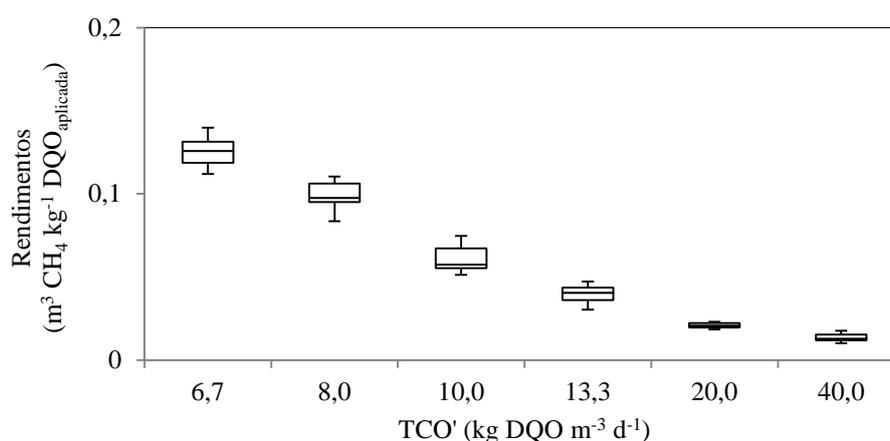
Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

Os valores obtidos pelo RM2 de PVM e MY estão apresentados na Tabela 5.22 e Figura 5.21. A PVM média manteve-se constante, $1,98 \pm 0,17$ e $1,87 \pm 0,22 \text{ L d}^{-1} \text{ L}^{-1}$, com a diminuição do TDH de 36 para 30 h (aumento da TCO' de 6,7 para 8,0 $\text{kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$), respectivamente. Porém, ocorreu redução deste parâmetro, variando entre $1,43 \pm 0,17 - 1,14 \pm 0,11 \text{ L d}^{-1} \text{ L}^{-1}$, quando o TDH foi reduzido para 24 – 6 h (aumento da TCO' de 10,0 para 40,0 $\text{kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$). O MY obtido pelo RM2, também se mostrou influenciado pela redução do TDH e consequente aumento da TCO' aplicada. Este parâmetro apresentou decréscimo com a diminuição do TDH de 36 a 6 h (aumento da TCO' de 6,7 a 40,0 $\text{kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$), variando entre $0,13 \pm 0,01$ a $0,01 \pm 0,00 \text{ m}^3 \text{ CH}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ DQO}_{\text{aplicada}}$.

Figura 5.21 – (A) Boxplot da produção volumétrica de CH_4 no RM2. (B) Boxplot para os rendimentos de CH_4 produzidos pelo RM2



(A)



(B)

Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

Os resultados encontrados para a PVM apresentaram comportamento diferente nos reatores metanogênicos. O RM1 apresentou aumento na PVM com o aumento da TCO aplicada, sendo que o aumento na concentração de AGV no sistema, ao longo das TCO' de 4,0 a 7,0 kg DQO m⁻³ d⁻¹, não influenciou esse parâmetro. Os valores de produção biológica de metano verificados neste estudo podem ser atribuídos às vantagens operacionais e energéticas da temperatura termofílica, conforme mencionado ao longo desta dissertação, além das características inerentes ao RALF, como boa capacidade de transferência de massa e energia, sistema de homogeneização com alta velocidade de agitação na fase líquida, o que favorece o desprendimento do biogás produzido. Observa-se também que o aumento na concentração de HAc, HPr e 1,3-PDO no RM1 (descrição detalhada no item 5.2.5), não tenha causado desequilíbrio no sistema, o que não afetou a PVM neste reator.

No entanto, a diminuição do TDH aplicado apresentou efeito degenerativo sobre a PVM no RM2. Esse comportamento pode ser explicado pela queda acentuada na composição de CH₄ no biogás produzido, devido às elevadas TCO' aplicadas, gerando acúmulo de AGV no efluente desse reator. Dessa forma, devido às características do RALF, com o decréscimo do TDH, houve aumento na produção de biogás, porém apresentando baixa composição de CH₄, o que ocasionou a diminuição da PVM ao longo das fases operacionais do RM2.

Em relação ao MY', verificou-se de acordo com a equação 13 – item 3.6, quando a digestão anaeróbia é completa o máximo rendimento de metano é 1,75 mol CH₄ mol⁻¹ glicerol_{consumido}. Entretanto, de acordo com a equação 14 – item 3.6, quando ocorre desequilíbrio no sistema e acumulação de HAc, o rendimento encontrado passa a ser de até 0,75 mol CH₄ mol⁻¹ glicerol_{consumido}. Dessa forma, o máximo MY encontrado nesta pesquisa foi no RM1 (1,74 ± 0,14 mol CH₄ mol⁻¹ glicerol_{consumido}), obtido na TCO' de 3,0 kg DQO m⁻³ d⁻¹, na qual o sistema apresentou-se estável (os AGV foram completamente consumidos). Em relação ao RM2, o mesmo apresentou máximo MY (0,52 ± 0,06 mol CH₄ mol⁻¹ glicerol_{consumido}) inferior ao obtido no RM1, mas condizente com o apresentado pela equação 14 – item 3.6, visto que o sistema apresentou instabilidade e elevado acúmulo de HAc (descrição detalhada no item 5.2.5).

Resultados similares ao obtido pelo RM1 foram verificados por Yang et al. (2008), operando reator de leito fixo (55 °C). O reator termofílico apresentou produção máxima de metano de 0,45 L CH₄ g⁻¹ DQO_{aplicada} em uma TCO de 0,70 g L⁻¹ d⁻¹.

Phukingngam et al. (2011) verificaram que o aumento da TCO nos sistemas biológicos produtores de CH₄ podem vir a diminuir o MY, assim como observado nos reatores RM1 e RM2. Os autores verificaram que o desempenho do reator ABR () sob TCO de

1,5 kg DQO m⁻³ d⁻¹ apresentou máxima produção de metano de 0,28 m³ CH₄ kg⁻¹ DQO_{aplicada}. Com o aumento da TCO houve redução na remoção de matéria orgânica, devido ao acúmulo excessivo de AGV.

A influência do aumento da TCO sobre a produção de metano também foi observada por Lovato et al. (2012) operando um AnSBBR (30 °C), o qual alcançou rendimento máximo de CH₄ de 5,28 mmol CH₄ g⁻¹ DQO_{consumida} no tempo de alimentação de 2 h e TCO de 4,5 g DQO L⁻¹ d⁻¹. Tal valor foi inferior ao máximo encontrado na presente pesquisa pelo RM1 e RM2 (15,66 e 12,61 mmol CH₄ g⁻¹ DQO_{consumida}), em condições de TCO aplicada de 3,0 e 6,7 kg m⁻³ d⁻¹, respectivamente.

Valores inferiores aos alcançados pelo RM1 e RM2 para a PVM foram verificados nos trabalhos de Vlassis et al. (2012) e Vlassis et al. (2013). No trabalho de Vlassis et al. (2012), a carga máxima de glicerol alcançada pelo CSTR (35 °C) foi de 0,25 g DQO L⁻¹ d⁻¹, dando origem à PVM de 0,07 L d⁻¹ L⁻¹. Por outro lado, Vlassis et al. (2013) reportou carga máxima de glicerol no PABR (35 °C) de 3,0 g DQO L⁻¹ d⁻¹, dando origem à PVM de 0,99 L d⁻¹ L⁻¹. Logo, o PABR foi mais eficiente, uma vez que foi submetido a uma carga orgânica 10 vezes maior que o CSTR. Além disso, seu desempenho foi superior em termos de produção de metano (0,33 vs 0,30 m³ CH₄ kg⁻¹ DQO_{aplicada}).

Hutňan et al. (2013b) avaliaram a operação de três reatores UASB (37 °C), inoculados com biomassa suspensa ou granular, no tratamento de glicerol bruto não-diluído e diluído. Os rendimentos de metano encontrados foram 0,29, 0,31 e 0,27 m³ kg⁻¹ DQO_{aplicada} para os reatores UASB1, UASB2 e UASB3, respectivamente.

Dinh et al. (2014) também obteve PVM inferior as obtidas pelo RM1 e RM2. Na TCO mantida em 2,5 kg DQO m⁻³ d⁻¹ em reator batelada (39 °C), a PVM foi de 0,58 L d⁻¹ L⁻¹.

Tangkathitipong et al. (2014) operando reator ASBR de 1 fase, obteve PVM de 0,36 L d⁻¹ L⁻¹ e rendimento máximo de 0,01 m³ CH₄ kg⁻¹ DQO_{aplicada}, na TCO de 9,6 kg DQO m⁻³ d⁻¹. Entretanto, analisando o sistema como sequencial (2 fases), a PVM foi de 0,67 L d⁻¹ L⁻¹, na TCO de 11,3 kg DQO m⁻³ d⁻¹.

Valores de MY inferiores ao RM2, porém superiores ao RM1 foram observados no trabalho de Zhang et al. (2015). O rendimento máximo de metano no período em que foi aplicada a TCO de 0,9 g L⁻¹ d⁻¹ variou entre 0,96 – 1,09 mol CH₄ mol⁻¹ glicerol. Com o aumento da TCO para 2,3 g L⁻¹ d⁻¹, os rendimentos de metano foram reduzidos até 0,63 – 0,70 mol CH₄ mol⁻¹ glicerol. Os autores concluíram que esses resultados foram próximos ao teórico (equação 14 – item 3.6).

A Tabela 5.23 apresenta o desempenho na produção de metano do RM1 e RM2 em comparação com outros trabalhos da literatura. Observa-se que o conteúdo de CH₄ obtido pelo RM1 (86,2 ± 1,6%), encontra-se entre os mais elevados. A PVM do RM1 e RM2 também obteve resultados superiores aos demais trabalhos citados. Em relação ao rendimento de CH₄, o RM1 atingiu MY próximo ao valor teórico (equação 13 – item 3.6) e comparável ao rendimento máximo reportado por Yang et al. (2008), porém sob TCO' de 3,0 kg DQO m⁻³ d⁻¹, superior a verificada no estudo de Yang et al. (2008).

Tabela 5.23 – Comparação do desempenho na produção de metano entre os trabalhos atuais e os reportados na literatura.

Reator	DQO (g DQO L ⁻¹)	T (°C)	TCO ^a (kg DQO m ⁻³ d ⁻¹)	Inóculo	CH ₄ (%)	MY (m ³ CH ₄ kg ⁻¹ DQO _{aplicada})	PVM (L d ⁻¹ L ⁻¹)	Referência
Leito Fixo	GP 4,03*	35	0,25 – 0,7*	Cultura mista	40 - 82 (0,7)	0,37 (0,25)	-	Yang et al. (2008)
		55	0,25 – 1,0*		70 - 90 (0,7)	0,45 (0,7)		
ABR	GB 5,0 – 30,0	27	0,5 – 3,0	Cultura mista	64 – 74	0,28 (1,5)	-	Phukingngam et al. (2011)
AnSBBR	GB 3,0 – 5,0	30	4,5 – 7,5	Cultura mista	75 (4,5)	5,28 ^a (4,5)	-	Lovato et al. (2012)
CSTR	GP 5,0 – 10,0	35	0,25 – 0,5	Cultura mista	-	0,30 (0,25)	0,07 (0,25)	Vlassis et al. (2012)
PABR	GP 10,0 – 37,5	35	1,0 – 3,75	Cultura mista	-	0,33 (3,0)	0,99 (3,0)	Vlassis et al. (2013)
Reator anaeróbio de mistura	GB _{NT} GB _{PT}	37	1,6 – 8,0	Cultura mista	61,1	0,33	-	Hutňan et al. (2013a)
			1,2 – 3,6		57,5	0,35		
UASB ₁	GB _{NT}	37	1,30 – 4,32	Cultura mista	-	0,29	-	Hutňan et al. (2013b)
UASB ₂			2,16 – 6,49		0,31			
UASB ₃			0,50 – 3,90		0,27			
Batelada	GP 2,05 – 8,22	39	2,5	Cultura mista	59 – 64	-	0,58	Dinh et al. (2014)
ASBR 2E	GB 45,0	37	5,63 – 14,06	Cultura mista	74,8 (11,3)	-	0,67 (11,3)	Tangkathitipong et al. (2014)
ASBR 1E			4,82 – 12,05		38,1 (9,6)	0,01 (9,6)	0,36 (9,6)	
Reator 2E	GB 10,0	30	4,0 – 8,0	Cultura mista	66 (6,1)	0,14 ^b (6,1)	-	Boonsawang et al. (2015)
Reator 1E			8,8		59,7	0,03 ^b		
CSTR	GB 5,0 – 13,0	70	0,9 – 2,3*	Cultura mista	-	0,96 – 1,09 ^c (0,9)	-	Zhang et al. (2015)
RM1	GB 1,0 – 7,0*	55	1,0 – 7,0	Cultura mista	86,2 (1,0)	0,47 (3,0)	4,27 (7,0)	Este estudo
RM2	GB 10,0*	55	6,7 – 40,0	Cultura mista	52,2 (6,7)	0,13 (6,7)	1,98 (6,7)	Este estudo

^ammol CH₄ g⁻¹ DQO_{removida}; ^bm³ kg⁻¹ DQO_{removida}; ^cmol CH₄ mol⁻¹ glicerol_{consumido}; *concentração em g L⁻¹ e TCO em kg m⁻³ d⁻¹; GB: Glicerol bruto; GP: Glicerina pura; GB_{NT}: glicerol puro sem tratamento; GB_{PT}: pré-tratado por processo de acidificação; 1E: um estágio; 2E: dois estágios. Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

5.2.5 Metabólitos solúveis produzidos no RM1 e RM2

Além de verificar o comportamento dos reatores em relação ao acúmulo de subprodutos em diferentes condições de carga orgânica, também foi investigada a predominância dos AGV em cada fase operacional.

Os principais metabólitos produzidos no reator RM1 foram: ácido acético (HAc), ácido propiônico (HPr) e 1,3-propanodiol (1,3-PDO). Na Tabela 5.24 estão apresentadas as concentrações de todos os metabólitos detectados no efluente dos reatores nas diferentes condições de operação, assim como sua porcentagem molar. A Figura 5.22 apresenta graficamente a distribuição molar desses metabólitos.

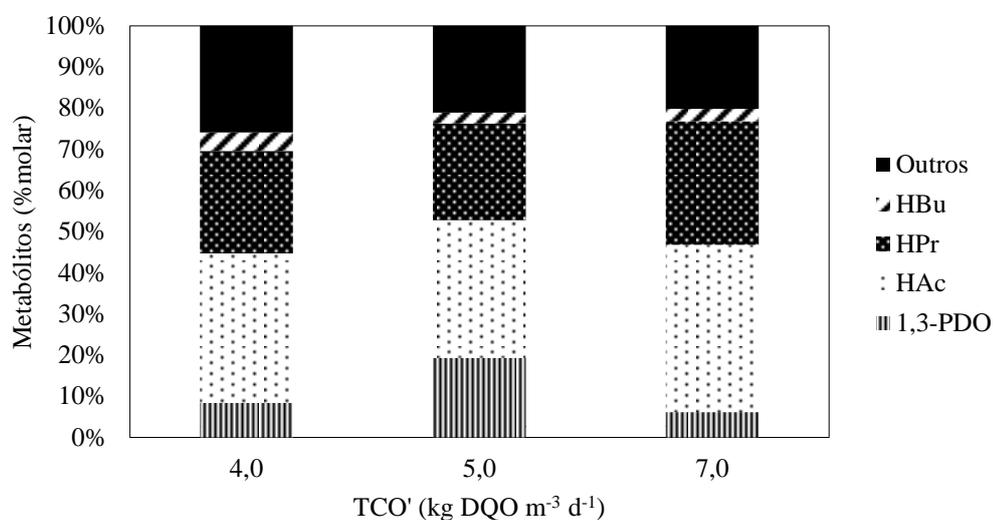
Tabela 5.24 – Concentração (g L^{-1}) e fração molar (%) dos metabólitos detectados durante a operação do RM1.

Metabólitos		TCO' ($\text{kg DQO m}^{-3} \text{d}^{-1}$)		
		4,0	5,0	7,0
mg L^{-1}	1,3-PDO	$27,8 \pm 5,7^{(6)}$	$73,4 \pm 7,7^{(9)}$	$88,6 \pm 14,8^{(8)}$
%		8,4	19,3	6,2
mg L^{-1}	MetOH	$18,2 \pm 0,3^{(10)}$	$18,1 \pm 0,2^{(10)}$	$64,8 \pm 18^{(10)}$
%		14,2	11,9	10,7
mg L^{-1}	ButOH	$24,9 \pm 0,0^{(9)}$	$24,9 \pm 0,0^{(12)}$	$99,5 \pm 0,1^{(10)}$
%		8,4	7,1	7,1
mg L^{-1}	HAc	$87,5 \pm 9,4^{(6)}$	$95,4 \pm 20,0^{(8)}$	$459,9 \pm 50,9^{(7)}$
%		36,3	33,5	40,6
mg L^{-1}	HPr	$77,8 \pm 9,2^{(5)}$	$82,5 \pm 4,1^{(11)}$	$420,2 \pm 20,5^{(10)}$
%		24,9	23,5	30,1
mg L^{-1}	HIsoBu	$6,6 \pm 1,1^{(6)}$	$4,9 \pm 0,6^{(11)}$	$24,4 \pm 2,4^{(9)}$
%		1,9	1,2	1,5
mg L^{-1}	HBu	$19,4 \pm 7,8^{(7)}$	$11,0 \pm 1,6^{(9)}$	$50,0 \pm 7,9^{(9)}$
%		4,5	2,6	3,0
mg L^{-1}	HIsoVa	$4,9 \pm 0,6^{(5)}$	$3,7 \pm 0,8^{(11)}$	$12,5 \pm 1,4^{(7)}$
%		1,2	0,8	0,6
mg L^{-1}	HVa	$1,5 \pm 0,3^{(6)}$	$1,1 \pm 0,2^{(7)}$	$4,3 \pm 1,0^{(6)}$
%		0,4	0,2	0,2

1,3-PDO: 1,3-propanodiol; MetOH: metanol; ButOH: butanol; HAc: ácido acético; HPr: ácido propiônico; HIsoBu: ácido isobutírico; HBu: ácido butírico; HIsoVa: ácido isovalérico; HVa: ácido valérico.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

Figura 5.22 – Porcentagem molar dos principais metabólitos produzidos pelo RM1 em relação à TCO' aplicada.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

Diante da Tabela 5.24, observa-se que houve um predomínio de HAc e HPr, além de 1,3-PDO durante a operação do RM1. As concentrações de HAc e HPr apresentaram-se crescentes com o aumento da TCO' aplicada, alcançando concentrações máximas de $459,9 \pm 50,9$ e $420,2 \pm 20,5$ mg L⁻¹, respectivamente. Comportamento semelhante foi verificado na concentração de 1,3-PDO, a qual apresentou ligeiro aumento com a elevação da TCO' aplicada.

Destaca-se que durante as três primeiras fases de operação do RM1 (TCO' de 1,0 a 3,0 kg DQO m⁻³ d⁻¹), os AGV foram completamente consumidos.

O acúmulo de ácidos orgânicos em reatores anaeróbios, principalmente acetato, propionato e butirato, pode ocorrer como resultado da não observância das condições ideais de crescimento microbiano ou de limitações cinéticas e termodinâmicas. Sob esse prisma, a presença de ácidos orgânicos no efluente do reator reflete uma condição de instabilidade.

De acordo com Foresti (1994), a sobrecarga em processos anaeróbios pode ocorrer pelo acúmulo de HAc, HBU e HPr. Em situação de sobrecarga orgânica em que a produção de ácido acético é intensa, as *achaeas* metanogênicas acetoclásticas não perdem o controle da fermentação, apenas a taxa de produção dos microrganismos fermentativos acidogênicos é superior à taxa de consumo das *achaeas* metanogênicas acetoclásticas. Já a sobrecarga de ácido propiônico, representa uma situação de colapso, quando as *achaeas* metanogênicas

acetoclásticas perdem o controle do processo e hidrogênio é transferido (a fim de diminuir a pressão parcial de H_2) nos microorganismos acidogênicos para produção de HPr, que ocorre em grandes quantidades.

Acredita-se pelo aumento na produção de HAc no RM1 (35,2 a 40,6%), que a sobrecarga de ácido acético foi responsável pela diminuição do desempenho do reator a medida que a carga orgânica foi aumentada. Do mesmo modo, o aumento de HPr (24,9 a 30,1%) ao longo do aumento da TCO', também foi indicativo que o reator poderia chegar ao colapso em TCO' mais elevadas.

Entretanto, na TCO' de $5,0 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ houve ligeiro aumento na produção de 1,3-PDO (19,3%), o que pode ser atribuído ao consumo de H_2 na via redutora da fermentação de glicerol, de forma que, para se formar o produto final 1,3-PDO é necessário o consumo de 1,0 mol de H_2 por mol de glicerol, conforme explicitado na equação (11) no tópico 3.6 desta dissertação.

Os metabólitos produzidos pelo RM2 estão mencionados na Tabela 5.25, a qual apresenta sua concentração média, assim como sua porcentagem molar. Os principais metabólitos verificados foram: ácido acético (HAc), ácido propiônico (HPr), ácido butírico (HBU) e 1,3-propanodiol (1,3-PDO). A Figura 5.23 apresenta graficamente a distribuição molar desses metabólitos.

Com relação ao RM2, conforme apresentado na Tabela 5.25, durante a operação desse reator, houve um predomínio de HAc, HPr, HBU e 1,3-PDO. As concentrações de HAc apresentaram valores contantes, variando entre $1334,7 \pm 191,7 - 1110,6 \pm 82,7 \text{ mg L}^{-1}$, com a redução do TDH de 36 a 30 h e conseqüente aumento da TCO' de 6,7 a $8,0 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, porém ocorreu aumento nas concentrações de HAc, variando entre $1513,0 \pm 190,3 - 2147,3 \pm 194,2 \text{ mg L}^{-1}$, ao longo da operação nos TDH de 24 - 12 h (TCO' de 10,0 - $20,0 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$). Por fim, na última fase operacional (TCO' de $40,0 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$), devido a constatação de arraste, verificou-se diminuição na concentração de HAc.

Comportamento similar foi verificado na concentração de HPr, apresentando valores constantes, variando entre $1249,1 \pm 191,7$ e $1543,6 \pm 379,5 \text{ mg L}^{-1}$, com a redução do TDH de 36 a 30 h (elevação da TCO' de 6,7 a $8,0 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$), porém apresentando decréscimo com a redução do TDH de 24 - 6 h (aumento da TCO' de 10,0 a $40,0 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$). Em relação às concentrações de HBU e 1,3-PDO, foi observado aumento nas concentrações desses compostos com a diminuição do TDH aplicado, sendo verificado expressivo aumento na concentração de 1,3-PDO nas três últimas fases operacionais.

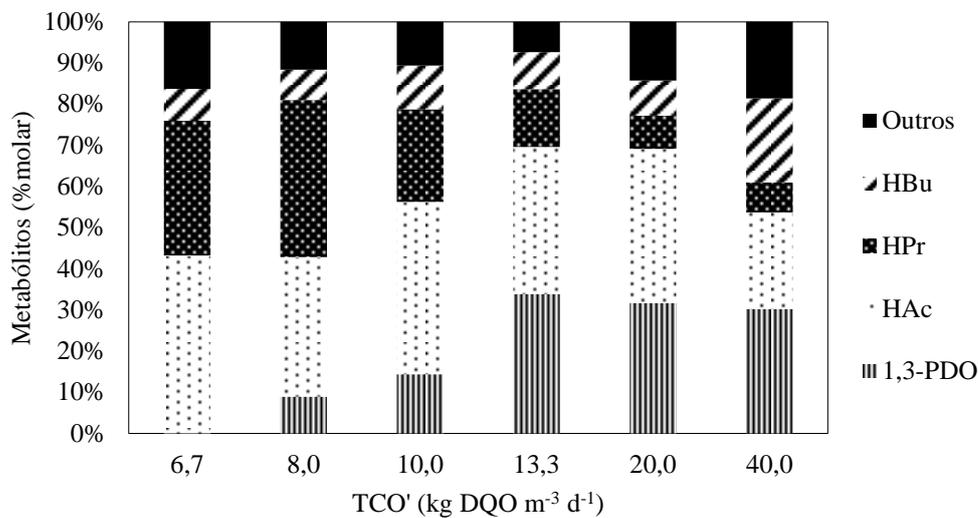
Tabela 5.25 – Concentração (g L⁻¹) e fração molar (%) dos metabólitos detectados durante a operação do RM2.

Metabólitos		TCO' (kg DQO m ⁻³ d ⁻¹)					
		6,7	8,0	10,0	13,3	20,0	40,0
mg L ⁻¹	1,3-PDO	ND	369,3 ± 104,4 ⁽⁷⁾	656,3 ± 188,1 ⁽⁷⁾	1957,2 ± 593,6 ⁽⁹⁾	2295,9 ± 202,1 ⁽⁹⁾	1780,3 ± 272,1 ⁽⁸⁾
%		0,0	8,9	14,3	33,9	31,6	30,2
mg L ⁻¹	MetOH	80,0 ± 4,3 ⁽¹¹⁾	75,1 ± 7,8 ⁽⁶⁾	71,6 ± 12,3 ⁽⁶⁾	65,9 ± 2,8 ⁽⁸⁾	72,6 ± 3,0 ⁽⁷⁾	69,7 ± 0,8 ⁽¹¹⁾
%		4,9	4,3	3,7	2,7	2,4	2,8
mg L ⁻¹	EtOH	ND	ND	43,5 ± 14,0 ⁽⁶⁾	20,0 ± 6,4 ⁽⁷⁾	361,3 ± 33,8 ⁽⁵⁾	449,1 ± 17,1 ⁽⁵⁾
%		0,0	0,0	1,6	0,6	8,2	12,6
mg L ⁻¹	ButOH	112,2 ± 0,3 ⁽¹¹⁾	112,2 ± 0,2 ⁽⁸⁾	107,5 ± 1,5 ⁽⁶⁾	100,2 ± 0,5 ⁽⁷⁾	114,8 ± 1,1 ⁽⁹⁾	113,8 ± 4,3 ⁽¹¹⁾
%		2,9	2,8	2,4	1,8	1,6	2,0
mg L ⁻¹	HAc	1334,7 ± 191,7 ⁽⁸⁾	1110,6 ± 82,7 ⁽⁸⁾	1513,0 ± 190,3 ⁽⁶⁾	1629,2 ± 487,0 ⁽⁸⁾	2147,3 ± 194,2 ⁽⁹⁾	1094,9 ± 149,7 ⁽¹⁰⁾
%		43,2	33,9	41,9	35,7	37,5	23,5
mg L ⁻¹	HPr	1249,1 ± 191,7 ⁽⁸⁾	1543,6 ± 379,5 ⁽⁶⁾	1004,4 ± 275,0 ⁽⁶⁾	792,2 ± 91,4 ⁽⁶⁾	569,6 ± 35,6 ⁽⁷⁾	420,3 ± 28,2 ⁽¹¹⁾
%		32,8	38,2	22,5	14,1	8,1	7,3
mg L ⁻¹	HIsoBu	73,3 ± 10,1 ⁽⁷⁾	56,2 ± 5,8 ⁽⁶⁾	65,9 ± 13,0 ⁽⁷⁾	83,4 ± 15,0 ⁽⁸⁾	73,4 ± 9,8 ⁽⁹⁾	40,6 ± 2,2 ⁽⁷⁾
%		1,6	1,2	1,2	1,2	0,9	0,6
mg L ⁻¹	HBu	351,8 ± 118,2 ⁽⁷⁾	354,7 ± 110,4 ⁽⁷⁾	560,6 ± 109,3 ⁽⁶⁾	602,8 ± 65,1 ⁽⁸⁾	721,4 ± 102,6 ⁽⁷⁾	1391,3 ± 220,6 ⁽¹¹⁾
%		7,8	7,4	10,6	9,0	8,6	20,4
mg L ⁻¹	HIsoVa	208,1 ± 75,5 ⁽⁷⁾	85,6 ± 10,5 ⁽⁶⁾	57,8 ± 9,9 ⁽⁸⁾	56,9 ± 9,7 ⁽⁷⁾	69,0 ± 9,0 ⁽⁷⁾	37,5 ± 5,2 ⁽⁸⁾
%		4,0	1,5	0,9	0,7	0,7	0,5
mg L ⁻¹	HVa	155,6 ± 39,2 ⁽⁶⁾	99,5 ± 15,5 ⁽⁶⁾	37,7 ± 3,2 ⁽⁷⁾	22,8 ± 6,8 ⁽⁷⁾	47,8 ± 10,8 ⁽⁵⁾	20,6 ± 1,4 ⁽⁶⁾
%		3,0	1,8	0,6	0,3	0,5	0,3
mg L ⁻¹	HCa	ND	5,2 ± 1,3 ⁽⁷⁾	12,8 ± 0,3 ⁽⁷⁾	3,4 ± 1,4 ⁽⁶⁾	ND	ND
%		0,0	0,1	0,2	0,0	0,0	0,0

1,3-PDO: 1,3-propanodiol; MetOH: metanol; EtOH: etanol; ButOH: butanol; HAc: ácido acético; HPr: ácido propiônico; HIsoBu: ácido isobutírico; HBu: ácido butírico; HIsoVa: ácido isovalérico; HVa: ácido valérico; HCa: ácido capríico; ND: não detectado.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

Figura 5.23 – Porcentagem molar dos principais metabólitos produzidos pelo RM2 em relação à TCO' aplicada.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

Conforme apresentado na Tabela 5.25 e Figura 5.23, durante a operação do RM2, nota-se tendência de diminuição na porcentagem molar de HAc (43,2 a 23,5%) e HPr (32,8 a 7,3%), seguindo pelo favorecimento na produção de 1,3-PDO (8,9 a 30,2%), além de aumento progressivo na produção de HBU (7,8 a 20,4%).

O acúmulo de acetato observado ocorreu provavelmente devido às limitações cinéticas das *archaeas* metanogênicas acetoclásticas, sendo toleradas concentrações até 10 g L⁻¹. Desta forma, durante condições de choque de carga orgânica, onde a produção de acetato atinge valores elevados, devido à maior atividade acidogênica, é provável que a acumulação de acetato ocorra devido à saturação dos microrganismos que fazem a conversão de acetato a metano (Giraldo-Gomez et al, 1992). De acordo com INAC et al, (1999), são toleradas concentrações de HAc de até 10,0 g L⁻¹.

Em relação ao HPr e HBU, uma hipótese para a acumulação desses ácidos ocorre devido ao fato das reações acetogênicas operarem próximo da condição de equilíbrio (ΔG próximo a zero – Figura 3.2 – item 3.5), elas são facilmente inibidas pelo acúmulo de produtos (acetato, hidrogênio) no meio líquido, e, portanto, é mais provável que o acúmulo de propionato e butirato ocorra devido a limitações termodinâmicas (Aquino e Chernicharo, 2005).

O favorecimento na produção de 1,3-PDO no efluente do RM2, assim como relatado para o RM1, também pode ser atribuído ao consumo de H₂ na via redutora da fermentação de

glicerol, o que justifica a elevada concentração de 1,3-PDO em relação ao HAc e HPr, e indica que o H₂ produzido não foi completamente convertido a CH₄ pela ação das *achaeas* metanogênicas hidrogenotróficas, refletindo em diminuição na produção de CH₄ ao longo da operação do RM2.

De maneira análoga ao observado no RM1, Bezerra et al. (2011) verificaram que nas maiores TCO aplicadas, houve aumento na concentração de AGV. Os principais ácidos voláteis identificados foram HAc (máximo de 240 e 320 mg L⁻¹ nas TCO de 4,5 e 6,0 g DQO L⁻¹ d⁻¹, respectivamente) e HPr (máximo de 215, 500 e 950 mg L⁻¹ nas TCO de 3,0, 4,5 e 6,0 g DQO L⁻¹ d⁻¹, respectivamente), seguido por HVa e HIsoVa presentes em concentrações mais baixas (máximo de 3,44 mg L⁻¹ em todas as condições).

Assim como observado no RM2, Watanabe et al. (2013) aplicando a maior TCO (2,17 g L⁻¹ d⁻¹) no reator R_C, operando como reator controle, sem material suporte, verificou durante o período do 50 ao 60º dia de operação uma diminuição na produção de metano, justificada pelo aumento dos níveis de ácido propriônico, indicando a menor eficiência de degradado do mesmo neste reator. Tal ácido foi detectado em uma concentração de 490 mg L⁻¹ após o 53º dia de operação, valor esse aumentado para 4510 mg L⁻¹ no 81º dia.

Tangkathitipong et al. (2014) verificaram que a concentração total de AGV no ASBR CH₄ alcançou valor máximo de aproximadamente 1750 mg HAc L⁻¹ na TCO mais elevada, 14,06 kg DQO m⁻³ d⁻¹, sendo os principais componentes dos AGV formados o HAc, HPr, HBu, HVa e uma concentração significativa de 1,3-PDO e uma muito pequena de EtOH. Nesta TCO o desempenho da produção de metano diminuiu devido à elevada quantidade de ácidos orgânicos formados, os quais se acumularam no sistema resultando na redução do pH.

No estudo realizado por Zhang et al. (2015) para a produção simultânea de acetato e metano em CSTR (70 °C), verificou-se que o aumento da TCO ocasionou elevação na concentração de HAc, que alcançou valores de 6,5 g L⁻¹ na TCO de 2,3 g L⁻¹ d⁻¹, e as concentrações de HBu, HPr e 1,3-PDO foram de 0,55, 0,15 e 0,06 g L⁻¹, respectivamente. Os autores concluíram que devido à degradação de butirato e propionato para a produção de metano ter sido muito lenta, o acetato foi considerado o único substrato para a produção de metano na via de oxidação sintrófica.

5.2.6 Sólidos suspensos e balanço de DQO

A mínima concentração de sólidos suspensos verificada no efluente dos reatores RM1 e RM2 foram representadas, em sua grande maioria, por sólidos suspensos voláteis. A concentração de sólidos suspensos voláteis permaneceu constante ao longo das fases dos reatores, variando de $0,06 \pm 0,01$ a $0,14 \pm 0,02 \mu\text{g L}^{-1}$ e $0,16 \pm 0,01$ a $0,29 \pm 0,02 \mu\text{g L}^{-1}$, para o RM1 e RM2, respectivamente, conforme se pode observar na Tabela 5.26.

Tabela 5.26 – Valores médios de Sólidos suspensos totais (SST), fixos (SSF) e voláteis (SSV) no efluente do RM1 e RM2.

Fase	TDH (h)	TCO' (kg DQO m ⁻³ d ⁻¹)	SST ($\mu\text{g L}^{-1}$)	SSF ($\mu\text{g L}^{-1}$)	SSV ($\mu\text{g L}^{-1}$)	SSV' (%)
RM1						
1		1,0	$0,09 \pm 0,00^{(6)}$	$0,03 \pm 0,00^{(6)}$	$0,06 \pm 0,01^{(6)}$	$67,3 \pm 6,5^{(6)}$
2		2,0	$0,12 \pm 0,01^{(6)}$	$0,03 \pm 0,01^{(6)}$	$0,08 \pm 0,01^{(6)}$	$72,8 \pm 14,8^{(6)}$
3	24	3,0	$0,11 \pm 0,01^{(6)}$	$0,03 \pm 0,00^{(5)}$	$0,08 \pm 0,01^{(5)}$	$73,9 \pm 8,6^{(5)}$
4		4,0	$0,14 \pm 0,01^{(7)}$	$0,04 \pm 0,01^{(7)}$	$0,10 \pm 0,01^{(7)}$	$72,5 \pm 12,0^{(7)}$
5		5,0	$0,15 \pm 0,01^{(9)}$	$0,05 \pm 0,01^{(9)}$	$0,11 \pm 0,01^{(9)}$	$74,4 \pm 10,0^{(9)}$
6		7,0	$0,15 \pm 0,02^{(6)}$	$0,03 \pm 0,00^{(6)}$	$0,14 \pm 0,02^{(6)}$	$92,8 \pm 18,3^{(6)}$
RM2						
1	36	6,7	$0,26 \pm 0,03^{(8)}$	$0,06 \pm 0,00^{(8)}$	$0,22 \pm 0,04^{(8)}$	$85,0 \pm 16,4^{(8)}$
2	30	8,0	$0,21 \pm 0,02^{(5)}$	$0,06 \pm 0,01^{(5)}$	$0,16 \pm 0,01^{(5)}$	$79,4 \pm 10,0^{(5)}$
3	24	10,0	$0,23 \pm 0,02^{(6)}$	$0,05 \pm 0,01^{(6)}$	$0,19 \pm 0,03^{(6)}$	$84,5 \pm 16,3^{(6)}$
4	18	13,3	$0,29 \pm 0,03^{(6)}$	$0,07 \pm 0,01^{(6)}$	$0,24 \pm 0,05^{(6)}$	$83,0 \pm 19,3^{(6)}$
5	12	20,0	$0,31 \pm 0,03^{(7)}$	$0,09 \pm 0,01^{(7)}$	$0,28 \pm 0,05^{(7)}$	$90,4 \pm 18,7^{(7)}$
6	6	40,0	$0,33 \pm 0,02^{(7)}$	$0,05 \pm 0,01^{(7)}$	$0,29 \pm 0,02^{(7)}$	$86,2 \pm 8,3^{(7)}$

SST: Sólidos Suspensos Totais; SSF: Sólidos Suspensos Fixos; SSV: Sólidos Suspensos Voláteis.

Os números entre parênteses referem-se ao número de amostras utilizadas para média.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

Diante dos resultados obtidos na Tabela 5.26, 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 total dos metabólitos solúveis presentes no efluente, do glicerol remanescente e dos sólidos suspensos voláteis (SSV). A diferença entre a DQO total e a DQO medida nos reatores RM1 e RM2 são apresentados na Tabela 5.27 e Tabela 5.28, respectivamente. Pode-se notar que em todas as fases operacionais dos reatores, houve diferença percentual significativa, apresentando

diferença negativa, o que pode ser atribuído a metabólitos no efluente que não foram detectados.

Tabela 5.27 – Balanço de DQO para as 3 fases operacionais que apresentaram acúmulo de metabolitos no RM1.

DQO (mg DQO L ⁻¹)														
Fase	1,3-PDO	MetOH	ButOH	HAc	HPr	HIsoBu	HBu	HIsoVa	HVa	G _{eflu} '	SSV	DQO _{total}	DQO _{medida}	Dif. (%)
4	46,83	27,34	64,59	93,38	117,77	12,04	35,27	10,04	3,06	59,40	0,00	469,72	923,53	-49,1
5	123,61	27,13	64,61	101,73	124,92	8,87	19,94	7,46	2,33	50,71	0,00	531,31	1870,92	-71,6
6	149,28	97,21	258,26	490,59	636,00	44,36	90,82	25,54	8,74	66,43	0,00	1867,22	2998,24	-37,7

1,3-PDO: 1,3-propanodiol; MetOH: metanol; ButOH: butanol; HAc: ácido acético; HPr: ácido propiônico; HIsoBu: ácido isobutírico; HBu: ácido butírico; HIsoVa: ácido isovalérico; HVa: ácido valérico; G_{eflu}': glicerol efluente em DQO; SSV: sólidos suspensos voláteis.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

Tabela 5.28 – Balanço de DQO para as 6 fases operacionais realizadas no RM2.

DQO (mg DQO L ⁻¹)																
Fase	1,3-PDO	MetOH	EtOH	ButOH	HAc	HPr	HIsoBu	HBu	HIsoVa	HVa	HCa	G _{eflu} '	SSV	DQO _{total}	DQO _{medida}	Dif. (%)
1	0,00	80,01	0,00	112,16	1423,70	1890,48	133,24	639,72	424,41	317,22	0,00	68,58	0,00	5089,51	7955,64	-36,0
2	369,32	75,13	0,00	112,22	1184,62	2336,24	102,13	644,88	174,62	202,83	11,36	135,18	0,00	5348,54	7290,32	-26,6
3	656,33	71,62	43,45	107,54	1613,87	1520,14	119,81	1019,35	117,77	76,78	28,18	215,03	0,00	5589,87	9184,06	-39,1
4	1957,22	65,90	20,00	100,16	1737,82	1199,04	151,70	1096,07	115,94	46,39	7,54	598,96	0,00	7096,74	9467,96	-25,0
5	2295,87	72,59	361,27	114,79	2290,54	862,12	133,44	1311,65	140,70	97,53	0,00	805,96	0,00	8486,45	10819,73	-21,6
6	1780,30	69,67	449,08	113,84	1167,95	636,05	73,74	2529,71	76,55	42,04	0,00	2435,02	0,00	9373,95	9883,10	-5,2

1,3-PDO: 1,3-propanodiol; MetOH: metanol; EtOH: etanol; ButOH: butanol; HAc: ácido acético; HPr: ácido propiônico; HIsoBu: ácido isobutírico; HBu: ácido butírico; HIsoVa: ácido isovalérico; HVa: ácido valérico; HCa: ácido capríco; G_{eflu}': glicerol efluente em DQO; SSV: sólidos suspensos voláteis.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

5.2.7 Análise comparativa dos reatores metanogênicos

Após a observação dos resultados nas diferentes condições operacionais dos reatores RM1 e RM2 para a produção de metano, foi possível avaliar a influência da estratégia de adaptação adotada na operação dos RALF metanogênicos. A Tabela 5.29 apresenta os parâmetros de produção de metano, além das cargas orgânicas removidas e ácidos voláteis acumulados nos ensaios em que os reatores foram operados sob a mesma carga orgânica aplicada, sendo a TCO' de 7,0 kg DQO m⁻³ d⁻¹ – ensaio 6 (6^a fase operacional) para o RM1 e 6,7 kg DQO m⁻³ d⁻¹ – ensaio 1 (1^a fase operacional) para o RM2.

Tabela 5.29 – Comparação entre a produção de metano, carga orgânica removida e acúmulo de ácidos voláteis nos reatores RM1 e RM2.

Reator	Ensaio 6 – RM1	Ensaio 1 – RM2
Conversão de glicerol (%)	99,2 ± 0,3 ⁽¹⁴⁾	99,4 ± 0,2 ⁽²³⁾
Remoção de DQO (%)	62,3 ± 3,5 ⁽¹⁰⁾	36,0 ± 2,1 ⁽¹⁰⁾
TCO_{removida}' (kg DQO m⁻³ d⁻¹)	5,0 ± 0,5 ⁽¹⁰⁾	3,0 ± 0,2 ⁽¹⁰⁾
AGV_{efluente} (mg HAc L⁻¹)	383 ± 44 ⁽¹¹⁾	2615 ± 232 ⁽¹¹⁾
AI/AP_{efluente}	0,37 ± 0,05 ⁽¹¹⁾	1,14 ± 0,10 ⁽¹¹⁾
CH₄ (%)	57,0 ± 1,9 ⁽¹⁶⁾	52,2 ± 3,6 ⁽²⁰⁾
PVM (L d⁻¹ L⁻¹)	4,27 ± 0,36 ⁽¹¹⁾	1,98 ± 0,17 ⁽¹⁰⁾
MY (m³ CH₄ kg⁻¹ DQO_{aplicada})	0,22 ± 0,01 ⁽¹¹⁾	0,13 ± 0,01 ⁽¹⁰⁾

TCO_{removida}': taxa de carregamento orgânico removida em DQO;

AGV_{eflu}: ácidos graxos voláteis efluente; AI: alcalinidade intermediária; AP: alcalinidade parcial;

PVM: produção volumétrica de CH₄; MY: rendimento de CH₄ em DQO.

Os números entre parênteses referem-se ao número de amostras utilizadas para média.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

Diante da Tabela 5.29, é possível observar que sob taxas de carregamento orgânico aplicadas (TCO') próximas os reatores apresentaram comportamento distinto, sendo as condições que melhor favoreceram a produção de CH₄ encontradas no RM1. Isso ocorreu devido às diferenças operacionais adotadas para os RALF metanogênicos, sendo que a estratégia de adaptação em diferentes concentrações afluente de glicerol e TDH fixo, utilizada durante a operação do RM1, não foi tão agressiva ao sistema, apresentando maior estabilidade nos parâmetros avaliados ao longo de sua operação. A estratégia de operação sem adaptação realizada no RM2, por sua vez, apresentou resultados que não propiciaram valores

promotores para os indicadores de desempenho desse reator, de modo que o mesmo iniciou sua operação em uma condição de instabilidade e não conseguiu se recuperar da sobrecarga no sistema.

Dessa forma, observou-se que a etapa limitante do processo foi a metanogênese, sendo que a acidogênese não foi influenciada pelas estratégias de adaptação adotadas nos RALF metanogênicos, apresentando conversões de glicerol superiores a 90%, conforme apresentado na Tabela 5.29. Assim, a avaliação da adaptação da metanogênese foi fundamental para explicar o comportamento dos reatores, quando submetidos à mesma taxa de carregamento orgânico aplicada (TCO').

Os resultados obtidos evidenciam que o sucesso no processo de produção de metano por fermentação de glicerol estaria em encontrar um equilíbrio entre a concentração de matéria orgânica aplicada no afluente do reator e o tempo que os microrganismos acidogênicos têm para fermentar esse substrato antes de atingir o nível crítico de pressão parcial de H_2 , além do tempo que os microrganismos metanogênicos têm para consumir os ácidos voláteis produzidos durante a fermentação. A aplicação de TDH elevados e baixas concentrações de glicerol levaram a resultados satisfatórios de produção de CH_4 , com baixa produção de AGV e conseqüentemente alta remoção de DQO.

Frente ao exposto ao longo desse estudo e principalmente, pelos resultados compilados na Tabela 5.29, é possível observar que existem condições específicas que favorecem a produção de metano a partir da digestão anaeróbia do glicerol. Esse estudo teve como seu principal objetivo, a determinação dessas condições, uma vez que a produção biológica de metano a partir de um resíduo industrial barato e abundante, tem se tornado um tema urgente e ambientalmente atrativo.

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos nas fases operacionais estabelecidas no RALF acidogênico (RA) e nos RALF metanogênicos (RM1 e RM2), pode-se concluir que:

- RALF Acidogênico – RA

A composição de H₂ obtida no biogás produzido manteve-se constante e elevada, com valor máximo de $78,5 \pm 3,2\%$ no tempo de detenção hidráulica (TDH) de 0,5 h, assim como a produtividade volumétrica de H₂, que apresentou tendência de aumento alcançando valor máximo de $1,46 \pm 0,16 \text{ L h}^{-1} \text{ L}^{-1}$, nessa mesma condição. O máximo valor de rendimento de H₂ foi $1,28 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ glicerol}_{\text{consumido}}$, atingido no TDH de 1 h.

Os principais metabólitos obtidos foram: HBU, 1,3-PDO, HPr, HAc e ButOH. Verificou-se um predomínio de HBU durante a operação do reator, o que justifica a elevada produção de H₂ alcançada, porém houve expressiva formação de 1,3-PDO no TDH de 6 h, o qual apresentou valor máximo de rendimento de 1,3-PDO de $0,80 \pm 0,15 \text{ mol 1,3-PDO mol}^{-1} \text{ glicerol}_{\text{consumido}}$, neste TDH.

- RALF Metanogênico – RM1 e RM2

Verificou-se que a estratégia de operação de adaptação em diferentes concentrações afluente de glicerol ($1,0$ a $7,0 \text{ g L}^{-1}$) em TDH de 24 h no RM1, apresentou resultados elevados e próximos ao teórico. O máximo conteúdo, $86,2 \pm 1,6\%$, produtividade volumétrica, $4,27 \pm 0,36 \text{ L d}^{-1} \text{ L}^{-1}$ e rendimento de CH₄, $0,47 \pm 0,02 \text{ m}^3 \text{ CH}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ DQO}_{\text{aplicada}}$, foram atingidos nas TCO' de 1,0, 7,0 e 3,0 kg DQO m⁻³ d⁻¹, respectivamente. Durante a operação deste RALF, os principais metabólitos verificados foram: HAc, HPr e 1,3-PDO.

Em relação ao RM2, observou-se que a aplicação de elevadas taxas de carregamento orgânico (TCO') em um reator não adaptado, mostrou-se degenerativa à capacidade de produção de CH₄, devido ao elevado acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGV) no efluente, em todas as fases operacionais. A sobrecarga de HAc, HPr, HBU e 1,3-PDO podem ter levado a instabilidade do sistema, visto que, esses foram os principais metabólitos verificados no efluente durante a operação do reator.

7 SUGESTÕES

Diante dos resultados obtidos nesse estudo, sugere-se para pesquisas posteriores e complementares a esta:

- Comparar a produção contínua de H_2 e CH_4 a partir de glicerol bruto utilizando diferentes concentrações afluente sob faixa de temperatura termofílica e hipertermofílica em reatores de alta taxa;
- Avaliar a co-digestão de glicerol bruto com resíduos agroindustriais com objetivo de obter melhor adaptação do inóculo ao substrato empregado e produção de bioenergia em reatores termofílicos de alta taxa;
- Avaliar a produção contínua de H_2 e CH_4 em sistema sequencial (reator acidogênico associado a reator metanogênico) a partir de glicerol bruto nas faixas mesofílicas e termofílicas;
- Analisar a adaptação de diferentes fontes de inóculo a faixas de temperatura termofílica para produção de H_2 e CH_4 a partir de glicerol bruto.

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**, v. 84, p. 515 – 522, 1998.

ADHIKARI, S.; FERNANDO, S. D.; HARYANTO, A. Hydrogen production from glycerol: an update. **Energy Conversion and Management**, v. 50, p. 2600 – 2604, 2009.

AHRING, B. K.; SANDBERG, M.; ANGELIDAKI, I. Volatile fatty acids as indicators of process imbalance in anaerobic digestors. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 43, p. 559 – 565, 1995.

AKUTSU, Y.; LI, Y.Y.; HARADA, H.; YU, H.Q. Effects of temperature and substrate concentration on biological hydrogen production from starch. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, p. 2558 – 2566, 2009a.

AKUTSU, Y.; LEE, D. Y.; LI, Y. Y.; NOIKE, T. Hydrogen production potentials and fermentative characteristics of various substrates with different heatpretreated natural microflora. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, p. 5365 – 5372, 2009b.

ALBUQUERQUE, M. F. G. **Tratamento do glicerol bruto proveniente da produção de biodiesel visando a geração de metano**. 2014. 80 f. Dissertação (Mestrado). Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2014.

AMORIM, E. L. C. de. **Efeito da concentração de glicose e da alcalinidade na produção de hidrogênio em reator anaeróbico de leite fluidificado**. Tese (Doutorado). Escola de Engenharia de São Carlos, Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

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**, v. 34, p. 783 – 790, 2009.

AMORIM, E.L.C.; SADER, L.T.; SILVA, E.L. Effect of Substrate Concentration on Dark Fermentation Hydrogen Production Using an Anaerobic Fluidized Bed Reactor. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 166, p. 1248 – 1263, 2012.

ANDALIB, M.; HAFEZ, H.; ELBESHISHY, E.; NAKHLA, G.; ZHU, J. Treatment of thin stillage in a high-rate anaerobic fluidized bed bioreactor (AFBR). **Bioresource Technology**, v. 121, p. 411 – 418, 2012.

ANDERSON, K. G.; KASAPGIL, B.; INCE, O. Microbiological study of two-stage anaerobic digestion during start-up. **Water Research**. v. 28, p. 2383 – 2392, 1994.

APHA - American Public Health Association. **Standard methods for examination of water and wastewater**. 22 ed., Washington DC, USA, 2012.

AQUINO, S. F.; CHERNICHARO, C. A. L. Build up of volatile fatty acids (VFA) in anaerobic reactors under stress conditions: Causes and control strategies. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 10, p. 152 – 161, 2005.

AZBAR, N.; DOKGOZ, F.T.; KESKIN, T. Comparative evaluation of biohydrogen production from cheese whey wastewater under thermophilic and mesophilic anaerobic conditions. **International Journal Green Energy**, v. 6, p. 192 – 200, 2009a.

AZBAR, N.; DOKGOZ, F.T.; KESKIN, T. Continuous fermentative hydrogen production from cheese whey wastewater under thermophilic anaerobic conditions. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.34, p.7441 – 7447, 2009b.

BASTIDAS-OYANEDEL; J.; MOHD-ZAKI, Z.; ZENG, R.J; BERNET, N.; PRATT, S.; STEYER, J.; BATSTONE, D.J. Gas controlled hydrogen fermentation. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 503 – 509, 2012.

BARBIRATO, F.; CAMARASA-CLARET, C.; GRIVET, P. J.; BORIES, A. Glycerol fermentation by a new 1,3-propanediol-producing microorganism: *Enterobacter agglomerans*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 43, p.786 – 793, 1995.

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

BARBIRATO, F.; HIMMI, E. H.; CONTE, T.; BORIES, A. 1,3-propanediol production by fermentation: an interesting way to valorize glycerin from the ester and ethanol industries. **Industrial Crops and Products**, v. 7, p. 281 – 289, 1998.

BARROS, A. R. **Influência de diferentes materiais suporte na produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidizado**. 2009. 101 f. Dissertação (Mestrado) – 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**, v. 35, p. 3379 – 3388, 2010.

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

BENDER, M. Economic feasibility review for community-scale farmer cooperatives for biodiesel. **Bioresource Technology**, v. 70, p. 81 – 87, 1999.

BEZERRA, R. A.; RODRIGUES, J. A. D.; RATUSZNEI, S. M.; CANTO, C. S. A.; ZAIAT, M. Effect of Organic Load on the Performance and Methane Production of an AnSBBR Treating Effluent from Biodiesel Production. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, v. 165, p. 347 – 368, 2011.

BIEBL, H.; ZENG, A P.; MENZEL, K.; DECKWER, W. D. Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol and 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 50, p. 24 – 29, 1998.

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

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

BODÍK, I.; HUTŇAN, M.; PETHEÖOVÁ, T.; KALINA, A. Anaerobic treatment of biodiesel production wastes. In: **International symposium on anaerobic digestion of solid wastes and energy crops**, Tunisia, Hammamet, 2008.

BONDIOLI, P.; DELLA BELLA, L. An alternative spectrophotometric method for the determination of free glycerol in biodiesel. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 107, p. 153 – 157, 2005.

BOONSAWANG, P.; RERNGNARONG, A.; TONGURAI, C.; CHAIPRAPAT, S. Effect of nitrogen and phosphorus on the performance of acidogenic and methanogenic reactors for treatment of biodiesel wastewater. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 36, p. 643 – 649, 2014.

BOSIO, M. **Produção de Hidrogênio e Metabólitos em Reator Anaeróbico de Leito Fluidizado e em Reator de Leito Granular Expandido a partir de glicerol**. 2014. 111 f. Dissertação (Mestrado) – Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2014.

BRAVO, S. I. M.; LOVATO, G.; RODRIGUES, J. A. D.; RATUSZNEI, S. M.; ZAIAT, M. Biohydrogen Production in an AnSBBR Treating Glycerin-Based Wastewater: Effects of Organic Loading, Influent Concentration, and Cycle Time. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, v. 175, p. 1892 – 1914, 2014.

BUSWELL, A. M.; MUELLEPI, H. F. Mechanism of methane fermentation. **Industrial & Engineering Chemistry**, v. 44, p. 550 – 552, 1952.

CAMERON, D.C.; ALTARAS, N.E.; HOFFMAN, M.L.; SHAW, A.J. Metabolic engineering of propanediol pathways. **Biotechnology progress**, v. 14, p. 116 – 125, 1998.

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**, v. 84, p. 738 – 744, 2009.

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**, v. 42, p. 740 – 744, 2007.

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**, v. 39, p. 9580 – 9587, 2014.

CIRANNA, A.; SANTALA, V.; KARP, M. Biohydrogen production in alkalithermophilic conditions: *Thermobrachium celere* as a case study. **Bioresouce Technology**, v. 102, p. 8714 – 8722, 2011.

DA SILVA, G. P.; CONTIERO, J.; ÁVILA NETO, P. M.; LIMA, C. J. B. 1,3-propanodiol: Produção, aplicações e potencial biotecnológico. **Quimica Nova**, v. 37, p. 527 – 534, 2014.

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

DAMIANO, E. S. G. **Tratamento da vinhaça em reator anaeróbio de leito fluidificado**. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos, Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

DEL NERY, V. **Utilização de lodo anaeróbio imobilizado em gel no estudo da partida de reatores de fluxo ascendente com manta de lodo**. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos, Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1987.

DHARMADI, Y.; MURARKA, A.; GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia Coli*: a new platform for metabolic engineering. **Biotechnol Bioengineering**, v. 94, p. 821 – 929, 2006.

DINH, N. T.; HATTA, K.; KWON, S.; ROLLON, A.; NAKASAKI, K. Changes in the microbial community during the acclimation stages of the methane fermentation for the treatment of glycerol. **Biomass and Bioenergy**, v. 68, p. 240 – 249, 2014.

DILALLO, R.; ALBERTSON, O.E. Volatile acids by direct tritiation. **Jornal Water Pollution Control Federation**, v. 33, p. 356 – 365, 1961.

DILLIS, S.S.; APPERSON, A.; SCHMIDT, M.R.; SAIER, M.H. Carbohydrate transport in bacteria. **Review of Microbiology**, v. 44, p. 385, 1980.

DONG, F.; LI, W.W.; SHENG, G.P.; TANG, Y.; YU, H.Q.; HARADA, H. An onlinemonitored thermophilic hydrogen production UASB reactor for long-term stable operation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, p. 13559 – 13565, 2011.

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

EDWARDS, V.H. The influence of high substrate concentrations on microbial kinetics. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 12, p. 679 – 712, 1970.

FERNÁNDEZ, N.; MONTALVO, S.; FERNÁNDEZ-POLANCO, F.; GUERRERO, L.; CORTÉS, I.; BORJA, R.; SÁNCHEZ, E.; TRAVIESO, L. Real evidence about zeolite as microorganisms immobilizer in anaerobic fluidized bed reactors. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 721 – 728, 2007.

FERREIRA, J. S. **Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidizado a partir de glicerol bruto sob condições termofílicas**. 2014. 107 f. Dissertação (Mestrado). Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2014.

FORESTI, E. Fundamentos do processo de digestão anaeróbio. In: M. Muxi (Ed.). **Tratamento anaeróbio**. Montevideo: Universidad de la Republica. p. 97 – 110, 1994.

FORREST, A. K.; SIERRA, R.; HOLTZAPPLE, M. T. Effect of biodiesel glycerol type and fermentor configuration on mixed-acid fermentations. **Bioresource technology**, v. 101, p. 9185 – 9189, 2010.

FOSBERG, C. W. Production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium acetobutylicum* and others *Clostridium* species. **Applied Environmental Microbiology**, v. 53, p. 639 – 643, 1987.

GALLARDO, R.; FARIA, C.; RODRIGUES, L.; PEREIRA, M.; ALVES, M. Anaerobic granular sludge as a biocatalyst for 1,3-propanediol production from glycerol in continuous bioreactors. **Bioresource Technology**, v. 155, p. 28 – 33, 2014.

GONEN, C.; GUNGORMUSLER, M.; AZBAR, N. Comparative evaluation of pumice stone as an alternative immobilization material for 1,3-propanediol production from waste glycerol by immobilized *Klebsiella pneumoniae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 168, p. 2136 – 2147, 2012.

GONEN, C.; GUNGORMUSLER, M.; AZBAR, N. Continuous production of 1,3-propanediol using waste glycerol with *Clostridium beijerinckii* NRRL B-593 immobilized on glass beads and glass rushing rings. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 27, p. 227 – 234, 2013.

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**, p. 1 – 6, 2009.

GONZALEZ-PAJUELO, M.; ANDRADE, J. C.; VASCONCELOS, I. Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 using a synthetic medium and raw glycerol. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, p. 442 – 446, 2004.

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

GONZÁLEZ-PAJUELO, M.; MEYNIAL-SALLES, I.; MENDES, F.; SOUCAILLE, P.; VASCONCELOS, I. Microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol: physiological comparison of a natural producer, *Clostridium butyricum* VPI 3266, and an engineered strain, *Clostridium acetobutylicum* DG1(pSPD5). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 96 – 101, 2006.

GRUPE, H.; GOTTSCHALK, G. Physiological events in *Clostridium acetobutylicum* during the shift from acidogenesis to solventogenesis in continuous culture and presentation of a model for shift induction. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 3896 – 3902, 1992.

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

GUWY, A.J.; HAWKES, F.R.; HAWKES, D.L.; ROZZI, A.G. Hydrogen production in a high rate fluidized bed anaerobic digester. **Water Research**, v. 31, p. 1291 – 1298, 1997.

HAN, J.; LEE, D.; CHO, J.; LEE, J.; KIM, S. Hydrogen production from biodiesel byproduct by immobilized *Enterobacter aerogenes*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, p. 151 – 157, 2012.

HARPER, S. R.; POHLAND, F. G. Recent developments in hydrogen management during anaerobic biological wastewater treatment. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 28, p. 585 – 602, 1986.

HAZIMAH, A.H.; OOI, T.L.; SALMIAH, A. Recovery of glycerol and diglycerol from glycerol pitch. **Journal of Oil Palm Research**, v. 15, p. 1 – 5, 2003.

HIMMI, E. H.; BORIES, A.; BOUSSAID, A.; HASSANI, L. Propionic acid fermentation of glycerol and glucose by *Propionibacterium acidipropionici* and *Propionibacterium freudenreichii* sp. shermanii. **Applied Microbiology**, v. 53, p. 435 – 440, 2000.

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**, v. 33, p. 121 – 126, 1990.

HULSHOFF POL, L.W.; LENS, P.N.; STAMS, A.J.M.; LETTINGA, G. Anaerobic treatment of sulphate-rich wastewaters. **Biodegradation**, v. 9, p. 213 – 224, 1998.

HUTŇAN, M.; KOLESÁROVÁ, N.; BODÍK, I. Anaerobic digestion of crude glycerol as sole substrate in mixed reactor. **Environmental Technology**, v. 34, p. 2179 – 2187, 2013a.

HUTŇAN, M.; KOLESÁROVÁ, N.; BODÍK, I.; CZOLDEROVÁ, M. Long-term monodigestion of crude glycerol in a UASB reactor. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 88 – 96, 2013b.

INAC, B., MATSUI, S., IDE, S. Propionic acid accumulation in anaerobic digestion of carbohydrate: an investigation on the role of hydrogen gas. **Water Science and Technology**, v. 40, p. 93 – 100, 1999.

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

JARVIS, G. N.; MOORE, E. R.; THIELE, J. H. Formate and ethanol are the major products of glycerol fermentation produced by a *Klebsiella planticola* strain isolated from red deer. **Journal of Applied Microbiology**, v. 83, p. 166 – 74, 1997.

JETTEN, M. S. M.; STAMS, A. J. M.; ZEHNDER, A. J. B. Methanogenesis from acetate: a comparison of the acetate metabolism in *Methanotheroxobrevibacter* and *Methanosarcina* spp. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 88, p. 181 – 197, 1992.

JOHNSON, E.A.; LIN, E.C. *Klebsiella pneumoniae* 1,3-propanediol: NAD⁺ oxidoreductase. **Journal of Bacteriology**, v. 169, p. 2050 – 2054, 1987.

KARGI, F.; EREN, N.S.; OZMIHCI, S. Hydrogen gas production from cheese whey powder (CWP) solution by thermophilic dark fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, p. 2260 – 2266, 2012.

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**, v. 35, p. 1147 – 1156, 2012.

KIM, S. H.; HAN, S. K.; SHIN, H. S. Effect of substrate concentration on hydrogen production and 16S rDNA-based analysis of the microbial community in a continuous fermenter. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 199 – 207, 2006.

KIM, M.; LEE, D.; KIM, D. Continuous hydrogen production from tofu processing waste using anaerobic mixed microflora under thermophilic conditions. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, p. 8712 – 8718, 2011.

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**, v. 36, p. 7074 – 7080, 2011.

KOSKINEN, P.E.P.; KAKSONEN, A.H.; PUHAKKA, L.A. The relationship between instability of H₂ production and compositions of bacterial communities within a dark fermentation fluidized-bed bioreactor. **Biotechnology & Bioengineering**, v. 97, p. 742 – 758, 2007.

KUMAR, N.; GHOSH, A.; DAS, D. Redirection of biochemical pathways for the enhancement of H₂ production by *Enterobacter cloacae*. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 537 – 541, 2001.

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

LETTINGA, G.; HULSHOF, P. L. W.; ZEEMAN, G. Biological wastewater treatment. Part I: Anaerobic wastewater treatment. Lecture Notes. **Wageningen Agricultural University**, ed. 1996.

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**, v. 65, p. 1696 – 1702, 1999.

LEVIN, B.; PITT, L.; LOVE, M. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 29, p. 173 – 185, 2004.

LIN, C.N.; WU, S.Y.; CHANG, J.S. Fermentative hydrogen production with a draft tube fluidized bed reactor containing silicone-gel-immobilized anaerobic sludge. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 31, p. 2200 – 2210, 2006.

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

LOVATO, G.; BEZERRA, R. A.; RODRIGUES, J. A. D.; RATUSZNEI, S. M.; ZAIAT, M. Effect of feed strategy on methane production and performance of an AnSBBR treating effluent from biodiesel production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, p. 2007 – 2029, 2012.

LOVATO, G.; BRAVO, S. I. M.; RATUSZNEI, S. M.; RODRIGUES, J. A. D.; ZAIAT, M. The effect of organic load and feed strategy on biohydrogen production in an AnSBBR treating glycerin-based wastewater. **Journal of Environmental Management**, v. 154, p. 128 – 137, 2015

LÜTHI-PENG, Q.; DILEME, F. B.; PUHAN, Z. Effect of glucose on glycerol bioconversion by *Lactobacillus reuteri*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, p. 289 – 296, 2002.

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**, v. 30, p. 861 – 867, 2008.

MAGASANIK, B.; BROOKE, M. S.; KARIBIAN, D. Metabolic pathways of glycerol dissimilation a comparative study of two strains of aerobacter aerogenes treating barium-L-a-glycerophosphate. **Journal Bacteriology**, v. 66, p. 611 – 619, 1953.

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

MARU, T. B.; BIELEN, M. A. A.; KENGEN, M. W. S.; CONSTANTÍ, M.; MEDINA, F. Biohydrogen production from glycerol using *Thermotoga* spp. **Energy Procedia**, v. 29, p. 300 – 307, 2012.

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

McCARTY, P. L. Anaerobic waste treatment fundamentals. Part one: Chemistry and Microbiology. **Public Works**, v. 95, p. 107 – 112, 1964.

McCARTY, P. L. Energetics and bacterial growth. In: S. D. Faust; J. V. Hunter (Eds.); **Organic Compounds in Aquatic Environments**. p. 495 – 531. Marcel Dekker, Inc. 1971.

MENDES, A. A.; CASTRO, H. F.; PEREIRA, E. B.; JÚNIOR, A. F. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. **Química Nova**, v. 28, p. 296 – 305, 2005.

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**, v. 20, p. 82 – 86, 1997.

MOSEY, F. E. New developments in the anaerobic treatment of industrial wastes. In: **WATER POLLUT. CONTR**, v. 81, p. 540 – 552, 1982.

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

MU, Y.; YU, HQ. Biological hydrogen production in a UASB reactor with granules: physicochemical characteristics of hydrogen-producing granules. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 94, p. 980 – 987, 2006.

NAZARETH, T. C. **Produção microbiológica de ácido propiônico, 1,3-propanodiol e hidrogênio a partir de glicerol bruto em reator anaeróbico de leito fluidizado**. 2015. 110 f. Dissertação (Mestrado). Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015.

NGO, T.; KIM, M. S.; SIM, S. J. High-yield biohydrogen production from biodiesel, manufacturing waste by *Thermotoga neapolitana*. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, p. 58336 – 58342, 2011.

NICIURA, L. C. **Avaliação do uso da banda de rodagem de pneus inservíveis triturada como suporte ao desenvolvimento de biofilmes em um reator anaeróbico de leito expandível**. 2005. 179 f. Tese (Doutorado). Escola de Engenharia de São Carlos, Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

NTAIKOU, I.; ANTONOPOULOU, G.; LYBERATUS, G. Biohydrogen production from biomass and wastes via dark fermentation: a review. **Waste Biomass Valor**, v. 1, p. 21 – 39, 2010.

NUCHDANG, S.; PHALAKORNKULE, C. Anaerobic digestion of glycerol and codigestion of glycerol and pig manure. **Journal of Environmental Management**, v. 101, p. 164 – 172, 2012.

NWACHUKWU R. E. S.; SHAHBAZI, A.; WANG, L.; WORKU, M.; IBRAHIM, S.; SCHIMMEL, K. Optimization of cultural conditions for conversion of glycerol to ethanol by *Enterobacter aerogenes* S012. **AMB Express**, v. 3, p. 3 – 12, 2013.

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**, v. 33, p. 1221 – 1231, 2008.

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

O-THONG, S.; HNIMAN, A.; PRASERTSAN, P.; IMAI, T. Biohydrogen production from cassava starch processing wastewater by thermophilic mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, p. 3409 – 3416, 2011.

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

OH, Y.; RAJ, S.M.; JUNG, G.Y.; PARK, S. Current status of the metabolic engineering of microorganisms for biohydrogen production. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 8357 – 8367, 2011.

OOI, T. L.; YONG, K. C.; HAZIMAH, A. H.; DZULKFLY, K.; WAN-YUNUS, W.M. Z. Glycerine Residue – A Rich Source of Glycerine and Medium Chain Fatty Acids. **Journal of Oleo Science**, v. 53, p. 29 – 33, 2004.

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

PAGLIARO, M.; CIRIMINNA, R.; KIMURA, H.; ROSSI, M.; PINA, C. D. From Glycerol to Value-Added Products. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 46, p. 4434 – 4440, 2007.

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**, v. 92, p. 737 – 744, 2002.

PAPANIKOLAOU, S.; MUNIGLIA, L.; CHEVALOT, I.; AGGELIS, G.; MARC, I. Industrial derivative of tallow: a promising renewable substrate for microbial lipid, single-cell protein and lipase production by *Yarrowia lipolytica*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p. 737, 2007.

PAPANIKOLAOU, S.; FAKAS, S.; FICK, M., CHEVALOT, I.; GALIOTOUPANAYOTOU, M.; KOMAITIS, M; MARC, I.; AGGELIS, G. Biotechnological valorisation of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: production of 1,3-propanediol, citric acid and single cell oil. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, p. 60 – 71, 2008.

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**. Dissertação (Mestrado). Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2016.

PARENTE, E. J. **Biodiesel: uma aventura tecnológica num país engraçado**. Fortaleza, TECBIO, p. 1 – 66, 2003.

PHUKINGNGAM, D.; CHAVALPARIT, O.; SOMCHAI, D.; ONGWANDEE, M. Anaerobic baffled reactor treatment of biodiesel-processing wastewater with high strength of methanol and glycerol: reactor performance and biogas production. **Chemical Papers**, v. 65, p. 644 – 651, 2011.

QATIBI, A. I.; BORIES, A.; GARCIA, J. L. Sulfate reduction and anaerobic glycerol degradation by a mixed microbial culture. **Current Microbiology**, v. 22, p. 47 – 52, 1991.

RAMOS, R. R; SILVA, E. L. Continuous Hydrogen Production from Agricultural Wastewaters at Thermophilic and Hyperthermophilic Temperatures. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, 2016.

RASHID, U.; ANWAR, F. Production of biodiesel through optimized alkaline-catalyzed transesterification of rapessed oil. **Fuel**, v. 87, p. 265 – 273, 2008.

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**, v. 1080, p. 1072 – 1080, 2008.

REIS, C. M.; CAROSIA, M. F.; SAKOMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B. A.; SILVA, E. L. Evaluation of hydrogen and methane production from sugarcane vinasse in an anaerobic fluidized bed reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, p. 8498 – 8509, 2015.

REN, N.; GUO, W.; LIU, B.; CAO, G.; DING, J. Biological hydrogen production by dark fermentation: challenges and prospects towards scaled-up production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, p. 365 – 370, 2011.

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

RINALDI, R.; GARCIA, C.; MARCINIUK, L. L.; ROSSI, A. V.; SCHUCHARDT, U. Síntese de biodiesel: Uma proposta contextualizada de experimento para laboratório de Química Geral. **Química Nova**, v. 30, p. 1374 – 1380, 2007.

RIPLEY, L.E; BOYLE, W.C.; CONVERSE, J.C. Improved alkalimetric monitoring anaerobic digestion of high-strength wastes. **Journal of Water Pollution Control Federation**, v. 58, p. 406 – 411, 1986.

RODRIGUES, C. V.; SANTANA, K. O.; NESPECA, M. G.; OLIVEIRA, J. E.; MAINTINGUER, S. I. Crude glycerol by transesterification process from used cooking oils: Characterization and potentialities on hydrogen bioproduction. **International Journal Of Hydrogen Energy**, v. 41, p. 14641 – 14651, 2016.

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**, v. 161, p. 10 – 19, 2014.

SÁ, L. R. V.; CAMMAROTA, M. C.; FERREIRA-LEITÃO, V. S. Hydrogen production by anaerobic fermentation - general aspects and possibility of using Brazilian agro-industrial wastes. **Química Nova**, v. 37, p. 857 – 867, 2014.

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**, v. 159, p. 55 – 63, 2014a.

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**, v. 39, p. 9000 – 9011, 2014b.

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**, v. 39, p. 9599 – 9610, 2014c.

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

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

SELMA, V. C.; COTRIM, L. H. B.; RODRIGUES, J. A. D.; RATUSZNEI, S. M.; ZAIAT, M.; FORETI, E. ASBR Applied to the Treatment of Biodiesel Production Effluent: Effect of Organic Load and Fill Time on Performance and Methane Production. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, v. 162, p. 2365 – 2380, 2010.

SHIDA, G. M. **Produção de hidrogênio e ácidos orgânicos por fermentação acidogênica em reator anaeróbio de leito fluidizado**. 2008. 105 f. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos, Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

SHIDA, G. M.; BARROS, A. R.; REIS, C. M.; AMORIM, E. L. C.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z.; SILVA, E. L. Long-term stability of hydrogen and organic acids production in an anaerobic fluidized-bed reactor using heat treated anaerobic sludge inoculum. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, p. 3679 – 3688, 2009.

SHIDA, G. M.; SADER, L. T.; AMORIM, E. L. C.; SAKAMOTO, I. K.; MAINTINGUER, S. I.; SAAVEDRA, N. K.; VARESCHE, M. B. A.; SILVA, E. L. Performance and composition of bacterial communities in anaerobic fluidized bed reactors for hydrogen production: Effects of organic loading rate and alkalinity. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, p. 16925 – 16934, 2012.

SILES LÓPEZ, J. A.; MARTÍN SANTOS, M. D. L. A.; CHICA PÉREZ, A. F.; MARTÍN MARTÍN, A. Anaerobic digestion of glycerol derived from biodiesel manufacturing. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5609 – 15, 2009.

SILVA, G. P. DA; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 30 – 9, 2009.

SIQUEIRA, L. M.; DAMIANO, E. S. G.; SILVA, E. L. Influence of organic loading rate on the anaerobic treatment of sugarcane vinasse and biogás production in fluidized bed reactor. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 48, p. 1707 – 1716, 2013.

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

TANGKATHITIPONG, P.; INTANOO, P.; CHAVADEJ, S. Hydrogen and Methane Production from Biodiesel Wastewater with Added Glycerine by Using Two-Stage Anaerobic Sequencing Batch Reactor (ASBR). **Chemical Engineering Transactions**, v. 39, p. 1723 – 1728, 2014.

TEMUDO, M. F.; POLDERMANS, R.; KLEEREBEZEM, R.; LOOSDRECHT, M. C. M. VAN. Glycerol fermentation by (open) mixed cultures: a chemostat study. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 100, p. 1088 – 1098, 2008.

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

VAN GINKEL, S. LOGAN, B. E. Inhibition of biohydrogen production by undissociated acetic and butyric acids. **Environmental Science and Technology**, v. 39, p. 9351 – 9356, 2005.

VAN HAANDEL, A. C.; LETTINGA, GATZE. **Tratamento anaeróbio de esgotos: um manual para regiões de clima quente**. Campina Grande: Epgraf, 1994.

VIANA, M. B. **Produção de biogás a partir do glicerol oriundo de biodiesel**. 2011. 113 f. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos, Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

VLASSIS, T.; STAMATELATOU, K.; ANTONOPOULOU, G.; LYBERATOS, G. Methane production via anaerobic digestion of glycerol: A comparison of conventional (CSTR) and high-rate (PABR) digesters. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 88, p. 2000 – 2006, 2013.

VLASSIS, T.; ANTONOPOULOU, G.; LYBERATOS, G. Anaerobic Treatment of Glycerol for Methane and Hydrogen. **Global NEST Journal**. v. 14, p. 149 – 156, 2012.

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

WALTER, C.; FRIEDEN, E. The prevalence and significance of the product inhibition of enzymes. **Advances in Enzymology and related areas of Molecular Biology**, v. 25, p. 167 – 274, 1963

WANG, Q.; KUNINOBU, M.; OGAWA, H. I.; KATO, Y. Degradation of volatile fatty acids in highly efficient anaerobic digestion. **Biomass and Bioenergy**, v. 16, p. 407 – 416, 1999.

WANG, W. W. J. Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, p. 799 – 811, 2009.

WANG, W.; XIE, L.; CHEN, J.; LUO, G.; ZHOU, Q. Biohydrogen and methane production by co-digestion of cassava stillage and excess sludge under thermophilic condition. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 3833 – 3839, 2011.

WANG, Z. X.; ZHUGE, J.; FANG, H.; PRIOR, B. A. Glycerol production by microbial fermentation: a review. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 201 – 223, 2001.

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

WEILAND, P. Biogas production: current state and perspectives. **Applied Microbiological Biotechnology**, v. 85, p. 849 – 860, 2010.

WIJEKON, K. C.; VISVANATHAN, C.; ABEYNAYAKA, A. Effect of organic loading rate on VFA production, organic matter removal and microbial activity of a two-stage thermophilic anaerobic membrane bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 5353 – 5360, 2011.

WU, S. Y.; LIN, C. N.; CHANG, J. S. Hydrogen production with immobilized sewage sludge in three-phase fluidized-bed bioreactors. **Biotechnology Progress**, v. 19, p. 828 – 832, 2003.

WU, K.J.; CHANG, C.F.; CHANG, J.S. Simultaneous production of hydrogen and bioethanol with fluidized-bed and packed-bed bioreactors containing immobilized anaerobic sludge. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1165 – 1171, 2007.

XIA, Y.; CAI, L.; ZHANG, T.; FANG, H.H.P. Effects of substrate loading and cosubstrates on thermophilic anaerobic conversion of microcrystalline cellulose and microbial communities revealed using high-throughput sequencing. **International Journal Hydrogen Energy**, v. 37, p. 13652 – 13659, 2012.

XIU, Z. L.; CHEN, X.; SUN, Y. Q.; ZHANG, D. J. Stoichiometric analysis and experimental investigation of glycerol-glucose cofermentation in *Klebsiella pneumoniae* under microaerobic conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 33, p. 42 – 52, 2007.

YANG, Y.; TSUKAHARA, K.; SAWAYAMA, S. Biodegradation and methane production from glycerol-containing synthetic wastes with fixed-bed bioreactor under mesophilic and thermophilic anaerobic conditions. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 362 – 367, 2008.

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

YESHANEW, M. M.; FRUNZO, L.; LUONGO, V.; PIROZZI, F.; LENS, P. N. L.; ESPOSITO, G. Start-up of an anaerobic fluidized bed reactor treating synthetic carbohydrate rich wastewater. **Journal of Environmental Management**, v. 184, p. 456 – 464, 2016.

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**, v. 13, p. 1 – 6, 2001.

YU, Y.; LEE, C.; HWANG, S. Analysis of community structures in anaerobic processes using a quantitative real-time PCR method. **Water science and technology: a journal of the International Association on Water Pollution Research**, v. 52, p. 85 – 91, 2005.

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

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

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

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

ZENG, A.P. A new balance equation of reducing equivalents for data consistency check and bioprocess calculation. **Journal of Biotechnology**, v. 43, p. 111 – 124, 1995.

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. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 56, p. 561 – 571, 1996.