

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

**Produção de Hidrogênio e Metabólitos em Reator Anaeróbio de Leito
Fluidizado e em Reator de Leito Granular Expandido a partir de glicerol**

Morgana Bosio

São Carlos

2014

Produção de Hidrogênio e Metabólitos em Reator Anaeróbico de Leito
Fluidizado e em Reator de Leito Granular Expandido a partir de
glicerol

Morgana Bosio

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

Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Silva

São Carlos

2014

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

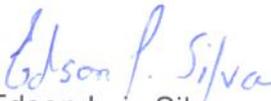
B743p Bosio, Morgana
Produção de hidrogênio e metabólitos em reator anaeróbico de leito fluidizado e em reator de leito granular expandido a partir de glicerol / Morgana Bosio. -- São Carlos : UFSCar, 2016.
111 p.

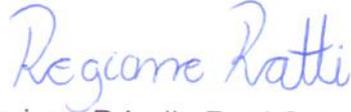
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

1. TDH. 2. Biodiesel. 3. Temperatura mesofílica. 4. Cultura mista. 5. Metabólitos. I. Título.

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE **MORGANA BOSIO** APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 28 DE MARÇO DE 2014.

BANCA EXAMINADORA:


Edson Luiz Silva
Orientador, UFSCar


Regiane Priscila Ratti Sartori
USP


Eugenio Foresti
USP

A Deus que guia meus caminhos.

Ao meu avô, Armelindo Bosio, que me inspirou.

"Não se pode santificar um trabalho
que humanamente seja uma trapallice,
porque não devemos oferecer a Deus
coisas mal feitas."

São Josemaria Escrivá

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que possibilitou e possibilita todas as realizações na minha vida, que me protege, me fortalece e me faz forte nos momentos difíceis.

À minha mãe Idê Maria Bosio, por todo o apoio e incentivo em todos os momentos. Por ser guerreira, ter muita coragem e ser muito forte.

À toda minha família, principalmente os tios Analício, Dulce, Elda, Maria, Jaques, Leida, Dalva e Carlim, pelos primos Bárbara, Henrique, Joelma, Elvis, Sarah, Simone, Hannah e Hayane, pelo apoio em todos os sentidos, pelas alegrias, pelas reuniões mais divertidas e confusas que se pode imaginar, pelos risos sem fim, até mesmo em momentos delicados e também pelo conforto nas horas de necessidade.

Ao meu querido e amado avô Armelindo Bosio, que não está mais presente fisicamente, mas que me inspirou e continua inspirando. Exemplo de humildade, honestidade, simplicidade e coragem, que apesar de não saber ler nem escrever, foi a pessoa mais sábia que já conheci.

À minha avó Benilda Bosser Bosio, mulher incansável e que com criatividade conseguia consertar qualquer coisa, que aparentemente estivesse quebrada, sem dúvida me inspirou muito para resolver incontáveis desafios durante este mestrado.

Aos amigos que me possibilitam momentos inesquecíveis e de amizade profunda e verdadeira. Principalmente a Mayara Aguiar de Oliveira, amiga para todas as horas, a Odila de Fátima Panissa Laureano, que me faz sentir membro de sua família. A Gislane das Graças Vighini Casagrande e Juliana Rafaela Demuner.

As amigas de uma vida toda, Marcell Santório Mantovani e Renata Nascimento Aiolfi, por fazer parte de uma infância que não poderia ter sido melhor. E por saber que posso contar sempre que necessário.

As amigas irmãs Bruna Gonçalves de Souza e Lívia Massula que foram sem nenhuma dúvida presentes de Deus, que estiveram presentes em os momentos de alegria, tristeza e que foram testemunhas de um crescimento pessoal e espiritual.

Aos amigos, ou melhor, a família do GOU (Grupo de Oração Universitária), que me mostrou um lugar cheio de amor e o sonho de levar esse amor para todo o mundo. Pelos almoços e momentos de partilha. Principalmente aos amigos Henry, Murillo, Laís (Best), Livinha, Fábica Monique, Nathan, Edimilson, Rodrigo, Manu, Maria Angélica, Karem, Leandro, Leonardo,

Micheli, Mari, Rafael, Maya, Miriam, João Pedro, Franklin, Klícia, André Felipin, Vittor, Thairiny, Caroline, Luana, Graziela, Thiago, Isabella, Dani, Raphael, Daniel e Renato. Com agradecimento especial a amiga Júlia Pires Pasetto pelos incríveis momentos na jornada mundial da juventude e outros tantos que vivemos, pela grande amizade e carinho e ao super amigo André Marino, por me ouvir, por dar conselhos, por rezar para mim e por se tornar um irmão que teria por toda vida.

Aos amigos feitos em São Carlos, Laís Reis Borges e Jorge Augusto Mendes Burak que fizeram de minha estadia em uma cidade diferente ser agradável e divertida. Pelas muitas aventuras, pelos almoços de domingo e pelas horas de conversa. Amigos que com certeza serão para uma vida inteira.

Aos colegas e amigos do Departamento de Engenharia Química (DEQ) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) que fazem do local de trabalho, um lugar de ajuda mútua e crescimento profissional.

As amigas de laboratório, pelas risadas, ensinamentos e terapia em grupo, sem os quais a etapa experimental deste trabalho se tornaria impossível. Principalmente a Janaína dos Santos Ferreira que além de ser uma super parceira na parte experimental, se tornou uma amiga mais que especial que se pode contar todas as horas. A Carolina Zampol Lazaro, amiga valente e muito querida, que esta preparada para qualquer obstáculo. A Cristiane Marques dos Reis que além de fazer parte da minha vida profissional foi amiga fundamental para que a vida em São Carlos se tornasse leve e alegre. A Samantha Santos que fazia do laboratório um lugar incrivelmente alegre, uma vez que é impossível não sorrir ao ver alguém com tanta felicidade. A Mariana Carosia que com sua sinceridade cativava a cada um em sua volta, amiga para pedir opiniões e conselhos. A Lívia Otaviano que fez do ambiente de trabalho, um lugar familiar e por ser tão animada, mesmo quando algumas coisas não davam certo. A Paula Rubia Ferreira Rosa que era a referência para todas as meninas do laboratório e que estendia a mão sempre que necessitávamos.

Ao professor Dr. Edson Luiz Silva, pela orientação e grande auxílio nos momentos de necessidade profissional e principalmente pessoal. Por instigar a curiosidade em cada etapa experimental.

Aos técnicos da oficina Adilson pelo auxílio na manutenção dos reatores e ao senhor Oscar da Silva, pelos cafés todas as manhãs, conselhos, risadas, pelo humor mais ácido que já vi, pela

manutenção e conserto de emergência nos reatores, sem os quais seria impossível a realização deste trabalho.

Aos funcionários de serviços gerais, por manter a ordem e a limpeza do local de trabalho.

Aos professores do DEQ da UFSCar por dividir suas experiências e ensinar com tranquilidade e entusiasmo.

As secretárias do DEQ, Alcione, Evelin e Raquel, por ajudarem e fazerem com que as burocracias fossem minimizadas.

Ao técnico Amadeus do DEQ da UFSCar por realizar de maneira prestativa, análises fundamentais para a finalização deste trabalho.

Aos funcionários e alunos do Departamento de Hidráulica e Saneamento da USP de São Carlos, por auxiliar e realizar análises em várias etapas do estudo. Em especial a Maria Angela Adorno (Janja) e Lívia Botta.

A banca de qualificação professora Dr^a.Maria Bernadete e pesquisadora Dr^a Regiane Ratti pelas sugestões e contribuições.

Ao professor Dr. Eugênio Foresti e a pesquisadora Dr^a Regiane Ratti por aceitarem participar da banca de defesa de dissertação, momento tão importante em minha vida.

E a todos que foram fundamentais neste período de minha vida pessoal e profissional e que não foram mencionados neste agradecimento.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE TABELAS	XII
LISTA DE SIGLAS	XIII
RESUMO.....	XIV
ABSTRACT.....	XV
1 - INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS.....	18
2.1. OBJETIVO GERAL	18
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1 – BIODIESEL.....	19
3.2 GLICEROL	22
3.3 – HIDROGÊNIO	24
3.4 – REATORES.....	25
3.4.1 – Reator Anaeróbio de Leito Fluidizado - RALF.....	27
3.4.2 – Reator de Leito Granular Expandido – EGSB.....	31
3.5 – PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO E METABÓLITOS A PARTIR DO GLICEROL: ENFÂSE EM BIOREACTORES	33
4 – MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1 - SUBSTRATO.....	45
4.2 - REATOR RALF	45
4.3 - REATOR EGSB	46
4.4 – SISTEMA DE ALIMENTAÇÃO E RECIRCULAÇÃO DOS REATORES	46
4.4 - ALIMENTAÇÃO DOS REATORES.....	47
4.5 - INÓCULO	48
4.6 - MATERIAL SUPORTE	49
4.7 - ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS.....	51
4.8 - DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS VOLÁTEIS INDIVIDUAIS E ALCOÓIS.....	51
4.9 - ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DO BIOGÁS E QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO	52
4.10 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARRIDURA (MEV)	52
4.11 – FREQUÊNCIA DAS ANÁLISES	53
5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
5.1 – REATOR RALF.....	54
5.1.1 – Consumo de Glicerol.....	54
5.1.2 – Remoção de DQO.....	55
5.1.3 – pH.....	57
5.1.4 – Conteúdo de Hidrogênio no Biogás.....	58
5.1.5 – Produtividade Volumétrica de Hidrogênio.....	61
5.1.6 – Rendimento de Hidrogênio	63
5.1.7 – Produção de Metabólitos.....	65

5.1.8 – <i>Balanço de DQO</i>	70
5.2 – REATOR EGSB.....	71
5.2.1 – <i>Consumo de Glicerol</i>	71
5.2.2 – <i>Remoção de DQO</i>	72
5.2.3 – <i>pH</i>	74
5.2.4 – <i>Conteúdo de Hidrogênio no Biogás</i>	75
5.2.5 – <i>Produtividade Volumétrica de Hidrogênio</i>	77
5.2.6 – <i>Rendimento de Hidrogênio</i>	80
5.2.7 – <i>Produção de Metabólitos</i>	82
5.2.8 – <i>Balanço de DQO</i>	87
5.2.9 – <i>Grânulos e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i>	88
5.3 – COMPARAÇÃO ENTRE OS READORES RALF E EGSB	92
5.3.1 – <i>Consumo de Glicerol</i>	92
5.3.2 – <i>Conteúdo de Hidrogênio no Biogás</i>	93
5.3.3 – <i>Produtividade Volumétrica de Hidrogênio</i>	94
5.3.4 – <i>Rendimento de Hidrogênio</i>	95
5.3.5 – <i>Produção de Metabólitos</i>	96
6 - CONCLUSÕES	100
7 - REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	101

LISTA DE FIGURAS

Figura 3. 1 – Evolução dos biocombustíveis no Brasil (ANP, 2013a).....	20
Figura 3. 2 – Produção de biodiesel (L) no Brasil de 2005 a julho de 2013 (Adaptado ANP, 2013b). ..	21
Figura 3. 3– Projeção da produção de biodiesel (REVISTA FAPESP, 2012).	21
Figura 3. 4– Porcentagens de óleos vegetais e gorduras animais usados como matéria prima na produção de biodiesel (REVISTA FAPESP, 2012).	22
Figura 3. 5 – Reação de transesterificação (KNOTHE et al., 2006).	23
Figura 3. 6– Principais setores industriais de aplicação da glicerina (MOTA et al., 2009)	23
Figura 3. 7– Estrutura de um grânulo de um reator UASB (ABBASI e ABBASI, 2012).	31
Figura 3. 8 – Rota fermentativa a partir do glicerol (SARMA et al., 2012; MARU et al., 2013).	34
Figura 3. 9 – Diferentes microrganismo e o que é produzido a partir do glicerol (MARU et al., 2013; KIVISTÖ et al., 2010; REUNGSANG et al., 2013).	38
Figura 4. 1 – Sistema completo do reator R1 e R2. 1 – Reator; 2 – Bomba de Recirculação; 3 – Bomba de alimentação; 4 – Tanque de alimentação; 5 – Banho Termostático (Acervo do Autor).	47
Figura 4. 2 – Cinasita, material suporte do RALF.	50
Figura 4. 3 - Grânulos utilizados no reator EGSB.	50
Figura 5. 1 – Consumo de glicerol do reator RALF.....	54
Figura 5. 2 – Remoção de DQO do reator RALF em todas as fases de operação.....	56
Figura 5. 3 – Variação do pH afluente e efluente do reator RALF.	57
Figura 5. 4 – Conteúdo de hidrogênio no biogás do reator RALF.	59
Figura 5. 5 – Produtividade volumétrica de hidrogênio no reator RALF.	61
Figura 5. 6 – Rendimento de hidrogênio no reator RALF.	63
Figura 5. 7 – Metabólitos produzidos no RALF nos diferentes TDH.	65
Figura 5. 8 – Concentração de metabólitos no reator RALF.....	66
Figura 5. 9 – Consumo de glicerol do reator EGSB em todas as fases de operação.....	71
Figura 5. 10 – Remoção de DQO no reator EGSB nas diferentes fases.	73
Figura 5. 11 – pH do afluente e do efluente do reator EGSB.....	74
Figura 5. 12 – Conteúdo de hidrogênio no biogás do reator EGSB.	76
Figura 5. 13 – Produtividade Volumétrica do reator EGSB.....	78
Figura 5. 14 – Rendimento de H ₂ do reator EGSB em todas as fases de operação.....	80
Figura 5. 15 – Produção de metabólitos do reator EGSB.	82
Figura 5. 16 – Concentração (mg.L-1) dos metabólitos do reator EGSB.	84
Figura 5. 17 – Grânulos no interior do reator EGSB na fase 3.	88
Figura 5. 18 (a), (b) e (c) - Superfícies de grânulos do reator EGSB ampliadas 500 vezes.....	89

Figura 5. 19 (a), (b) e (c) – Superfície dos grânulos ampliadas 3.000 vezes.	90
Figura 5. 20 – (a) ampliada 3.000 vezes e (b) ampliada 5.000 vezes de grânulos do reator EGSB.....	91
Figura 5. 21 – Grânulo do reator EGSB.....	91
Figura 5. 22 – Consumo de glicerol dos reatores RALF e EGSB.....	93
Figura 5. 23 – Conteúdo de hidrogênio no biogás nos reatores RALF e EGSB.	94
Figura 5. 24 – Produtividade de H ₂ dos reatores RALF e EGSB.	95
Figura 5. 25 – Rendimento dos reatores RALF e EGSB.....	96
Figura 5. 26 – Concentração de 1,3-PD dos reatores RALF e EGSB em diferentes fases.	97
Figura 5. 27 – Produção de Etanol nos reatores RALF e EGSB.....	97
Figura 5. 28 – Produção de Ácido Acético nos reatores RALF e EGSB.	98
Figura 5. 29 – Produção de Ácido Propiônico nos reatores RALF e EGSB.	98
Figura 5. 30 – Produção de Ácido Acético nos reatores RALF e EGSB.	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 3. 1 – Parâmetros utilizados em reatores contínuos.....	26
Tabela 3. 2 – Concentrações de produtos finais a partir de diferentes inóculos (MARU et al. 2013). .	37
Tabela 4. 1 – Característica do glicerol bruto utilizado no estudo.	45
Tabela 4. 2 – Número de fases, TDH e vazão correspondentes para RALF.....	46
Tabela 4. 3 - Número de fases, TDH e vazão correspondentes para EGSB.....	46
Tabela 4. 4 – Água residuária a ser utilizada (DEL NERY, 1987).	48
Tabela 4. 5 – Característica da material suporte.	49
Tabela 4. 6 – Frequência das análises nos reatores RALF e EGSB.	53
Tabela 5. 1 - Conteúdo de hidrogênio em diferentes reatores e substratos	60
Tabela 5. 2 – Porcentagem molar (% Molar) dos metabólitos produzidos no reator RALF.....	67
Tabela 5. 3 – Concentrações (mg.L ⁻¹) dos metabólitos do reator RALF	67
Tabela 5. 4 – Rendimento de alguns metabólitos a partir do glicerol.	68
Tabela 5. 5– Balanço de DQO do reator RALF em todas as fases de operação.	70
Tabela 5. 6 – Porcentagem molar (% Molar) dos metabólitos do reator EGSB.....	83
Tabela 5. 7 – Concentração (mg.L ⁻¹) dos metabólitos do reator EGSB.	83
Tabela 5. 8 – Rendimento de 1,3-propanodiol do reator EGSB.....	85
Tabela 5. 9 – Rendimento de ácido propiônico a partir do glicerol consumido.....	86
Tabela 5. 10 – Balanço de DQO do reator EGSB.	87
Tabela 5. 11 – Número de fases e TDH correspondente de ambos os reatores.	92
Tabela 5. 12 – Porcentagem de consumo de substrato nos reatores RALF e EGSB.....	93

LISTA DE SIGLAS

1,3-PD – 1,3-Propanodiol

AFBR - Anaerobic fluidized bed reactor

CO₂ – Gás Carbônico

CSTR (Continuous Stirred Tank Reactor) – Reator de mistura perfeita

DQO – Demanda química de oxigênio

EGSB (Expanded Granular Sludge Bed) – Reator de leito granular expandido

H₂ – Gás Hidrogênio

HPR - Hydrogen production rate

HY - Hydrogen yield

RALF – Reator anaeróbio de leito fluidizado

TDH – Tempo de detenção hidráulica

UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) – Reator anaeróbio de fluxo ascendente com manta de lodo.

RESUMO

O presente estudo avaliou a produção biológica de hidrogênio utilizando glicerol bruto como matéria-prima em dois reatores anaeróbios: (1) reator anaeróbio de leito fluidizado (RALF), que possibilita elevada transferência de massa, e (2) um reator de leito granular expandido (EGSB), que pode apresentar alta eficiência mesmo quando aplicadas elevadas cargas orgânicas. No RALF, foi avaliada a influência do TDH (14, 12, 10, 8, 6, 4, 2 e 1 hora) na produção de hidrogênio utilizando o glicerol bruto como matéria-prima na concentração de 5 g.L⁻¹ e argila expandida como material de suporte. No EGSB, o TDH estudado variou de 24 a 1 hora, e o substrato e a concentração foram as mesmas que os utilizadas no RALF. Os reatores foram mantidos em temperatura controlada de 30 °C. O inóculo para ambos os reatores, RALF e EGSB, foi lodo granular de reator UASB utilizado no tratamento de água residuária de abatedouro de aves, que foi previamente submetido ao tratamento térmico. No RALF, a taxa de produção de hidrogênio (HPR) aumentou de 0,08 para 0,73 L.h⁻¹.L⁻¹ com a diminuição do TDH de 14 para 1 hora, respectivamente. O rendimento de hidrogênio (HY) não apresentou a mesma tendência e manteve-se praticamente inalterado (0,62; 0,76; 0,73; 0,75; 0,60; 0,58; 0,69 e 0,85 molH₂.mol⁻¹glicerol). Para este reator, os principais metabólitos foram 1,3-propanodiol (1,3-PD), etanol, ácido acético, butírico e propiônico. A maior concentração de 1,3- PD (1.230 mg.L⁻¹), etanol (723 mg.L⁻¹), ácido acético (204 mg.L⁻¹), ácido propiônico (759 mg.L⁻¹) e ácido butírico (324 mg.L⁻¹) foi observada nos TDH de 6, 14, 8, 2, 6 horas, respectivamente. No EGSB, o HPR e HY apresentaram a mesma tendência: o HPR aumentou de 0,018-1,708 L.h⁻¹.L⁻¹ e o HY aumentou de 0,19-2,87 molH₂.mol⁻¹ glicerol com a diminuição do TDH de 14 para 1 hora. Para ambos os reatores, o RALF e o EGSB, a maior HPR e o maior HY foram observados no TDH de 1 hora. Assim como para o RALF, os principais metabólitos quantificados no EGSB foram 1,3- propanodiol (1,3-PD), etanol, ácido acético, ácido butírico e ácido propiônico. A maior concentração de 1,3- PD (1.606 mg.L⁻¹), etanol (400 mg.L⁻¹), ácido acético (219 mg.L⁻¹), ácido propiônico (1.07 mg.L⁻¹) e ácido butírico (248 mg.L⁻¹) foi observada no TDH de 16, 12, 16, 8 e 20 horas, respectivamente.

Palavras- Chave: TDH, biodiesel, temperatura mesofílica, cultura mista, metabólitos.

ABSTRACT

This work aimed to evaluate the biological hydrogen production using crude glycerol as feedstock in two anaerobic reactors: (1) anaerobic fluidized bed reactor (AFBR), that allows high mass transfer, and (2) an expanded granular sludge blanket reactor, that can be used with high efficiency even at high organic loading. In the AFBR, it was evaluated the influence of HRT (14, 12, 10, 8, 6, 4, 2 and 1 hour) in the hydrogen production using crude glycerol as feedstock at 5 g.L⁻¹ and expanded clay as support material. In the EGSB, the HRT varied from 24 to 1 hour, it was used the same feedstock as that used in the AFBR. The reactors were maintained at controlled temperature at 30°C. The inoculum for AFBR and EGSB was granular sludge taken from UASB reactor treating poultry slaughterhouse that was previously submitted to heat treatment. In the AFBR, the hydrogen production rate (HPR) increased from 0.08 to 0.73 L.h⁻¹.L⁻¹ with the decrease at HRT from 14 to 1 hour, respectively. The hydrogen yield (HY) did not present the same trend and remained almost unchanged (0.62, 0.76, 0.73, 0.75, 0.60, 0.58, 0.69, 0.85 molH₂.mol⁻¹glycerol). For this reactor, the main byproducts were 1,3-propanediol (1,3-PD), ethanol, acetic, butyric and propionic acid. The highest 1,3-PD (1,230 mg.L⁻¹), ethanol (723 mg.L⁻¹), acetic acid (204 mg.L⁻¹), propionic acid (759 mg.L⁻¹) and butyric acid (324 mg.L⁻¹) concentration occurred at HRT of 6, 14, 8, 2, 6 hours, respectively. In the EGSB, the HPR and the HY presented the same trend: HPR increased from 0.018 to 1.708 L.h⁻¹.L⁻¹ and HY increased from 0.19 to 2.87 molH₂.mol⁻¹glycerol with the decrease in the HRT from 14 to 1 hour. For both reactors, the AFBR and the EGSB, the highest HPR and HY occurred at HRT of 1 hour. As well as for the AFBR, the main byproducts quantified in the EGSB were 1,3-propanediol (1,3-PD), ethanol, acetic, butyric and propionic acid. The highest 1,3-PD (1,606 mg.L⁻¹), ethanol (400 mg.L⁻¹), acetic acid (219 mg.L⁻¹), propionic acid (1,075 mg.L⁻¹) and butyric acid (248 mg.L⁻¹) concentration occurred at HRT of 16, 12, 16, 8, 20 hours, respectively.

Key-words: HRT, biodiesel, mesophilic temperature, mixed culture, byproducts.

1 - INTRODUÇÃO

Por muitos anos o homem utilizou as fontes energéticas de maneira indiscriminada e sem nenhuma preocupação com o meio ambiente. Fato este que ocasionou mudanças irreparáveis no planeta, assim como diminuição e em muitos locais a escassez de combustíveis e ou matéria-prima. Entretanto a mentalidade da humanidade esta em constante transformação e mudança, uma vez que surge a necessidade de se utilizar o mínimo de recurso para gerar um máximo de energia. O uso de resíduos e subprodutos vem para agregar valor a produtos finais, assim como maximizar o ganho energético no contexto geral.

Um resíduo que no Brasil atualmente é gerado em grande quantidade e que tem como tendência o aumento, é o glicerol, que é um subproduto da fabricação de biodiesel, e este por sua vez é fabricado a partir de matérias primas renováveis e esta substituindo o diesel, que é proveniente de combustíveis fósseis. No volume total da produção de biodiesel 10% é glicerol (YAZDANI & GONZALEZ., 2007). Em 2005, o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB) foi implantado no Brasil, desde a implantação até o final de 2012, foram produzidos e consumidos aproximadamente 11 bilhões de litros de biodiesel, sendo esperada uma demanda crescente para os próximos anos.

O glicerol é utilizado em diversos campos da indústria química, de medicamentos e material para embalagens, mesmo assim o volume total gerado é bem mais elevado do que a demanda (SILES LÓPEZ *et al.*, 2009). Surge então a necessidade de utilizar o glicerol para produzir produtos finais que o mercado necessita. O H₂ pode ser um desses produtos finais que pode ser produzido por queima de combustíveis, eletrólise e a produção biológica (UENO *et al.*, 1996; MIZUNO *et al.*, 2000). Dentre os métodos de produção de hidrogênio, a produção biológica se destaca, pois além de ser o método mais barato, ela ainda degrada o substrato que por muitas vezes se torna um transtorno na indústria (HALLENBECK e BENEMANN, 2002; WU *et al.*, 2007).

Na produção biológica as principais matérias primas utilizadas são águas residuárias e resíduos, entre eles estão efluente da fabricação de óleo de palma (ZHANG *et al.*, 2008; FANG *et al.*, 2011), efluente de produção de açúcar (GUO *et al.*, 2008a) e soro de leite (FERREIRA ROSA *et al.*, 2014).

Na produção biológica de gases combustíveis e metabólitos diversos fatores afetam esta produção como temperatura, concentração de substrato, pH, tempo de detenção hidráulica (TDH) e um dos principais que é o tipo de reator. Que por sua vez é apresentado na

literatura em diferentes configurações como reator anaeróbio de leito fluidizado (RALF) (WU et al., 2003; ZHANG et al., 2007; WU et al., 2007; SHIDA, 2009), reator de leito granular expandido (EGSB - Expanded Granular Sludge Bed) (GUO et al., 2008a; GUO et al., 2008b), reator anaeróbio de fluxo ascendente com manta de lodo (UASB – Upflow Anaerobic Sludge Blanket) (REUNGSANG et al., 2013) e reator de mistura perfeita (CSTR – Continuous Stirred Tank Reactor) (LO et al., 2013).

Dentre os diversos reatores aplicados em estudos de produção biológica de H_2 , o RALF é mais compacto se comparado a outros reatores e suas características de operação são benéficas para o processo anaeróbio, possui operação em alta taxa orgânica, baixo tempo de detenção hidráulica (TDH) e melhores condições de mistura (ZHANG et al., 2007). Já o reator EGSB mostrou ter alta eficiência na produção de hidrogênio a partir de águas residuárias, com elevada produção de biogás a alta taxa de carga orgânica (GUO et al., 2008a).

E vinculado ao tipo de reator está o glicerol bruto que nos últimos anos também esta sendo utilizado como substrato orgânico para síntese biológica de outros produtos, além de ser utilizado em pesquisas para produção biológica de metano (SILES LÓPEZ *et al.*, 2009) e hidrogênio (ITO *et al.*, 2005). Esta viabilidade pode ser comprovada por estudos reportados da literatura: LO et al. (2013) que trabalharam com CSTR e avaliaram a produção de hidrogênio com glicerol puro e bruto e REUNGSANG et al. (2013) que operaram um reator UASB e analisaram a produção de hidrogênio a partir do glicerol. Estudos realizados com bateladas foram realizados em maior quantidade (SELEMBO et al., 2009; WU et al., 2011; SÁ et al., 2013).

Considerando os tipos de reator e o substrato utilizado, este trabalho visa o estudo da produção biológica de hidrogênio em um RALF e um EGSB a partir do resíduo do biodiesel (glicerol). No RALF a temperatura foi controlada em $30^{\circ}C$, o pH mantido entre 4 e 5 e a concentração do substrato na alimentação foi de 5 g.L^{-1} , o TDH variou em 14, 12, 10, 8, 6, 4, 2 e 1 hora. No EGSB a temperatura se manteve em $30^{\circ}C$ através de um banho termostático, pH foi mantido entre 4 e 5 e concentração de glicerol fixada em 5 g.L^{-1} , o TDH teve variação em 24, 20, 16, 12, 8, 4, 2 e 1 hora.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a produção de hidrogênio e metabólitos a partir do glicerol bruto como substrato em RALF e EGSB, sob condições mesofílicas utilizando cultura mista como inóculo.

2.2. Objetivos Específicos

- Detectar os metabólitos produzidos qualitativamente e quantitativamente em cada fase de operação dos reatores RALF e EGSB.
- Avaliar como a variação do TDH influencia na produção de hidrogênio e de metabólitos nos reatores RALF e EGSB.
- Constatar se o tratamento térmico dos grânulos do EGSB foi eficiente para eliminar as metanogênicas.

3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 – Biodiesel

A intensificação do efeito estufa está associada a elevadas emissões de dióxido de carbono na atmosfera por meio da queima de combustíveis fósseis, uma das alternativas para minimizar este problema seria a utilização de biocombustíveis. Por serem de origem vegetal, o CO₂ lançado na atmosfera devido à queima dos mesmos já o seria por meio do processo respiratório e de decomposição após morte do tecido vegetal. Além disso os biocombustíveis tem a vantagem de não possuírem enxofre em sua composição, sendo assim, a queima destes não provoca emissão de óxidos de enxofre (SO₂ e SO₃), que são poluentes danosos à qualidade do ar e responsáveis pela chuva ácida (MOTA et al., 2009).

A produção de biodiesel é realizada a partir de óleos vegetais e gordura animal que é compatível com o diesel de petróleo em praticamente todas as suas propriedades. O biodiesel ainda apresenta algumas vantagens adicionais em comparação com o combustível fóssil, entre elas, pode-se citar: produto derivado de matérias-primas renováveis, reduzindo assim a dependência atual por combustíveis fósseis, é biodegradável e possui alto ponto de fulgor o que proporciona manuseio e armazenamento mais seguros (KNOTHE et al., 2006). O Brasil é um dos pioneiros no uso deste tipo de combustível já utilizando o álcool etílico, oriundo da fermentação da cana-de-açúcar, desde a década de 1970. A Figura 3.1 mostra a evolução dos biocombustíveis no Brasil (MOTA et al., 2009).

Dentre as matérias-primas usadas na fabricação do biodiesel no Brasil, os óleos vegetais ocupam o maior volume de produção de biodiesel. Dos óleos vegetais empregados na produção, o de soja é responsável por mais da metade de biodiesel produzido. O país consumiu no ano de 2012, 2,72 milhões de litros de biodiesel. A produção é crescente a cada ano e considerando que o teor de biodiesel no diesel se manteve em 5% desde 2010 conforme regra estabelecida pela resolução nº6/2009 do Conselho Nacional de Política Energética (CNPE), o aumento da produção se deve principalmente pelo aumento da demanda do mercado consumidor.

O Brasil em 2012 se tornou o terceiro maior produtor mundial de biodiesel, atrás apenas dos Estados Unidos com produção de 3,7 bilhões de litros e da Argentina com 2,8 bilhões de litros que foi o mesmo valor de 2011, o que torna o Brasil, caso a Argentina não tenha crescimento também em 2013, um grande candidato a ser o 2º maior produtor de

biodiesel no mundo. Na Figura 3.2 nota-se a evolução do crescimento de biodiesel anualmente.

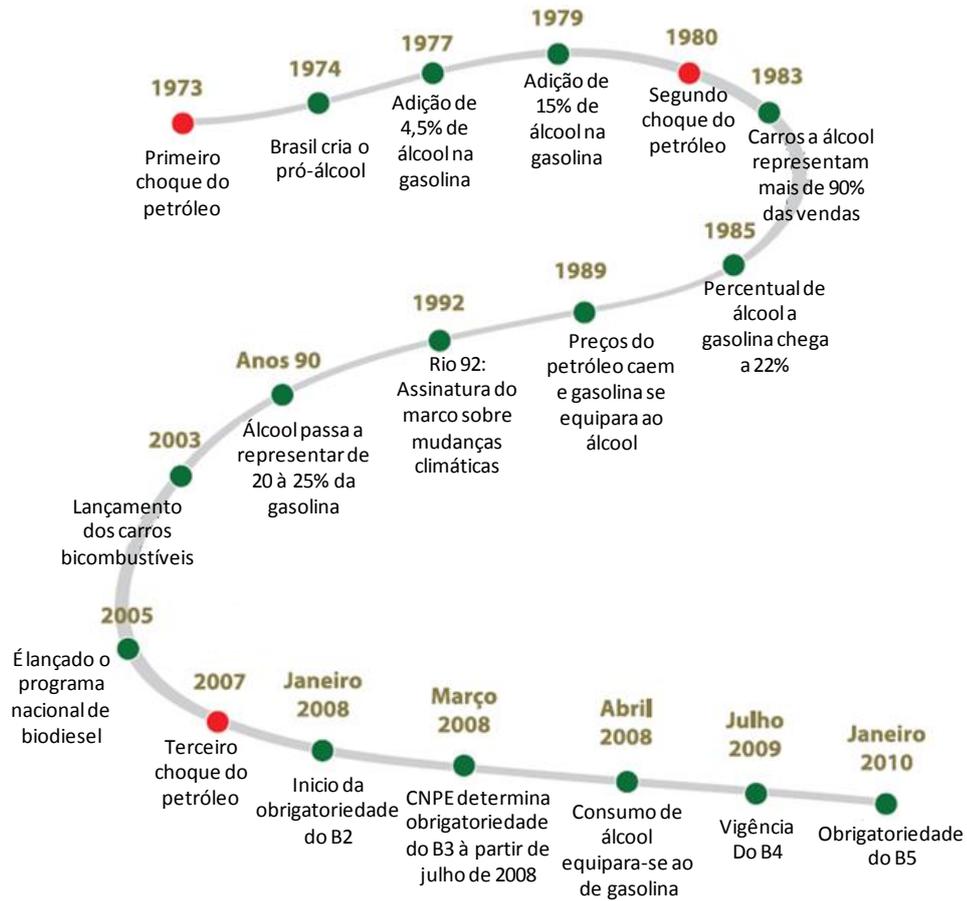


Figura 3. 1 – Evolução dos biocombustíveis no Brasil (ANP, 2013a).

O aumento na produção de biodiesel em 2013 em relação à 2011 e 2012 foi de 10,1 e 8,3%, respectivamente. Isso mostra claramente a tendência de crescimento e de consumo do biodiesel no Brasil. Com a futura implantação do plano de acréscimo de biodiesel no diesel, a demanda e, por conseguinte a produção de biodiesel crescerá vertiginosamente, uma vez que além do aumento ocasionado pelas futuras resoluções, terá também o aumento provocado pelo crescimento econômico do país. Na Figura 3.3 observa-se uma projeção da produção de biodiesel e também do subproduto glicerina. Cerca de 45% da energia e 19% dos combustíveis consumidos no Brasil são renováveis (ANP 2013a).

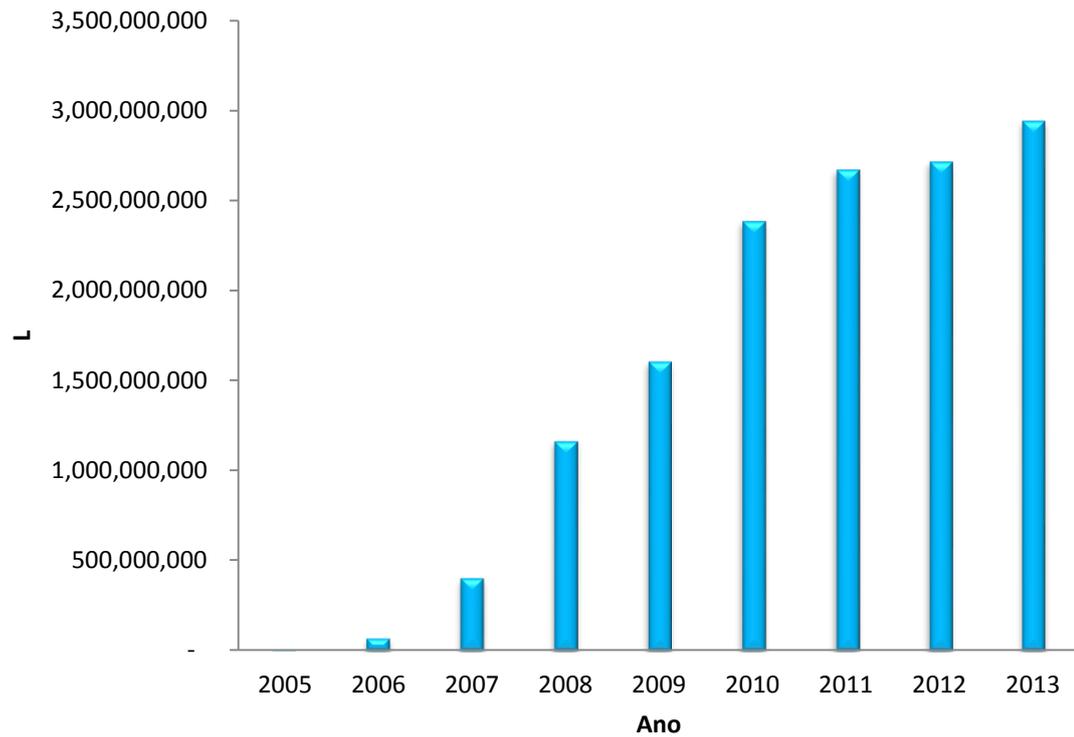


Figura 3. 2 – Produção de biodiesel (L) no Brasil de 2005 a julho de 2013 (Adaptado ANP, 2013b).

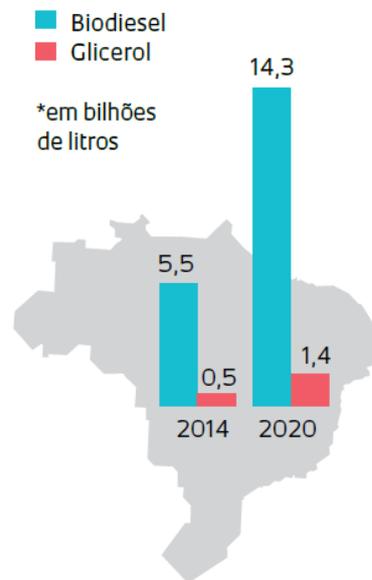


Figura 3. 3– Projeção da produção de biodiesel (REVISTA FAPESP, 2012).

Muitas são as matérias primas utilizadas para a produção de biodiesel, contudo óleos vegetais representam o maior volume de produção. Dentre estes óleos, a soja é responsável por mais da metade da produção. A Figura 3.4 representa bem todas essas porcentagens, das

regiões brasileiras o Centro-Oeste produz a maior quantidade de biodiesel, isso se deve ao fato de que a maior quantidade das oleaginosas é plantada nesta região.

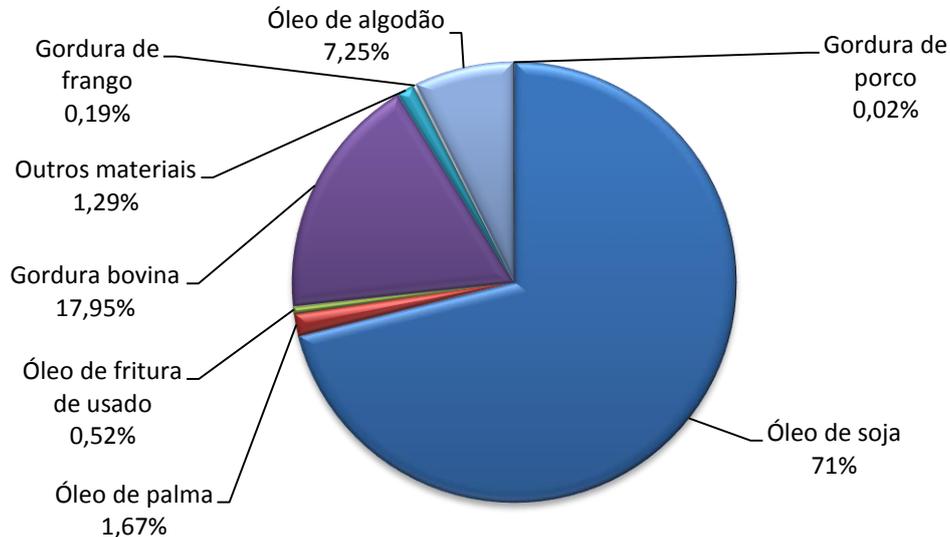


Figura 3. 4– Porcentagens de óleos vegetais e gorduras animais usados como matéria prima na produção de biodiesel (REVISTA FAPESP, 2012).

3.2 Glicerol

O termo glicerol é utilizado para denominar o componente químico puro 1,2,3-propanotriol que é o resíduo da produção de biodiesel. Já glicerina aplica-se aos produtos comerciais purificados, normalmente, contendo pelo menos 95% de glicerol (KNOTHE et al., 2006). Glicerol é formado como subproduto à partir da reação de transesterificação. Nesta reação o volume de glicerol corresponde a 10% do volume total de produtos (TEMUDO et al., 2008). Na Figura 3.5 são observados os reagentes e os produtos da reação de transesterificação, que produz o biodiesel e o subproduto glicerol.

A glicerina oriunda do glicerol, depois de purificado, é utilizada em diferentes processos como a fabricação de cosméticos, remédios, assim como fabricação de alimentos e de tabaco (KNOTHE et al., 2006). A Figura 3.6 representa a aplicação da glicerina.

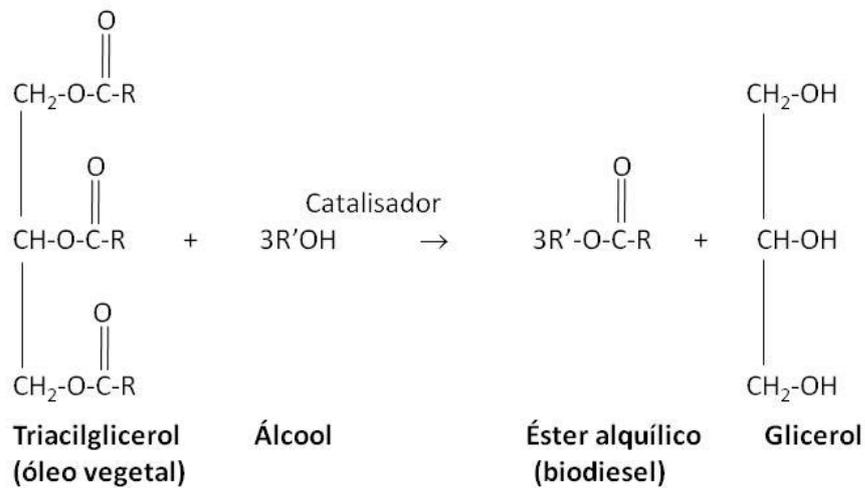


Figura 3. 5 – Reação de transesterificação (KNOTHE et al., 2006).

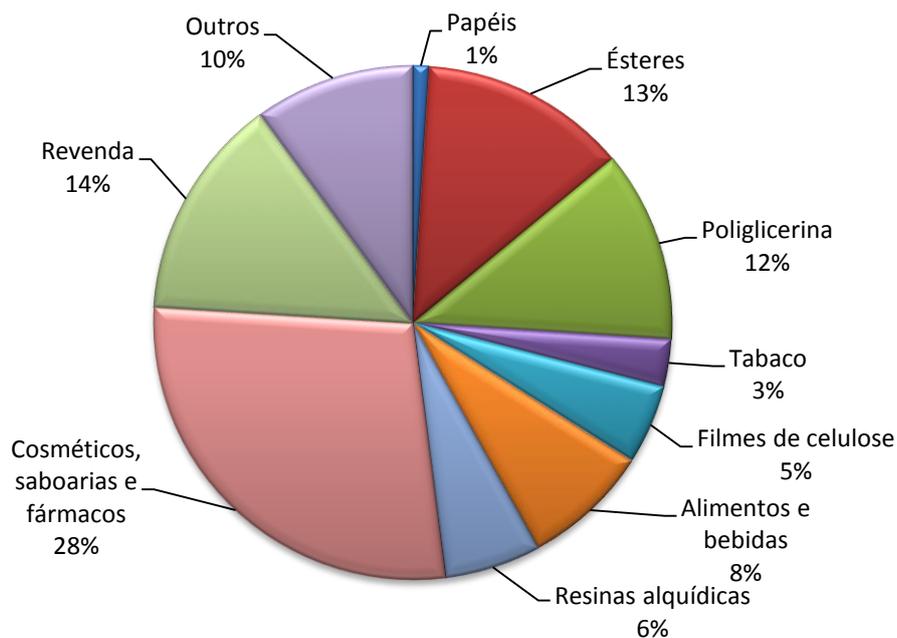


Figura 3. 6– Principais setores industriais de aplicação da glicerina (MOTA et al., 2009)

Mesmo com diversas aplicações do composto purificado, o glicerol necessita de outra destinação devido ao grande volume produzido. No ano de 2011, a produção de glicerol foi de 260 mil toneladas, volume quase oito vezes superior à demanda, estimada em cerca de 40 mil toneladas. Uma alternativa, já que o mercado não consome todo o glicerol produzido, é a produção de energia, por meio do aproveitamento do hidrogênio via digestão (REVISTA FAPESP, 2012).

3.3 – Hidrogênio

O gás hidrogênio é formado por dois átomos de hidrogênio, tendo alto potencial energético, com uma produção de 122kJ/g, que é 2,75 vezes maior que a de combustíveis de hidrocarbonetos (KAPDAN e KARGI, 2006). Ele é utilizado em aplicações industriais para a síntese da amônia, álcool e aldeídos.

Em 2030 é provável que grandes quantidades de veículos já utilizem o hidrogênio como combustível, porém para que isso ocorra é necessário que se avancem as tecnologias para o armazenamento e produção do H₂ (INTERNATIONAL ENERGY AGENCY, 2006).

Hidrogênio pode ser produzido a partir de combustíveis fósseis, com a reforma a vapor da água e através da produção biológica. Com os combustíveis fósseis a produção é feita por oxidação parcial de hidrocarbonetos pesados, reforma catalítica de gás natural, craqueamento térmico de gás natural, gaseificação do carvão e reforma catalítica do gás natural. Através do gás natural o hidrogênio obtido é barato e a produção eficiente, no entanto na produção de H₂ ocorre a emissão de gás carbônico que acentua o efeito estufa. Quando provém da água, o hidrogênio é obtido com a eletrólise deste composto, neste processo ocorre a passagem de uma corrente elétrica que separa o átomo de hidrogênio do átomo de oxigênio. O grande problema desse processo é que ele se torna financeiramente inviável, uma vez que a energia gasta nele é menor que a que o hidrogênio produzido pode fornecer posteriormente ao ser utilizado (DAS e VERZIROGLU, 2001).

A produção biológica de hidrogênio pode ser feita através da fotodecomposição e da fermentação biológica. Na fotodecomposição, o substrato é degradado por microrganismo com habilidade de usar amplo espectro de luz, apresentando alta conversão de H₂. Na fermentação biológica, o hidrogênio é obtido por microrganismos que liberam H₂ pela ação de hidrogenases durante a degradação de carboidratos. Estes microrganismos podem produzir constantemente o hidrogênio na ausência da luz em uma alta taxa e com crescimento celular relativamente rápido, o que torna o processo viável economicamente (DAS e VERZIROGLU, 2001).

Nos processos fermentativos as principais matérias primas utilizadas são águas residuárias tais como esgotos domésticos e efluentes industriais como papel e celulose e laticínios. Além disso, o processo fermentativo é considerado mais viável, uma vez que o rendimento de hidrogênio é alto e pode ser acoplado a uma estação de tratamento de águas residuárias. Em suma, pode-se tratar águas residuais, enquanto se gera energia mais limpa (WU et al., 2007).

A produção biológica de hidrogênio pode ocorrer em diferentes temperaturas, mesofílicas de 25 à 40°C, termofílicas de 40 à 65°C e hipertermofílicas de 65 à 85°C (LEVIN et al., 2004). Nesta produção os microrganismos, em seus diferentes tipos, tem a capacidade de captar substratos presentes no meio, com isso não existe necessidade de purificação, além de que uma gama maior de resíduos que pode ser utilizada. Outra vantagem no processo fermentativo é que a pressão pode ser atmosférica e a temperatura ambiente (DRAPCHO et al., 2008; DAS e VEZIROGLU, 2001).

3.4 – Reatores

Inúmeras são as configurações de reatores que podem ser empregados na produção biológica de hidrogênio. Algumas características individuais e condições fluidodinâmicas de cada equipamento interferem na transferência de massa e calor, que podem afetar o desenvolvimento e a seleção dos microrganismos.

Os reatores anaeróbios de alta taxa podem ser divididos basicamente em reatores de crescimento microbiano disperso ou suspenso, que contemplam reatores UASB, EGSB e CSTR, nestes reatores não é necessário meio suporte para que a biomassa cresça aderida, pois os microrganismos se desenvolvem dispersos no meio líquido na forma de flocos ou grânulos. Também existem os reatores onde os microrganismos crescem aderidos em um meio suporte, classificados como reatores de crescimento aderido, estes englobam reatores RALF e leito fixo. Estes reatores de alta taxa tem como a principal característica a capacidade de reter em seu interior uma grande quantidade de biomassa com elevada atividade, mesmo se forem aplicados tempos de detenção hidráulica baixos.

Diferentes configurações de reatores já foram empregados para a produção de hidrogênio entre eles RALF (MUÑOZ-PÁEZ et al., 2012; BARROS e SILVA, 2012; ZHANG et al., 2007 e WU et al., 2003), leito fixo (CHANG et al., 2002), reator UASB (JUNG et al., 2011; REUNGSANG et al., 2013), EGSB (LIU et al., 2011; GUO et al., 2008a e GUO et al., 2008b), CSTR (LO et al., 2013) e ensaios em batelada (SARMA et al., 2013; SÁ et al., 2013).

Além da estrutura física específica de cada reator, a produção de hidrogênio também é afetada pelo tipo de substrato empregado, pH no meio reacional e temperatura. A Tabela 3.1 sintetiza estes parâmetros e os resultados de rendimento, produtividade volumétrica e conteúdo de hidrogênio no biogás. A temperatura empregada nos estudos possui uma faixa estreita de variabilidade, assim como o pH que é sempre ácido.

Tabela 3. 1 – Parâmetros utilizados em reatores contínuos.

Tipo de Reator	Temperatura (°C)	pH	Substrato	Concentração	Biogás (% H ₂)	Rendimento (molH ₂ .mol ⁻¹ Substrato)	Produtividade L.h ⁻¹ .L ⁻¹	Referência
RALF	37	4	Glicose	10 *	61-57	1,19	2,4	ZHANG et al., (2007)
RALF	30	4	Glicose	2 *	8-35	2,49	0,97	AMORIM et al., (2009)
RALF	30	3,8	Glicose	2 *	37	2,29	1,28	SHIDA et al., (2009)
RALF	30	5,5	Glicose	4 *	22-51	2,52	1,21	BARROS et al., (2010)
RALF	-	4-5	Glicose	5 *	61	2,55	2,21	REIS e SILVA (2011)
Leito Fixo	37	****	Glicerol Bruto	10 *	-	-	1,54	ITO et al., (2005)
UASB	37	5,5	Glicerol Bruto	50 ***	24,2	0,32	0,15	REUNGSANG et al., (2013)
UASB	35	-	Hexose	20 **	-	1,78	2,26	JUNG et al., (2011)
EGSB	35	4,3	Sacarose	2-10 **	30-53	3,47	0,71	GUO et al., (2008a)
EGSB	30	4	Amido	2-16	35-65	-	1,64	GUO et al., (2008b)
CSTR	35	****	Glicerol Bruto	-	72	0,77	0,166	LO et al., (2013)

* g.L⁻¹** gDQO.L⁻¹*** g.L⁻¹.d⁻¹

**** Não Controlado

3.4.1 – Reator Anaeróbio de Leito Fluidizado - RALF

O reator de leito fluidizado que pertence aos reatores de crescimento microbiano aderido, foi desenvolvido inicialmente para o tratamento de águas residuárias por Jewell e colaboradores nos anos 70, visando eliminar problemas de acúmulo de materiais sólidos nos interstícios, como ocorre em reatores de leito fixo (CAMPOS e PEREIRA, 1999).

Neste reator o líquido no interior passa por um leito de partículas em uma velocidade suficiente para prover a fluidificação do leito (NICOLLELA et al., 2000). Quando o fluido atinge este estado, as partículas ficam então suspensas devido o fluxo ascendente de gás ou líquido. Por fim as forças de fricção entre as partículas e o fluido contrabalançam o peso das partículas e a queda de pressão fica igual ao peso do fluido e das partículas da seção, então neste momento é que o leito está fluidificado, e consequentemente aumentando a velocidade do fluxo ascendente ocorre a expansão do leito (KUNII e LEVENSPIEL, 1991).

Algumas das vantagens do reator de leito fluidizado é que este reator é de fácil controle e automação, como também possui bom controle da temperatura, por não haver pontos de empacotamento do leito (GRADY JR. et al., 1999). O filme microbiano é formado pela adesão natural dos microrganismos nas partículas utilizadas como meio suporte (HIDALGO e GARCÍA-ENCINA, 2002). Possui alta taxa de recirculação, favorecendo para que o pH se mantenha ácido, devido a condições de mistura do reator, preservando então a atividade acidogênica (AMORIM et al., 2009).

Algumas outras características do RALF é que promove o máximo contato entre o líquido e o meio suporte, pode ser operado com uma grande faixa de concentração orgânica, menor requisito de área, pequena quantidade de meio pode ser usada e ainda assim resultará em superfícies altamente específicas para o desenvolvimento da biomassa (HICHEY e OWENS, 1981). A biomassa ao se aderir no meio suporte, modifica o mesmo em relação ao tamanho, densidade e forma da partícula que leva à mudança do leito em relação a altura no início da operação. A medida que a biomassa cresce e se fixa no meio suporte, a altura do leito tende a diminuir, uma vez que aumenta a densidade da partícula (GRADY JR et al., 1999).

Neste reator a turbulência criada pelo fluxo ascendente, promove uma área maior ainda para leitos expandidos, porém com o aumento da velocidade ascendente do fluido, a turbulência gerada pode levar ao carregamento do biofilme, como não há o

controle sobre o crescimento da biomassa, é possível que aconteça o desprendimento deste material ocasionado pelo atrito entre as partículas (GRADY JR et al., 1999; NICODELLA et al., 2000).

Não foram encontrados reportados em literatura reatores anaeróbios de leito fluidizado que utilizassem glicerol puro ou bruto como substrato para a produção de hidrogênio. Entretanto diversos outros substratos são utilizados com o mesmo fim e demonstram que este tipo de reator tem boa produção e rendimento de hidrogênio.

ZHANG et al. (2007) estudaram RALF, tendo como meio suporte carvão ativado e como substrato a glicose. O reator foi operado num TDH de 4 a 0,5 horas e concentração fixa de substrato de 10g.L⁻¹, em outro momento operaram o reator sob concentração do substrato de 10 à 30g.L⁻¹ com um TDH fixo de 1 hora. O pH foi de 4 e a temperatura controlada em 37°C. A taxa de produção de hidrogênio aumentou de 2,4 e 4 L.h⁻¹.L⁻¹ com a diminuição do TDH. Em relação à variação da concentração a produção volumétrica de hidrogênio foi de aproximadamente 1,5L.h⁻¹.L⁻¹ para a concentração de 10g.L⁻¹ e para concentrações de 20 e 30g.L⁻¹ a produção volumétrica foi praticamente a mesma, com valores de aproximadamente 2,4L.h⁻¹.L⁻¹. A quantidade de hidrogênio no biogás variou de 61 à 57% com a diminuição do TDH, quando foi analisado a influencia da concentração observou-se a estabilidade na composição do biogás com valores de 59 %. Com relação ao rendimento, com a variação do TDH o máximo rendimento foi notado no TDH de 0,5 e 2 horas tendo o valor de 1,16 molH₂.mol⁻¹Glicose. Na variação da concentração o rendimento diminuiu com o aumento da concentração de substrato variando de 1,19 molH₂.mol⁻¹Glicose para a concentração de 10 g.L⁻¹ e 1,10 molH₂.mol⁻¹Glicose para a concentração de 30 g.L⁻¹. Com relação aos metabólitos em ambos os casos foram detectados ácido acético em maior quantidade em torno de 45% dos metabólitos, o ácido butírico entre 20 e 30% e etanol entre 14 e 21%, ácido propiônico foi também detectado, porém em pouca quantidade.

WU et al. (2007) utilizaram o RALF para a produção de hidrogênio a partir da sacarose, glicose e frutose com concentração de 20 gDQO.L⁻¹ de substrato, temperatura controlada em 35°C, TDH de 4 horas e pH 6. O rendimento obtido para sacarose, glicose e frutose foi de 0,64; 1,04 e 0,23 molH₂.mol⁻¹Substrato, respectivamente. O conteúdo de hidrogênio foi de 38, 31 e 21% para a sacarose, glicose e frutose, respectivamente. Em relação à produtividade volumétrica, calculada com base nos dados do autor, os valores obtidos foram 1,09; 0,90 e 0,19 L.h⁻¹.L⁻¹ para sacarose,

glicose e frutose, respectivamente. Os metabólitos encontrados foram ácido acético (21, 21 e 28%), butírico (28, 25 e 24%) e propiônico (4, 4 e 5%) e etanol (47, 50 e 43%) para a sacarose, glicose e frutose, respectivamente, sendo a maior produção de etanol.

AMORIM et al. (2009) estudaram RALF para produção de H_2 à partir de glicose (2 g.L^{-1}), temperatura de 30°C , TDH variando de 8 à 1 hora e pH 4. A porcentagem de biogás aumentou de 8 para 35% a medida que o TDH diminuiu, o rendimento também aumentou à medida que se diminuiu o TDH de 8 para 2 horas, esse aumento foi de 1,41 para $2,49 \text{ molH}_2.\text{mol}^{-1}\text{Glicose}$, porém no TDH de 1 hora o rendimento diminuiu para $2,41 \text{ molH}_2.\text{mol}^{-1}\text{Glicose}$. Com relação à produção volumétrica teve um aumento de 0,08 para $0,97 \text{ L.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$ com a diminuição do TDH de 8 para 1 hora. Os metabólitos produzidos em maior quantidade foram ácido butírico (37,7 à 44,9 %), ácido acético (36,1 à 53,3 %) e etanol (7 à 19%).

SHIDA et al. (2009) avaliaram a produção de hidrogênio e metabólitos em RALF com 2 g.L^{-1} de glicose, temperatura de 30°C , utilizando argila expandida como meio suporte, cultura mista como inóculo, pH 3,8 e TDH variando de 8 à 1 hora. Com a diminuição do TDH houve um aumento na produção volumétrica de hidrogênio, que atingiu a maior produtividade de $1,28 \text{ L.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$ no TDH de 1 hora. O máximo conteúdo de H_2 foi 37 % no TDH de 2 horas assim como o rendimento de $2,29 \text{ molH}_2.\text{mol}^{-1}\text{Glicose}$. Os maiores metabólitos produzidos foram ácido acético (46 à 53 %), ácido butírico (34 à 42 %) e etanol com menos de 15 %.

BARROS et al. (2010) utilizaram dois reatores RALF variando o meio suporte (suporte de poliestireno e argila expandida), para tanto os autores avaliaram a influência do meio suporte na produção de hidrogênio. Os reatores foram operados a 30°C , pH de aproximadamente de 5.5, concentração do substrato de 4 g.L^{-1} de glicose e TDH de 8 à 1 hora. O reator com poliestireno apresentou um aumento na porcentagem de hidrogênio no biogás de 16 para 47% para o TDH de 8 à 1 hora, respectivamente. No reator com argila expandida também verificou-se o aumento de 22 para 51% com a diminuição do TDH de 8 para 1 hora. Com relação ao rendimento de hidrogênio, no primeiro reator observou-se um aumento de 0,90 para $1,90 \text{ molH}_2.\text{mol}^{-1}\text{Glicose}$ a medida que o TDH decresceu de 8 para 2 horas, porém para o TDH de 1 hora o rendimento foi de $1,4 \text{ molH}_2.\text{mol}^{-1}\text{Glicose}$. O mesmo comportamento foi observado no segundo reator que teve valores de 1,51 para $2,52 \text{ molH}_2.\text{mol}^{-1}\text{Glicose}$ nos TDH de 8 para 2 horas e de $1,84 \text{ molH}_2.\text{mol}^{-1}\text{Glicose}$ para o TDH de 1 hora. Os valores de produção volumétrica aumentaram à medida que o TDH diminuiu. Esses valores foram máximos no TDH de 1

hora para ambos os reatores, o reator com poliestireno obteve o valor de $0,95 \text{ L.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$ enquanto que o reator com argila expandida obteve $1,21 \text{ L.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$. Com relação aos metabólitos o reator com poliestireno produziu ácido acético (27 à 49%), ácido butírico (30 à 38%), etanol (9 à 38%) e ácido propiônico (2 à 5%). No reator com argila expandida foram identificados os metabólitos ácido acético (32 à 46%), ácido butírico (37 à 41%), etanol (10 à 22%) e ácido propiônico (1 à 4%).

REIS e SILVA (2011) utilizaram dois reatores RALF utilizando glicose com 5g.L^{-1} de concentração, pH entre 4 e 5, cultura mista e argila expandida como meio suporte. O estudo teve como objetivo avaliar a influência da velocidade de fluidificação e do TDH na produção de hidrogênio. A velocidade de fluidificação foi diferente nos dois reatores, em um deles a velocidade foi $1,24$ e no outro $1,88 \text{ cm.s}^{-1}$, fazendo com que a altura do meio suporte atingisse 129 e 144 cm, respectivamente, ambos os reatores operaram com o TDH inicial de 8 horas, decrescendo até atingir 1 hora. Com relação ao biogás, a maior porcentagem de hidrogênio foi de 67,57 e 61,82% para os reatores com maior e menor velocidade de fluidificação, respectivamente no TDH de 8 horas. Os melhores resultados foram obtidos com o reator de menor velocidade de fluidificação, a produção volumétrica máxima foi de $2,21 \text{ L.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$ no TDH de 1 hora e o máximo rendimento foi de $2,55 \text{ molH}_2.\text{mol}^{-1}\text{Glicose}$ para o TDH de 2 horas. O estudo avaliou também como o TDH influencia na produção de metabólitos, os principais foram etanol e ácido acético, que juntos representam 80% dos metabólitos formados, em quantidades pequenas foram reportados ácido propiônico e butírico e metanol. Para o reator com menor velocidade de fluidificação ocorreu sempre a predominância de etanol dentre os metabólitos, a máxima porcentagem foi para os TDH de 2 e 1 hora com o valor de 68,7% dos metabólitos solúveis. O ácido acético foi maior no TDH de 4 horas com 24,7% dos metabólitos produzidos.

FERREIRA ROSA et al. (2013) operaram dois reatores RALF com diferentes inóculos (lodo oriundo de tratamento de águas residuárias de suíno e aves), em ambos os reatores o TDH foi mantido em 6 horas. Foi utilizada uma mistura de glicose e soro de leite como substrato, realizando o aumento gradativo do soro na concentração do afluente. A relação de glicose e soro seguiu a seguinte ordem: fase 1 com 67% glicose e 33% soro, fase 2 com 33% glicose e 67% soro e fase 3 com 100% de soro. Foi possível observar no reator com lodo suíno que a variação de H_2 no biogás não foi alterada à medida que ocorreu o aumento da concentração do soro, obtendo-se valores de 18,42, 17,65 e 18,55% de hidrogênio para as três fases de operação, respectivamente.

Entretanto no reator com lodo de aves ocorreu um pequeno aumento de 13,54 para 17,65 e 18,55% em relação às fases 1, 2 e 3, respectivamente.

3.4.2 – Reator de Leito Granular Expandido – EGSB

O reator EGSB foi desenvolvido para solucionar um problema no reator UASB, Este acumulava sólidos que entravam pelo afluente o qual podiam se acumular dentro do reator, influenciando na qualidade do efluente (NICOLELLA et al, 2000). O reator EGSB é similar ao UASB, a grande diferença é a recirculação do meio, que promove um melhor contato entre os grânulos e a água residuária, além de que devido a fluidificação os grânulos são gastos e este lodo suspenso é expulso do reator (LETTINGA et al, 1993; LETTINGA et al., 1997).

Neste reator o lodo que é sempre granular é mantido expandido devido à elevadas taxas de recirculação hidráulica aplicadas ao sistema, isso intensifica a mistura no reator promovendo melhor contato entre a biomassa e o substrato a ser degradado. As elevadas velocidades superficiais do líquido reinserido no reator é da ordem de 5 à 10 m.h^{-1} , em contrapartida reatores UASB permanecem praticamente estáticos, já que as velocidades superficiais do líquido são geralmente inferiores a ordem de 0,5 à 1,5 m.h^{-1} (KATO, 1994; CHERNICHARO, 1997; SEGUEZZO et al., 1998). A Figura 3.7 detalha o grânulo de um reator UASB.

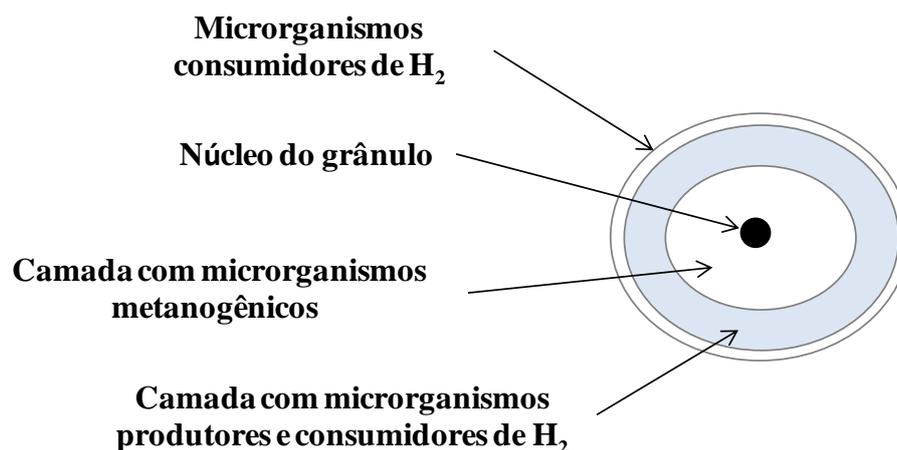


Figura 3. 7– Estrutura de um grânulo de um reator UASB (ABBASI e ABBASI, 2012).

Reator EGSB tem como característica também a alta eficiência de operação mesmo com elevada carga orgânica, pois lodo é muito ativo e de boa sedimentação,

entretanto não remove sólidos suspensos e material coloidal (DISDALE et al., 2000; SEGUEZZO et al., 1998).

Reatores EGSB destinam-se principalmente a tratamento de efluentes solúveis. Além disso, a presença excessiva de sólidos suspensos no afluente pode ser prejudicial à manutenção das boas características do lodo granular no reator. Devido à elevadas velocidades superficiais aplicadas, reatores EGSB podem ser da ordem de 20 metros de altura, significando uma elevada economia de área.

Se comparados a reatores UASB, maiores taxas de carga orgânica podem ser aplicadas a reatores EGSB, conseqüentemente a produção de biogás também será superior (SEGUEZZO et al., 1998). Entretanto há poucos trabalhos reportados em literatura com relação a produção de H₂ em reatores EGSB.

GUO et al. (2008a) estudaram a produção de hidrogênio à partir da fermentação do melaço oriundo da produção de etanol em um reator EGSB, como material suporte foi utilizado carvão ativado, a temperatura do sistema foi controlada em 35°C. Os autores variaram o TDH de 6 à 1 hora e a DQO de entrada de 2 à 10g.L⁻¹. A taxa máxima de produção de hidrogênio foi de 0,71L.h⁻¹.L⁻¹ e rendimento de 3,47 molH₂.mol⁻¹Sacarose. Com o aumento da concentração de substrato, os autores observaram que tanto a produção volumétrica quanto o rendimento reduziram para aproximadamente 0,18L.h⁻¹.L⁻¹ e 0,1 molH₂.mol⁻¹Sacarose. A composição de hidrogênio no biogás foi de 30 a 53%, não sendo constatado metano durante todo o processo e o pH se manteve entre 4,2 e 4,4. A produção de etanol foi de 0,062 à 0,128 g.L⁻¹, enquanto que a de acetato, ácido propiônico e butirato foram de 0,106 à 0,302, 0,089 à 0,280 e 0,116 à 0,273 g.L⁻¹, respectivamente.

GUO et al. (2008b) estudaram um reator EGSB para tratamento de água residuária de amido e produção simultânea de hidrogênio com temperatura controlada em 30°C e pH entre 4,92 e 3,68. O TDH aplicado variou entre 24 e 4 horas e a concentração de 4 à 18 gDQO.L⁻¹ ou 2 à 16 g.L⁻¹ de amido. A produção de hidrogênio no biogás ficou entre 35 e 65% e não foi detectado metano. O estudo constatou que a produção de hidrogênio é fortemente influenciada pela concentração de substrato em diferentes TDH, para a concentração de 0,125 gAmido.L⁻¹.d⁻¹ a produção volumétrica de hidrogênio diminuiu com o aumento do TDH assim como para a concentração de 1gAmido.L⁻¹.d⁻¹. Já para a concentração de 0,25gAmido.L⁻¹.d⁻¹ a produção aumentou com o aumento do TDH. Entretanto, para um mesmo valor de TDH, a produção de hidrogênio aumentou com o aumento da concentração de substrato. A máxima produção

volumétrica de hidrogênio foi de $1,64\text{L.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$ no TDH de 4 horas e $1\text{gAmido}.\text{L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e o rendimento máximo foi de $0,11\text{L.gDQO}^{-1}$ para o TDH de 8 horas e $0,5\text{gAmido}.\text{L}^{-1}.\text{d}^{-1}$. Com isso os autores concluíram que a concentração tem um efeito positivo na produção de hidrogênio e que o TDH tem um efeito negativo. O estudo identificou a produção de etanol, acetato, ácido propiônico e ácido butírico, a taxa de acidificação foi maior para a concentração de $0,5\text{gAmido}.\text{L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ com o TDH de 8 horas com a maior produção de etanol $18,43\text{mmol}.\text{L}^{-1}$.

3.5 – Produção de Hidrogênio e Metabólitos a partir do Glicerol: Ênfase em Bioreatores

Poucos estudos de produção de H_2 são reportados em reatores contínuos utilizando glicerol como substrato. Apesar de ocorrer algumas mudanças quando se opera reator de maneira contínua, ensaios em batelada são ótimos testes para observar e avaliar a produção de hidrogênio e dos metabólitos produzidos, assim como o comportamento dos microrganismos envolvidos no estudo. A maioria dos trabalhos que utiliza glicerol como substrato, relata a ocorrência da produção de hidrogênio simultaneamente com a produção dos álcoois 1,3-propanodiol, etanol e dos ácidos acético, butírico e propiônico. Isto se deve à existência de diferentes rotas metabólicas que ocorrem paralelamente com a produção de H_2 . O que interfere ou favorece algumas dessas rotas são principalmente o tipo de cultura empregada, o substrato, a concentração do substrato e temperatura de operação no estudo.

O glicerol quando utilizado como substrato pode ser degradado por duas vias metabólicas, a oxidativa e a redutiva. Na primeira o glicerol é inicialmente convertido em piruvato que pode originar ácido acético, ácido lático, ácido propiônico, ácido butírico, 2,3-butanodiol, butanol, etanol, H_2 e CO_2 . Na segunda, o glicerol degradado produz apenas 1,3-propanodiol (TEMUDO et al., 2008; REUNGSANG et al., 2013). A rota fermentativa simplificada do glicerol pode ser observada na Figura 3.8.

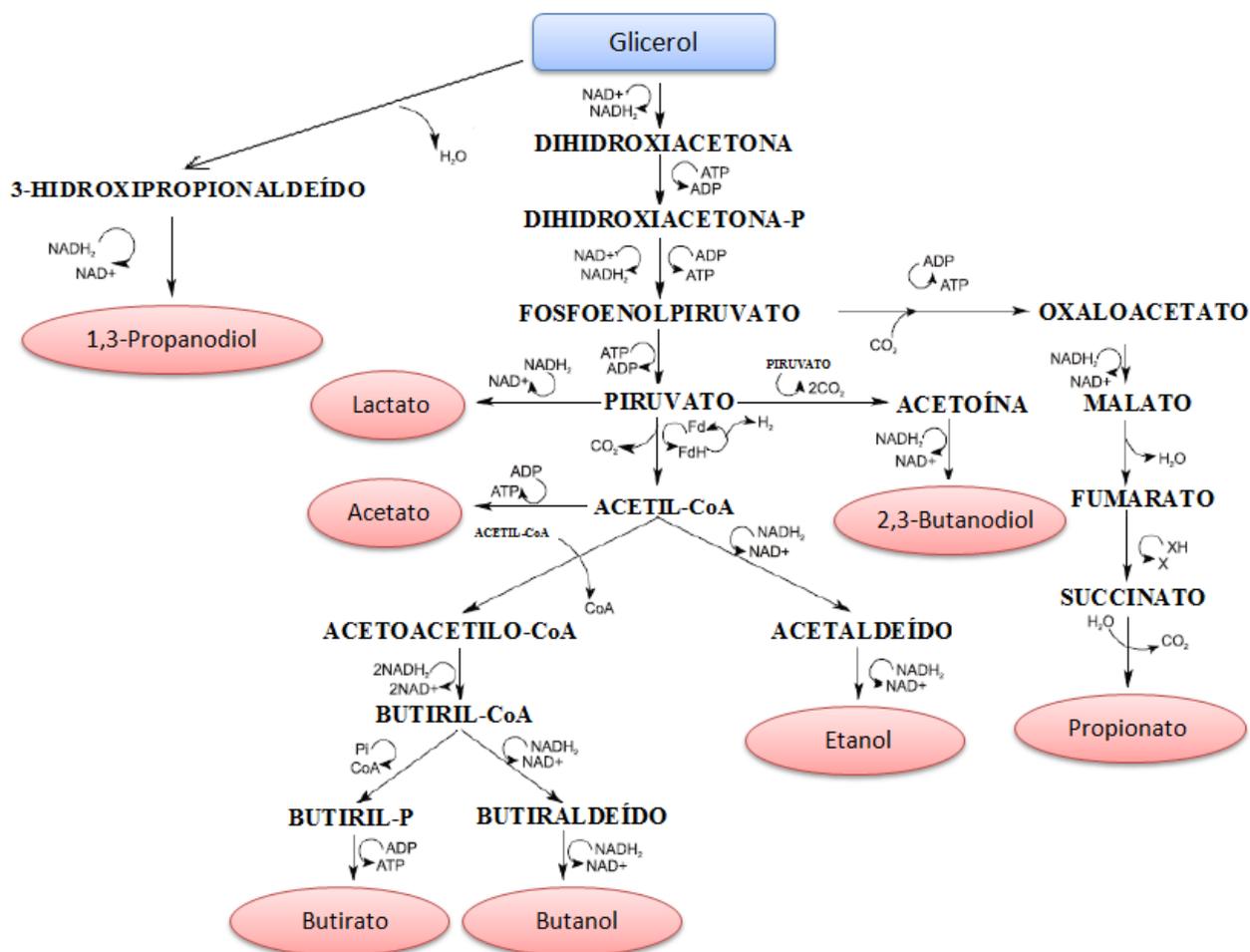
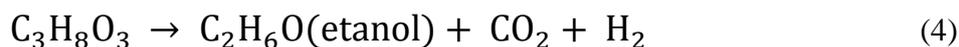
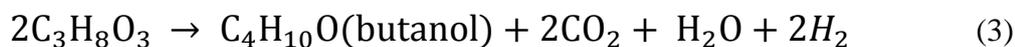


Figura 3. 8 – Rota fermentativa a partir do glicerol (SARMA et al., 2012; MARU et al., 2013).

A produção de H_2 a partir do glicerol pode ocorrer quando este substrato é convertido em ácido acético, ácido butírico, butanol e etanol, representado respectivamente pelas equações 1, 2, 3 e 4 (SARMA et al., 2012; MARU et al., 2013).



A maior produção de hidrogênio ocorre quando o glicerol é convertido em ácido acético, pois nesta conversão ocorre a produção de 3 mols de hidrogênio a partir de 1 mol de glicerol, enquanto que a conversão de 2 mols de glicerol em ácido butírico e butanol produzem 4 e 2 mols de hidrogênio, respectivamente. E a produção de 1 mol de etanol gera apenas 1 mol de H_2 .

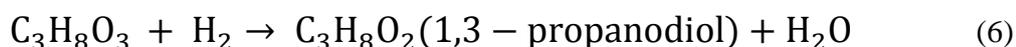
A produção de ácido propiônico a partir do glicerol é indesejável (Equação 5), pois não há produção de H₂ (WANG e YANG, 2013).



ZHANG e YANG (2009) estudaram a produção de ácido propiônico em batelada, com glicerol a 40g.L⁻¹. Os autores realizaram o estudo com microrganismo isolado *Propionibacterium acidipropionici* obtendo produção máxima de 19,7g.L⁻¹ do ácido e rendimento de 0,65 molÁc.Propriônico.mol⁻¹Glicerol. O mesmo ensaio foi realizado com microrganismo já adaptado ao meio, os autores conseguiram um rendimento de 0,73 molÁc.Propriônico.mol⁻¹Glicerol e produção máxima de 23g.L⁻¹. Nestes ensaios também foram detectados ácido acético e ácido succínico, porém em quantidades insignificantes. Os autores concluíram que a cultura adaptada foi capaz de produzir grande quantidade de ácido propiônico.

KOŚMIDER et al. (2010) estudaram a produção de ácido propiônico com glicerol puro e bruto nas concentrações de 20 e 40g.L⁻¹ e cultura pura de *Propionibacterium freudenreichii* subespécie *shermanii* 1. Para concentração de 20g.L⁻¹ do substrato os autores obtiveram concentrações de 13,75 e 11,16g.L⁻¹ de ácido propiônico e rendimentos 0,84 e 0,7 molÁc.Propriônico.mol⁻¹Glicerol para o glicerol puro e bruto respectivamente. Quando a concentração inicial de glicerol aumentou para 40g.L⁻¹, a concentração final do ácido propiônico no glicerol puro aumentou para 17,21 g.L⁻¹ enquanto que para o bruto diminuiu para 9,37 g.L⁻¹, o rendimento em ambos substratos caiu sendo de 0,56 molÁc.Propriônico.mol⁻¹ Glicerol para substrato puro e 0,31 molÁc.Propriônico.mol⁻¹ Glicerol para glicerol bruto. Os autores detectaram ácido acético e succínico, entretanto em quantidades mínimas.

Também verifica-se consumo de hidrogênio se o glicerol for convertido em 1,3-propanodiol, como pode ser observado na Equação 6. Isto ocorre por anaerobiose a partir do glicerol, a sua rota de produção biológica do 1,3-propanodiol ocorre por meio da degradação do glicerol a 3- hidroxipropionaldeído e em seguida a formação do 1,3-propanodiol, isto pode ser melhor observado na Figura 3.8. Este álcool é amplamente utilizado na indústria de polímero para a produção poliésteres e poliuretanos. (ZENG, 1995; KIVISTO et al. 2010; KIVISTÖ et al. 2012).



KIVISTÖ et al. (2011) estudaram o efeito da vitamina B₁₂ na produção de 1,3-propanodiol, utilizando 2,5g.L⁻¹ de glicerol e dois diferentes tipos de microrganismos.

Para *Halanaerobium saccharolyticum* subespécie *saccharolyticum* foi observada a dependência da vitamina para a produção de 1,3-propanodiol, uma vez que com ausência de B₁₂ não ocorreu produção de 1,3-propanodiol. Com o aumento da concentração da vitamina a produção de 1,3-propanodiol também aumentou chegando a um rendimento máximo de 0,39 mol_{1,3-PD}.mol⁻¹Glicerol com 64µg.L⁻¹ de vitamina B₁₂. O mesmo procedimento foi realizado com *Clostridium butyricum* onde ficou constatado que este microrganismo não depende da vitamina B₁₂, uma vez que para várias concentrações da vitamina a produção de 1,3-propanodiol permaneceu constante com 0,58 mol_{1,3-Propanodiol}.mol⁻¹Glicerol.

KIVISTÖ et al. (2012) estudaram em batelada a produção de 1,3-propanodiol com glicerol a 2,5g.L⁻¹ e microrganismo *Halanaerobium saccharolyticum* subespécie *saccharolyticum*. Entre os experimentos realizados foi avaliada a interferência da temperatura na produção deste álcool, foi detectada que a produção de 1,3-propanodiol não variou em função da temperatura obtendo rendimentos entre 0,41 e 0,31 mol_{1,3-Propanodiol}.mol⁻¹Glicerol para temperaturas de 30 à 40°C. Também foram feitos testes para avaliar como a vitamina B₁₂ interferia na produção de 1,3-propanodiol, e detectaram que para *Halanaerobium saccharolyticum* subespécie *saccharolyticum* esta vitamina é fundamental, uma vez que na ausência da vitamina não houve produção de 1,3-propanodiol. Encontraram também que a concentração ótima da B₁₂ é 64µg.L⁻¹ na qual foi obtido o rendimento máximo de 0,63 mol_{1,3-Propanodiol}.mol⁻¹Glicerol.

Trabalhos reportados em literatura indicam a utilização tanto de cultura pura quanto mista para a produção de H₂. Quando mais de um microrganismo é utilizado no mesmo meio, as produções podem ser alteradas, ou seja, pode haver ou não produção de certos produtos, e estes por sua vez podem ser em maior ou menor concentração. Isto é bem exemplificado por MARU et al. (2013) que, utilizando glicerol para a produção de hidrogênio, avaliou três diferentes tipos de microrganismo e a mistura dos três. O estudo relatou que alguns microrganismos isolados produziam 1,2-propanodiol. Entretanto, quando os mesmos microrganismos foram testados em meio misto, não foi detectada a produção de 1,2-propanodiol. A Tabela 3.2, mostra os produtos finais dos três microrganismos isolados e da fermentação mista.

Tabela 3. 2 – Concentrações de produtos finais a partir de diferentes inóculos (MARU et al. 2013).

Produtos finais	<i>Citrobacter freundii</i> H3	<i>Enterobacter</i> spH1	<i>Enterobacter</i> spH2	Mista
	mmol.L ⁻¹			
Etanol	45,65	178,26	76,09	104,35
Ácido láctico	15,52	20,69	15,52	18,97
Ácido butírico	14,86	0,00	0,00	5,41
Ácido fórmico	4,35	10,87	21,74	13,04
Ácido acético	41,67	22,50	53,33	80,00
1,2-propanodiol	0,00	21,84	9,47	0,00
1,3-propanodiol	50,00	0,00	0,00	10,53
Rendimento (molProduto.mol ⁻¹ Glicerol)				
Hidrogênio	0,94	0,85	0,95	0,76
1,3-propanodiol*	0,34	0,00	0,00	0,08
Etanol	0,31	0,96	0,67	0,66

* A partir de cálculos com dados do autor

Neste estudo foram aplicados 20g.L⁻¹ de glicerol e uma conversão de 67,5, 85,75, 52,5 e 62,5% para *Citrobacter freundii* H3, *Enterobacter* spH1, *Enterobacter* spH2 e cultura mista respectivamente. Os autores concluíram que a *Enterobacter* spH1 teve a maior utilização de glicerol, e que a menor produção aconteceu para o inóculo misto. Observaram também que um tipo de cultura pode concorrer com outro na produção de algum produto como, por exemplo, o ácido butírico que chegou a uma concentração de 14,86 mmol.L⁻¹ com *Citrobacter freundii* H3 e 5,41mmol.L⁻¹ quando estava em meio com cultura mista. Por sua vez, pode ocorrer um produção concomitante como é o caso do ácido acético que obteve a maior concentração de 80mmol.L⁻¹ no meio que contemplava as três culturas coexistindo.

Diversos microrganismos que utilizam glicerol com a finalidade de produzir hidrogênio, produzem também outros produtos. A Figura 3.9 contém alguns microrganismos utilizados na produção de hidrogênio e o que foi produzido a partir deles.

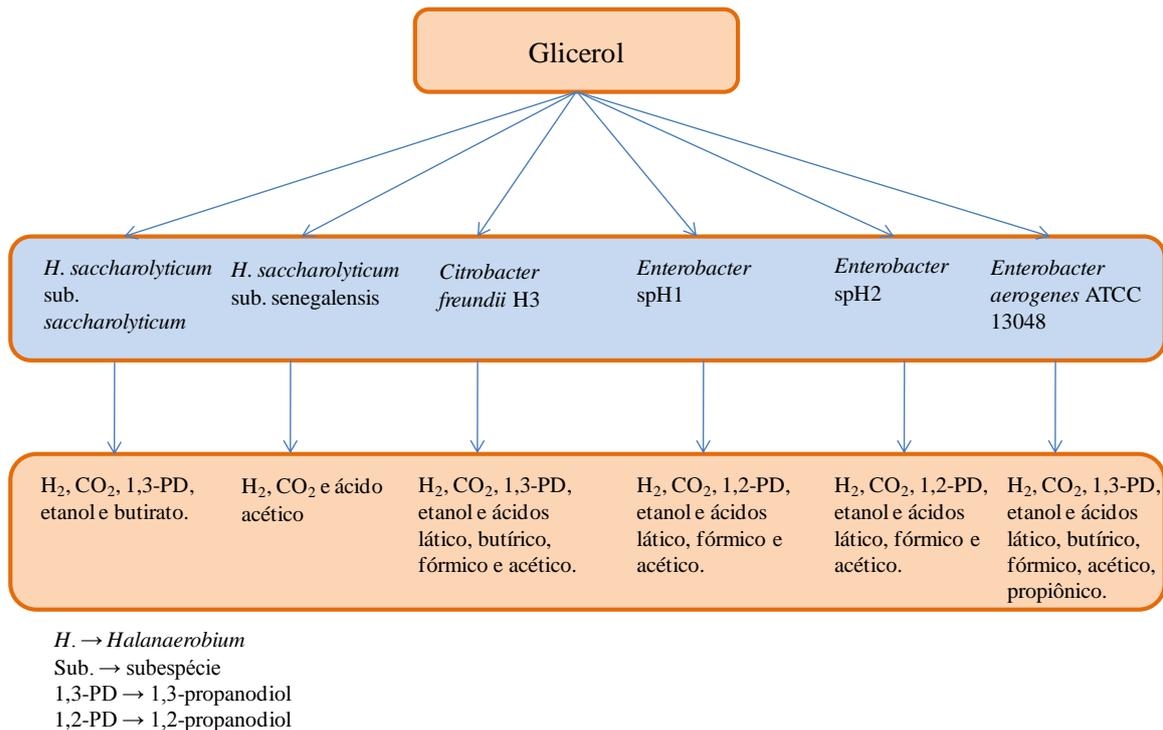


Figura 3.9 – Diferentes microrganismo e o que é produzido a partir do glicerol (MARU et al., 2013; KIVISTÖ et al., 2010; REUNGSANG et al., 2013).

ITO et al. (2005) avaliou a produção de hidrogênio com glicerol puro e bruto em concentrações de 5, 10 e 25 g.L⁻¹, temperatura em 37°C e pH não controlado. As taxas máximas para a produção de H₂ do glicerol puro e bruto com dados do autor foram 1,95 e 1,54 L.h⁻¹.L⁻¹, respectivamente. Os autores concluíram que o rendimento de H₂ diminuiu com o aumento da concentração de glicerol, concluíram também que com o glicerol bruto houve um acúmulo de ácido fórmico, que é convertido em H₂ e CO₂. Além da produção de hidrogênio, estes autores avaliaram o comportamento da produção de metabólitos variando a concentração do glicerol puro e bruto. A concentração do glicerol puro foi de 5, 10 e 25 g.L⁻¹, observaram a produção de metabólitos e o rendimento destes em cada concentração, foi detectado que apenas o etanol teve o rendimento maior na concentração de 5g.L⁻¹ de glicerol puro, com 1molEtanol.molGlicerol⁻¹. Na concentração de 10g.L⁻¹ todos os outros metabólitos produzidos tiveram os rendimentos máximos e foram expressados em mol de metabólito por mol de glicerol, sendo eles ácido láctico (0,14), ácido acético (0,09), 1,3-propanodiol (0,16) e ácido fórmico (0,12). Com o glicerol bruto as concentrações estudadas foram 1,7; 3,3; 10 e 25g.L⁻¹, os metabólitos produzidos foram os mesmo do glicerol puro e os rendimentos máximos foram expressados da mesma maneira, para o etanol e ácido

acético esses valores foram de 0,96 e 0,2 mol. mol⁻¹ na concentração de 1,7 g.L⁻¹ de substrato, respectivamente. O 1,3-propanodiol e o ácido fórmico tiveram rendimentos de 0,22 e 0,2 mol.mol⁻¹ na concentração de 3,3 g.L⁻¹ de glicerol e o ácido láctico teve o rendimento ótimo de 0,17 mol.mol⁻¹ na concentração de 25g.L⁻¹ do substrato. Os autores constataram que ocorreu a diminuição do rendimento de etanol, ácido acético com o aumento do rendimento do ácido láctico.

TEMUDO et al. (2008) avaliaram um reator CSTR para produção de hidrogênio e metabólitos a partir do glicerol (4g.L⁻¹), TDH 8 horas, temperatura e pH controlados em 30°C e 8, respectivamente, como inóculo foi utilizada cultura mista. Os autores obtiveram rendimento de 0,05molH₂.mol⁻¹Glicerol e os metabólitos detectados foram etanol (46,2%), 1,3-propanodiol (27,8%), acetato (5,5%), formiato (10%) e succinato (1,1%). Os rendimentos destes metabólitos foram 0,67 molEtanol.mol⁻¹Glicerol, 0,14 mol1,3-PD.mol⁻¹Glicerol, 0,04 molAcetato.mol⁻¹Glicerol e 0,75molFormiato.mol⁻¹Glicerol para etanol, 1,3-propanodiol, acetato, formiato e succinato, respectivamente. Os autores realizaram o mesmo experimento, utilizando, glicose como substrato, e observaram que o comportamento foi similar ao dos ensaios com glicerol, porém não houve a produção de 1,3-propanodiol.

SELEMBO et al. (2009), aplicaram glicerol puro e bruto com concentração de 3g.L⁻¹ e cultura mista para produção de hidrogênio e 1,3 propanodiol. A quantidade de 1,3-propanodiol produzida para o glicerol puro e bruto foi de aproximadamente 22 e 14 mM respectivamente e o rendimento foi de 0,69 mol1,3-PD.mol⁻¹Glicerol para o glicerol puro e 0,59 mol1,3-PD.mol⁻¹Glicerol para o glicerol bruto. O rendimento máximo de H₂ foi de 0,31 molH₂.mol⁻¹Glicerol. Foi produzido também ácido acético e etanol em maiores quantidades, já ácidos láctico, succínico e fórmico foram reportados porém em concentrações menores que 1mM. Foi realizado o mesmo experimento com glicose e foi obtido acetato, etanol e 2,3-butanodiol em maiores quantidades, já ácidos láctico, succínico e fórmico em concentrações menores que 1mM. Também não foi detectada produção de 1,3-propanodiol utilizando glicose como substrato.

SEIFERT et al. (2009) estudaram a influência da concentração de glicose na produção de H₂ em reatores em batelada, com temperatura de 37°C e pH inicial de 6. O lodo utilizado foi oriundo do esgoto municipal tratado termicamente e as concentrações de glicerol utilizadas foram 5, 10 e 30 g.L⁻¹. O maior rendimento de hidrogênio ocorreu na concentração de 10g.L⁻¹ de glicerol, no qual os autores obtiveram valores de 0,41 molH₂.mol⁻¹Glicerol. Entretanto a produção volumétrica aumentou à medida que a

concentração de substrato também aumentou, chegando ao valor máximo de $0,031 \text{ L.h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ para a concentração de 30 g.L^{-1} . Os autores detectaram além de hidrogênio, ácido láctico, 1,3-propanodiol, ácido acético aumentou a medida que a concentração de glicerol aumentava chegando a concentração de $7,7 \text{ g.L}^{-1}$ para a concentração de 30 g.L^{-1} .

KIVISTO et al. (2010) estudaram reatores em batelada para a produção de hidrogênio utilizando glicerol como substrato em diferentes concentrações (2,5, 5, 10 e 20 g.L^{-1}). O pH inicial foi 7, nos experimentos foram utilizados dois microrganismos *H. saccharolyticum* sub. *saccharolyticum* (Hssa) e *H. saccharolyticum* sub. *senegalensis* (Hsss), estes microrganismos foram inoculados separadamente. Os autores observaram que para ambas as culturas com o aumento da concentração do substrato o rendimento de hidrogênio diminuiu de 0,58 para $0,35 \text{ molH}_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{Glicerol}$ para a Hssa e de 1,21 para $0,88 \text{ molH}_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{Glicerol}$ para Hsss. Os metabólitos produzidos em maior quantidade foram 1,3-propanodiol, ácido acético e em quantidades pequenas ácido butírico e etanol para Hssa. Hsss produziu apenas ácido acético. O rendimento de 1,3-propanodiol também diminuiu a medida que a concentração de glicerol aumentou, o valor máximo deste foi $0,42 \text{ mol1,3-PD} \cdot \text{mol}^{-1} \text{Glicerol}$ e concentração de 2,16 mM.

WU et al. (2011) estudaram a conversão de glicerol puro em hidrogênio e metabólitos variando o pH, temperatura e concentração. Como fonte de inóculo foi utilizada acultura pura de *Klebsiella* sp. HE1. A produção de H_2 foi analisada em diferentes valores de pH 5,5; 6,0; 6,5 e 7,0 com temperatura e concentração fixados em 35°C e 50 g.L^{-1} , respectivamente. A variação da temperatura foi de 30, 35 e 40°C com pH 6 e concentração 50 g.L^{-1} . A concentração de glicerol também variou (10, 30, 50 e 70 g.L^{-1}). Os principais metabólitos detectados foram 1,3-propanodiol e etanol que juntos representaram entre 69 e 82% dos metabólitos produzidos, em menor quantidade foram detectados 2,3-butanodiol (0 à 15%), ácido láctico (1 à 21%), ácido acético (1 à 8%) e ácido fórmico (0 à 17%). Na concentração de 70 g.L^{-1} , foi encontrada a maior produtividade e rendimento do 1,3-propanodiol sendo os valores $6,95 \text{ mmol.h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ e $0,37 \text{ mol 1,3-propanodiol} \cdot \text{mol}^{-1} \text{Glicerol}$, respectivamente.

NGO et al. (2011) estudaram a produção biológica de hidrogênio em reatores batelada, utilizando como substrato glicerol puro e bruto (5 g.L^{-1}) a 75°C e pH 7,5. Para o glicerol puro os autores observaram que nas primeiras 6 horas a produção de hidrogênio aumentou rapidamente e após 24 horas houve uma redução da produção de H_2 , observou-se uma redução do pH. Os metabólitos produzidos foram ácido acético e ácido láctico nas concentrações finais de aproximadamente 7,8 e 6 mmol.L^{-1} . O

rendimento de H_2 máximo foi de $1,28 \text{ molH}_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{Glicerol}$. Para o glicerol bruto foi observado comportamento semelhante, o pH final foi de 6,2, observou-se uma redução na produção de hidrogênio após 24 horas. Também foi constatada produção de ácido láctico e acético o rendimento máximo de hidrogênio foi de $1,28 \text{ molH}_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{Glicerol}$.

MANGAYIL et al. (2012) utilizando testes em batelada com diferentes concentrações de glicerol bruto, pH 6,5 e temperatura de 40°C . As concentrações estudadas foram 0,5; 1,0; 2,5; 3,5 e $5,0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Foi reportada a produção de ácido acético, etanol e ácido butírico. A produção de ácido acético foi de 1,8; 2,1; 1,8; 2,2; e 2,2 mM respectivamente, é notório que a concentração do substrato praticamente não alterou a produção do ácido. Já para a produção de etanol que foi de 1,8; 2,4; 3,8; 4,2 e 4,7 mM e para a de ácido butírico 2,2; 2,6; 3,1; 4,5 e 4,5 mM, pode-se observar que o aumento das concentrações do substrato conseqüentemente aumentou a concentração dos metabólitos produzidos. Os autores concluíram que a produção de H_2 se iniciou com a produção de ácido acético e que com a diminuição da produção de ácido acético o H_2 produzido e acumulado permaneceu estável. Outra constatação é a de que a produção de ácido butírico tem um efeito negativo em relação a produção de ácido acético e hidrogênio. Por fim em uma análise com glicerol puro e bruto, foi notado que a produção de etanol foi menor para o glicerol bruto. Sendo assim os autores concluíram que esta produção inferior pode estar vinculada a impurezas contidas no glicerol bruto, que podem causar o deslocamento metabólico e diminuir a produção de etanol.

KUMAR et al. (2012) avaliaram a produção de hidrogênio com diferentes tipos de inóculo a partir de resíduos da produção de biodiesel em reatores em batelada. Os inóculos foram retirados de duas estações de tratamento de água (S1 e S2), esterco de vaca (S3), lodo granular (S4) e de efluente de fermentação de melão (S5). Os reatores continham $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de substrato, temperatura controlada em 55°C e pH inicial 8. Os experimentos foram realizados primeiramente sem que os inóculos passassem por qualquer tratamento, os lodos que demonstraram os melhores resultados foram o S1 e S2, nestes a porcentagem de hidrogênio no biogás foi 54,8 e 54,8%, respectivamente e a produtividade volumétrica foi $0,053 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ para o lodo S1 e $0,061 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ para o lodo S2. Após os resultados os lodos S1 e S2 foram selecionados para outros testes, o tratamento térmico do lodo (1 hora a 100°C), sem tratamento do substrato e tratamento térmico do lodo e do substrato por 1 hora a 100°C . Para os dois tipos de inóculo o conteúdo de hidrogênio teve um pequeno aumento quando lodo e substrato passaram por tratamento térmico, estes valores foram de 56,3 e 41,9%, respectivamente para S1 e

S2. Já a produtividade volumétrica continuou maior nos inóculos que não tiveram nenhum tipo de tratamento. Para os inóculos S1 e S2 foram detectados etanol, ácido propiônico, n-butanol e ácido acético, este último foi reportado com maiores concentrações com valores que chegaram a $1.612 \text{ mgDQO.L}^{-1}$ para o inóculo S2 que passou por tratamento térmico.

VARRONE et al. (2013) realizaram experimentos em batelada para a produção de hidrogênio com glicerol. A temperatura foi controlada em 37°C , o pH inicial foi de 6,8 e concentração de glicerol bruto de 15 g.L^{-1} . O estudo foi dividido em duas etapas, a primeira foi o enriquecimento do lodo para adaptação de uma cultura que utilizasse ao máximo o glicerol. Nesta etapa os autores obtiveram porcentagens de hidrogênio no biogás que variou de 14 à 35 %, rendimentos que foram de 0,18 à $0,66 \text{ molH}_2.\text{mol}^{-1}\text{Glicerol}$, consumo de glicerol de 50 à 79 %, o pH final variou de 4,5 à 5,4 e foram detectados os metabólitos 1,3-propanodiol, etanol e ácido acético. Na segunda etapa foram realizados testes com diversos tipos de glicerol bruto proveniente de algumas indústrias. Nestes ensaios os autores obtiveram rendimento de hidrogênio de até $0,91 \text{ molH}_2.\text{mol}^{-1}\text{Glicerol}$, produtividade volumétrica máxima de $0,13 \text{ L.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$, consumo de glicerol de 97,5% e o conteúdo de hidrogênio no biogás de 54 %. Os metabólitos foram ácido láctico, ácido succínico, ácido fórmico, ácido acético, ácido propiônico, etanol e 1,3-propanodiol. Dentre estes, a maior produção foi de etanol com produção máxima de 127 mM e rendimento de $0,78 \text{ molEtanol.mol}^{-1}\text{Glicerol}$. Os autores também realizaram a análise dos microrganismos e detectaram que 90% eram pertencentes a família *Enterobacteriaceae* e ao gênero *Klebsiella sp.* e *Escherichia sp.* Nos experimentos foi possível concluir que a produção de 1,3-propanodiol é concorrente com a de etanol, uma vez que à medida que a produção de etanol aumentava a de 1,3-propanodiol diminuía e que é possível a partir de lodo misto, adaptar microrganismos para uma maior produção de hidrogênio.

SÁ et al. (2013) utilizaram glicerol puro em reatores em batelada com concentração de 10g.L^{-1} , pH 5,5 e agitação (100 rpm). O lodo utilizado foi obtido a partir de cultura mista proveniente de lodo de estação de tratamento de esgoto municipal, o qual foi submetido ao tratamento térmico. Após 72 horas de fermentação o consumo do substrato foi de 97% com produção de ácido acético (3,72mM), ácido butírico (3,23mM) e 1,3-propanodiol (20,17mM). O rendimento máximo de hidrogênio obtido no experimento foi de $0,80 \text{ molH}_2.\text{mol}^{-1}\text{Glicerol}$.

GALLARDO et al. (2013) estudaram a produção de 1,3-propanodiol à partir do glicerol em três reatores EGSB operados em paralelo com 25g.L^{-1} de glicerol, temperatura controlada em 37°C e pH 6,8. O inóculo utilizado foram grânulos retirados de um reator UASB para tratamento de águas residuárias de cervejaria. Uma parte do lodo foi submetido ao tratamento térmico (100°C por 15 minutos), outra parte a ruptura dos grânulos e o restante não passou por nenhum tipo de tratamento. Diferentes TDH foram aplicados, igualmente para os três reatores, o TDH inicial foi de 24 horas e diminui gradativamente para 12, 6 e 3 horas. As análises de metabólitos solúveis no efluente indicaram a presença principalmente de 1,3-propanodiol, acetato e ácido butírico foram detectados, porém em concentrações menores que 1g.L^{-1} . O rendimento do 1,3-propanodiol para os reatores com ruptura dos grânulos, tratamento térmico do lodo e lodo sem tratamento para o TDH de 24 horas foram 0,12; 0,29 e 0,22 $\text{g1,3-Propanodiol.g}^{-1}\text{Glicerol}$. Com a diminuição do TDH esses valores aumentaram, o reator com lodo não tratado teve o rendimento máximo de 0,49 $\text{g1,3-PD.g}^{-1}\text{Glicerol}$ no TDH de 12 horas, enquanto que os outros reatores obtiveram resultados de 0,47 $\text{g1,3-PD.g}^{-1}\text{Glicerol}$ ambos para o TDH de 6 horas. As maiores produções volumétricas de 1,3-Propanodiol foram de 1,79; 2,25 e $3,42\text{ g.L}^{-1}\text{.h}^{-1}$ para os reatores com grânulos rompidos, tratamento térmico e sem tratamento, respectivamente. Com relação a produção de biogás, os autores observaram que a produção de hidrogênio foi intensa logo após a inoculação do reator e diminuiu com a diminuição do TDH, em nenhum dos reatores foi detectado gás metano. A quantidade de hidrogênio produzida foi significativa apenas no TDH de 24 horas nos reatores com tratamento térmico do lodo e para o reator sem tratamento do lodo. Os autores concluíram que este tipo de metabolismo pode ser explicado pelo processo de seleção de microrganismo que acontece com a variação do TDH.

REUNGSANG et al. (2013) utilizaram um reator UASB para a produção de hidrogênio à partir de glicerol, o inóculo utilizado foi *Enterobacter Aerogenes* ATCC 13048, isolada de um reator UASB utilizado para produzir metano utilizando água residuária de uma cervejaria. A temperatura do reator foi mantida em 37°C , TDH 24 horas (dado calculado com base em dados do autor) e pH controlado em 5,5, operado primeiramente com glicerol puro. O reator foi operado de modo contínuo com taxa de carregamento orgânico (TCO) de $25\text{g.L}^{-1}\text{.d}^{-1}$ até encontrar a estabilidade do reator. Após o equilíbrio do reator a taxa de carregamento orgânico foi aumentada para 37,5; 50,0; 62,5 e $75\text{g.L}^{-1}\text{.d}^{-1}$, respectivamente. Após obter a melhor TCO para o glicerol puro, o

reator passou a ser alimentado com glicerol bruto com a taxa de carga orgânica menor, igual e maior que a TCO ótima para o reator com glicerol puro. Enquanto o reator era operado com glicerol puro o máximo conteúdo de hidrogênio e a máxima taxa de produção foram de 37,1% e $0,22 \text{ L.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$ respectivamente, obtidos simultaneamente para a TCO de $50\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, indicando que esta taxa foi a mais adequada para a produção de hidrogênio com glicerol puro. Quando o reator passou a ser operado com glicerol bruto os valores ótimos para conteúdo de hidrogênio e taxa de produção foram de 24,2% e $0,15\text{L.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$ respectivamente, estes valores foram adquiridos para a TCO de $50\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$. O rendimento máximo foi de 0,41 e $0,324 \text{ molH}_2.\text{mol}^{-1}\text{Glicerol}$ para o glicerol puro e bruto, respectivamente. Os metabólitos encontrados no efluente para o glicerol bruto foram etanol, 1,3-propanodiol, ácidos fórmico, acético, propiônico, butírico e láctico. Com base nos metabólitos produzidos a fermentação ocorreu pela via do ácido fórmico. Neste tipo de fermentação o rendimento máximo para a produção de hidrogênio é de $1\text{molH}_2.\text{mol}^{-1}\text{Glicerol}$. Os valores de rendimento foram considerados baixos pelos autores, comparados aos valores teóricos de rendimento. Estes resultados coincidem com a produção de 1,3-propanodiol e ácido propiônico que consomem H_2 ao passo que são produzidos.

LO et al. (2013) estudaram um reator de mistura perfeita para a produção de H_2 , sendo glicerol puro e bruto como substrato, mantendo a temperatura em 35°C , com tempo de detenção hidráulica de 12 horas e pH não controlado, como inóculo foi utilizada a cepa de *C. pasteurianum* CH4. Para o substrato puro o conteúdo de hidrogênio no biogás, a taxa de produção e o rendimento foram de 78,3%, $0,1031\text{L.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$ e $0,5\text{molH}_2.\text{mol}^{-1}\text{Glicerol}$, respectivamente. Os principais metabólitos foram 1,3-propanodiol, ácido butírico, butanol, acetato e ácido láctico. Enquanto que para o bruto o conteúdo de hidrogênio no biogás, a taxa de produção e o rendimento foram 72,71%, $0,166\text{L.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$ e $0,77\text{molH}_2.\text{mol}^{-1}\text{Glicerol}$, respectivamente. Os metabólitos foram os mesmos encontrados com o resíduo puro. A quantidade de 1,3-propanodiol foi de aproximadamente $1,5\text{g.L}^{-1}$ e 2g.L^{-1} para o glicerol puro e bruto, respectivamente. De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que a produção de hidrogênio foi melhor para o reator alimentado com glicerol bruto e concluíram que isso pode ser atribuído ao fato de que o resíduo pode conter impurezas como fosfato que pode estimular a produção de hidrogênio.

4 – MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Substrato

O glicerol, substrato utilizado no desenvolvimento do projeto, é oriundo da empresa Bioverde, localizada em Taubaté. A DQO deste resíduo é de aproximadamente 900g.L^{-1} e pH 9 após ser diluído com água e meio nutriente. A Tabela 4.1 detalha o resíduo utilizado no estudo, os testes de caracterização foram fornecidos pela empresa fornecedora do resíduo.

Tabela 4. 1 – Característica do glicerol bruto utilizado no estudo.

Característica	Resultado
Aparência (a 30°C)	Líquido viscoso escuro
Teor de água	0,8 %
Glicerol total	64,3 %
Teor de ácido total	22,1 %
Fluidez	Fluido a 40°C
Densidade aparente (30°C)	1,12 g.ml^{-1}

Fonte: Empresa Bioverde.

4.2 - Reator RALF

O reator RALF foi construído em acrílico com 4,3 cm de diâmetro interno e 150 cm de altura, suficiente para a expansão do leito, conferindo um volume aproximado de $0,0022\text{m}^3$ correspondente a 2,2L. O reator possui uma camisa e uma serpentina interna para o controle de temperatura.

A temperatura foi controlada por um banho termostático em 30°C. Constatou-se que o controle da temperatura realizado apenas pela serpentina, era suficiente para manter a temperatura do líquido.

A vazão de alimentação em cada fase do RALF foi calculada considerando o volume do reator e o TDH correspondente. Na Tabela 4.2 pode ser observada a vazão, o TDH em cada fase do reator. A vazão foi monitorada diariamente. O meio suporte utilizado foi a argila expandida, também conhecida como cinasita.

Tabela 4. 2 – Número de fases, TDH e vazão correspondentes para RALF.

Fase	TDH (h)	Vazão (mL.h⁻¹)
1	14	156
2	12	182
3	10	218
4	8	272
5	6	363
6	4	545
7	2	1089
8	1	2178

4.3 - Reator EGSB

O Reator EGSB foi construído em acrílico, com 150 cm de altura e 4,3 cm de diâmetro, sendo o volume de aproximadamente 2,2L. A temperatura foi mantida em 30°C controlada por um banho termostático. A Tabela 4.3 demonstra a fase, TDH e vazão do reator EGSB.

Tabela 4. 3 - Número de fases, TDH e vazão correspondentes para EGSB.

Fase	TDH (h)	Vazão (mL.h⁻¹)
1	24	91
2	20	109
3	16	136
4	12	182
5	8	272
6	4	545
7	2	1089
8	1	2178

4.4 – Sistema de alimentação e recirculação dos reatores

A figura 4.1 mostra com maiores detalhes todo o sistema operacional tanto do reator RALF quanto do EGSB.

Entre a bomba de alimentação e a entrada do reator foi colocado um redutor de pressão para impedir que o fluido do meio reacional se deslocasse para o interior da bomba, ou até mesmo para que o fluido saísse do interior do reator. Eram realizadas limpezas periódicas na bomba de alimentação, assim como trocas nas mangueiras.

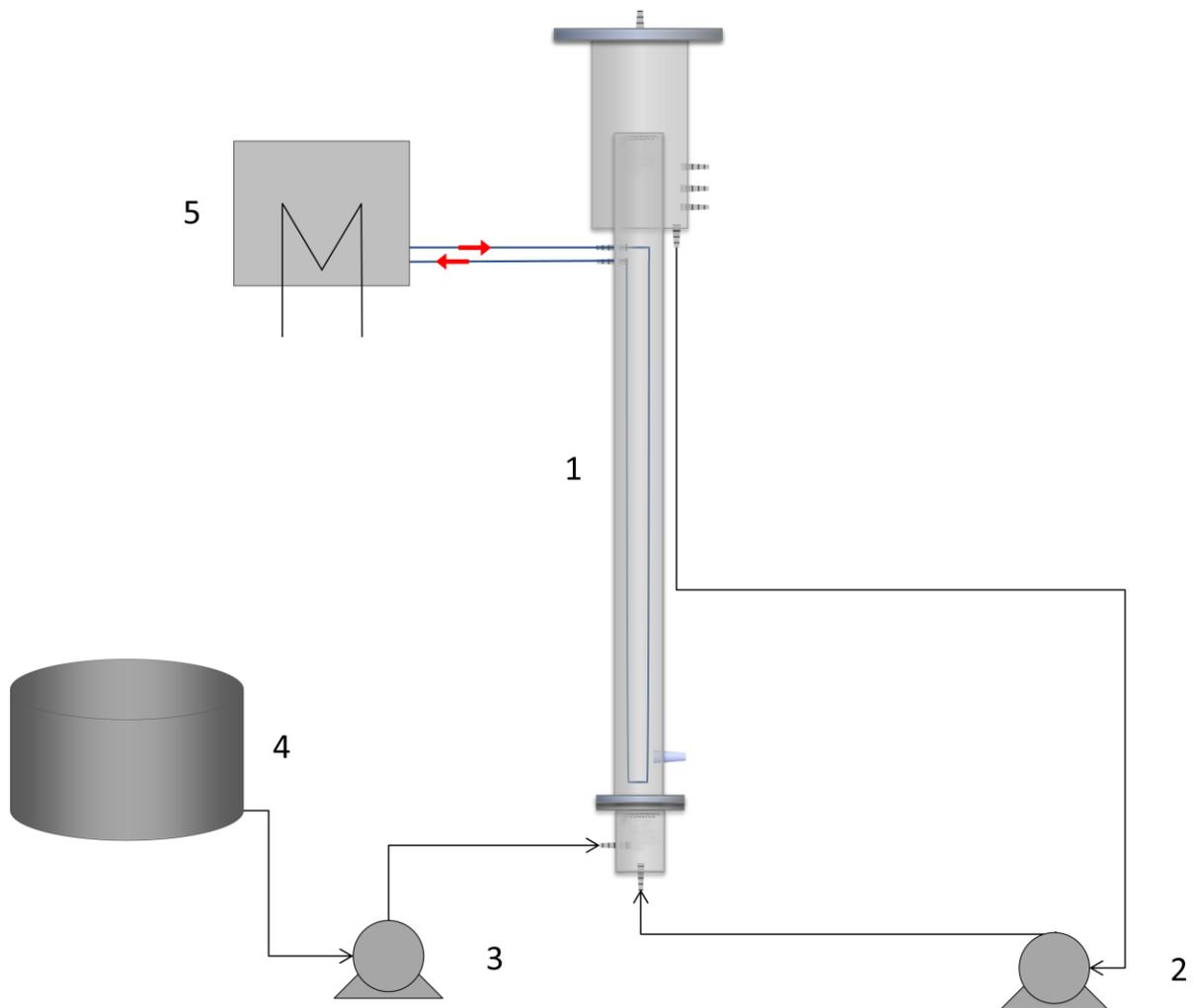


Figura 4. 1 – Sistema completo do reator R1 e R2. 1 – Reator; 2 – Bomba de Recirculação; 3 – Bomba de alimentação; 4 – Tanque de alimentação; 5 – Banho Termostático (Acervo do Autor).

4.4 - Alimentação dos Reatores

O afluente foi constituído de água de torneira, glicerol, meio de nutrientes DEL NERY (1987) e ácido clorídrico (HCl) para controle do pH de entrada. Os nutrientes e as respectivas concentrações podem ser observados na Tabela 4.4. Diariamente ocorria a higienização mecânica do tanque de alimentação, primeiramente lavados com água,

em seguida álcool 70% para eliminação de qualquer eventual microrganismo, e novamente com água.

Tabela 4. 4 – Água residuária a ser utilizada (DEL NERY, 1987).

Composto	Concentração (mg.L⁻¹)
Glicerol*	5.000,00
Uréia	125,00
Sulfato de níquel	1,00
Sulfato ferroso	5,00
Cloreto férrico	0,50
Cloreto de cálcio	47,00
Cloreto de cobalto	0,08
Óxido de selênio	0,07
Fosfato de potássio monobásico	85,00
Fosfato de potássio dibásico	21,70
Fosfato de sódio dibásico	33,40
Bicarbonato de sódio	84,00

* Na água residuária estudada por Del Nery (1987) foi utilizado glicose (5.000 mg.L⁻¹)

O glicerol por possuir alta viscosidade, e praticamente sólido em temperatura ambiente, passava por aquecimento para facilitar a mistura em água. O meio nutriente foi preparado diariamente, um pouco antes da troca do tanque de alimentação. O volume da alimentação foi calculado para um tempo de 24 horas com um acréscimo de 30% no volume total. Isso era necessário para que um eventual atraso na troca do tanque ou uma variação na bomba de alimentação não ocasionasse um interrompimento na alimentação. O volume de tanque de alimentação variou de acordo TDH, uma vez que este interfere diretamente na vazão e com esta é possível calcular o volume necessário para 24 horas de alimentação.

4.5 - Inóculo

O inóculo utilizado nos dois reatores foi coletado de um reator UASB utilizado no tratamento de água residuária de abatedouro de aves, fornecido pela empresa Dakar. Constituído fisicamente por grânulos de coloração escura e cultura mista.

No reator RALF os grânulos foram triturados até ficarem homogêneos. Em seguida foram aquecidos até atingirem a temperatura de 90°C, permaneceram nesta por 10 minutos, esse aquecimento foi necessário para inibir os microrganismos

consumidores de hidrogênio e ativar os esporos anaeróbios (KIM *et al.* 2006). Em seguida os grãos foram resfriados a uma temperatura de 25°C. O volume utilizado na partida do reator foi de 10% de lodo para o volume total de líquido. Todo o procedimento de preparo e aquecimento foi realizado no início da operação, no que se chama de partida do reator.

Os grânulos do reator EGSB foram lavados em água corrente, para eliminar partículas menores. Foram aquecidos a uma temperatura de 100°C durante uma 1 hora, em seguida foram resfriados a uma temperatura de 25°C. O aquecimento também foi realizado com o intuito de inibir as metanogênicas e ativar as acidogênicas. Ao final do tratamento os grânulos mantiveram-se em sua maioria inteiros. Ocorreu então uma nova lavagem para se obter apenas os grânulos inteiros. Em seguida foram introduzidos no reator para início de operação do mesmo.

4.6 - Material Suporte

O material suporte utilizado no reator RALF foi cinasita (argila expandida), que foi utilizado para aderência dos microrganismos. Por possuir granulometria bastante variada, foi necessária a utilização de peneiras, as partículas retidas entre as peneiras com abertura de 3,35 e 2,8mm foram as utilizadas. Depois de separada uma quantidade suficiente, a cinasita foi lavada e todas as partículas com densidade menor que da água foram descartadas. Isso foi necessário para que, quando o meio suporte fosse colocado no interior do reator e o volume do mesmo completado com o meio reacional, a cinasita não fosse para a parte superior do reator. A Tabela 4.5 apresenta algumas características do material suporte e na Figura 4.2 é possível observar visualmente como é a cinasita.

Tabela 4. 5 – Característica da material suporte.

Material Suporte	Dimensão (mm)	Densidade (g.cm⁻³)	Vmf* (cm.s⁻¹)
Argila expandida	2,8 - 3,35	1,50	1,24

* Velocidade mínima de fluidização



Figura 4. 2 – Cinasita, material suporte do RALF.

O meio suporte utilizado no reator EGSB foi o próprio lodo, que possui como característica principal se encontrar em forma de esfera, partículas com diâmetro médio de 3mm, que são melhor observadas na Figura 4.3.



Figura 4. 3 - Grânulos utilizados no reator EGSB.

4.7 - Análises físico-químicas

O processo de produção de H₂ no reator foi monitorado periodicamente, mais precisamente 3 vezes durante a semana, através de análises de determinados parâmetros. Sendo pH, demanda química de oxigênio e sólidos totais analisados de acordo com o Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (1998). Já as análises dos ácidos voláteis totais e alcalinidade total por bicarbonato foram determinadas de acordo com DILLALO e ALBERTSON (1961) modificada por RIPLEY *et al.* (1986). E a quantificação de glicerol nas amostras foi realizada de acordo com BONDIOLI e DELLA BELLA (2005).

4.8 - Determinação de ácidos voláteis individuais e alcoóis

As determinações de 1,3-propanodiol e etanol foram realizadas no Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), com cromatógrafo Shimadzu GC 2010, equipado com detector de ionização de chama (DIC) e coluna HPINNOWAX de 30m x 0,25mm (diâmetro interno) x 0,25µm (espessura do filme). O tempo de aquecimento das amostras foi de 13 minutos, temperatura do bloco de aquecimento de 100°C, volume de 400µL de amostra injetada, temperatura da seringa de 100°C, temperatura do detector de 250°C e gases de arraste ar sintético e hidrogênio.

As determinações de ácido acético, ácido propiônico, ácido succínico, ácido láctico, ácido fórmico, ácido butírico, ácido valérico, ácido capróico, ácido isovalérico e ácido isobutírico foram feitas com método desenvolvido pelo Laboratório de Processos Biológicos – Setor de Cromatografia do Departamento de Hidráulica e Saneamento (SHS) da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC) da Universidade de São Carlos (USP) por cromatografia líquida pelo HPLC Shimadzu equipado com bomba LC-10ADVP, um amostrador automático HT SIL-20A, coluna de forma CTO-20A a 43°C, detector do índice de refração RID-10A, controlador de sistema SCL-10AVP e coluna HPX-87H Aminex (300mm x 78mm, Bio-Rad). A fase móvel constituída por H₂SO₄ (0,01N) a 5mL.min⁻¹.

4.9 - Análise da composição do biogás e quantificação da produção de hidrogênio

A composição dos gases produzidos foi feita no Laboratório de Controle Ambiental II (LCAII) na UFSCar por meio de coleta de amostras do gás através de uma seringa “gas tight” com trava, injetada no cromatógrafo em fase gasosa (GC-2010, Shimadzu, Japão) com detector de condutividade térmica (TCD) com argônio como gás de arraste e coluna Supelco Carbonex 1010 (30m x 0,53mm). A coleta foi realizada na parte superior dos reatores e ocorria a lavagem da seringa com o próprio biogás antes do recolhimento para análise. A produção volumétrica do hidrogênio foi realizada com medição através do MilliGas-counter (MGC-1) da Ritter, com coleta de gás por 10 minutos.

4.10 – Microscopia Eletrônica de Varrudura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada no Instituto de Física de São Carlos na Universidade de São Carlos, no aparelho Digital Scanning Microscope DSM 960, da empresa Zeiss West Germany. Com ampliações de 10 a 4000 vezes o tamanho original para melhor visualização dos microrganismos, a fim também de aferir a morfologia da comunidade microbiana. MEV foi realizado apenas nos grânulos do reator EGSB. As amostras retiradas do reator eram lavadas com solução de glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M e pH 7,3, com a finalidade de fixar os microrganismo aderidos e foram assim deixadas no banho por 12 horas em geladeira. Logo após foram lavadas 3 vezes com solução tampão de fosfato 0,1M e pH 7,3, durante 10 minutos cada. Em seguida passaram por desidratação com etanol em soluções de 50, 70, 80, 90 e 95% com lavagens de 10 minutos cada. Por fim as amostras foram lavados 3 vezes com álcool 100%, por 10 minutos cada lavagem. Após as lavagens as amostras foram coladas em suportes para MEV utilizando para isto esmalte incolor. Foram então levadas a estufa de 30°C, por aproximadamente 1 hora. A última etapa do procedimento, antes de serem observadas em microscópio, foi a cobertura das amostras com ouro.

4.11 – Frequência das Análises

Algumas análises foram realizadas diariamente, outras periódicas. As amostras de afluente e efluente eram coletadas 3 vezes por semana e congeladas para posterior necessidade. A frequência das análises pode ser observada na Tabela 4.6.

Tabela 4. 6 – Frequência das análises nos reatores RALF e EGSB.

Análise	Frequência
Vazão	Diária
pH	Diária
Glicerol	3 x semana
DQO*	3 x semana
Conteúdo de Biogás	3 x semana
Produção Volumétrica de H ₂	3 x semana
Ácidos e Álcoois	3 x semana

*Demanda Química de Oxigênio

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – Reator RALF

5.1.1 – Consumo de Glicerol

A Figura 5.1 ilustra o consumo de glicerol em todas as fases do reator RALF.

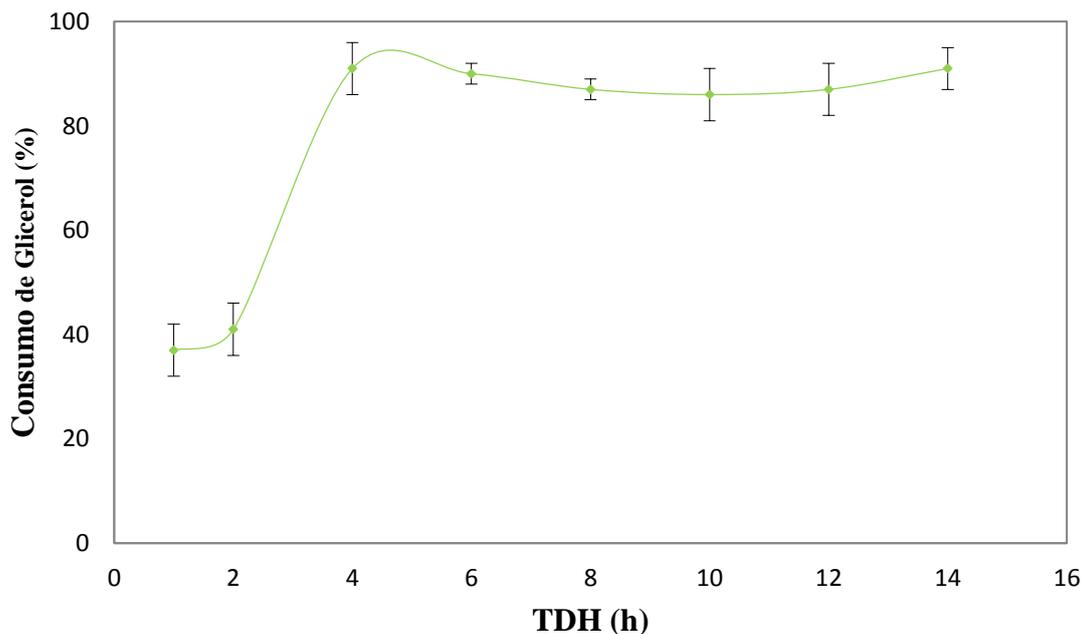


Figura 5. 1 – Consumo de glicerol do reator RALF.

O consumo de glicerol nos TDH de 14 à 4 horas foram praticamente similares com valores de 91, 87, 86, 87, 90 e 91% respectivamente, enquanto que para as duas últimas fases com TDH de 2 e 1 hora, os consumos foram de 41 e 37%. Possivelmente o consumo foi maior em TDH elevados, pois os microrganismos tiveram um tempo maior para degradar o substrato, além de que em TDH menores pode ocorrer uma sobrecarga de glicerol no meio reacional.

O resultados obtidos no presente trabalho está de acordo com relatos da literatura, LO et al. (2013) operaram um reator CSTR com glicerol puro e bruto em um TDH de 12 horas e obteve para ambos substratos consumo maior que 95%.

Entretanto poucos trabalhos contínuos com glicerol são reportados em literatura, porém estudos em batelada podem ser usados como comparativo, um deles é o trabalho

realizado por NGO et al. (2011) que estudando reatores em batelada com 5g.L^{-1} de glicerol, pH inicial de 7,5 e temperatura controlada a 75°C , atingiu conversão de 63 % de substrato.

Outro trabalho que relata alto consumo de glicerol é o de VARONE et al. (2013) que utilizando reatores em batelada para a produção biológica de hidrogênio, com temperatura de 37°C e 15g.L^{-1} de glicerol obteve consumo de 97,5% de substrato. Resultados similares foram obtidos por SÁ et al. (2013) que utilizaram reatores em batelada, 10g.L^{-1} de glicerol e lodo proveniente de estação de tratamento, e obtiveram consumo de 97% de substrato.

Existem ainda reatores contínuos que operam com outros tipos de substrato e que apresentam comportamento semelhante. Por exemplo, BARROS et al. (2010) estudando reator RALF com glicose à 4g.L^{-1} constatou um consumo de 80 à 83 de glicose para os TDH de 8 à 4 horas. Com a diminuição do TDH de 2 para 1 hora este consumo diminuiu para 59 e 49%, respectivamente.

E AMORIM et al. (2009) operando reator RALF com glicose teve um consumo de 90% para os TDH de 8 à 1 hora. A diminuição do TDH não afetou o consumo de substrato.

Ao se comparar os trabalhos da literatura com o presente trabalho, pode se concluir que o consumo de glicerol se manteve condizente com a literatura, tanto na porcentagem como no comportamento do consumo.

5.1.2 – Remoção de DQO

A remoção de DQO é um parâmetro importante quando se trata de tratamento de efluentes, pois controla a quantidade de matéria orgânica despejada em corpos d'água. Entretanto, na produção de hidrogênio apenas uma parte da DQO é removida, já que a outra apenas se converte em ácidos e alcoóis, que são contabilizados na medida final. Na Figura 5.2 estão demonstrados os valores de remoção de DQO no reator RALF.

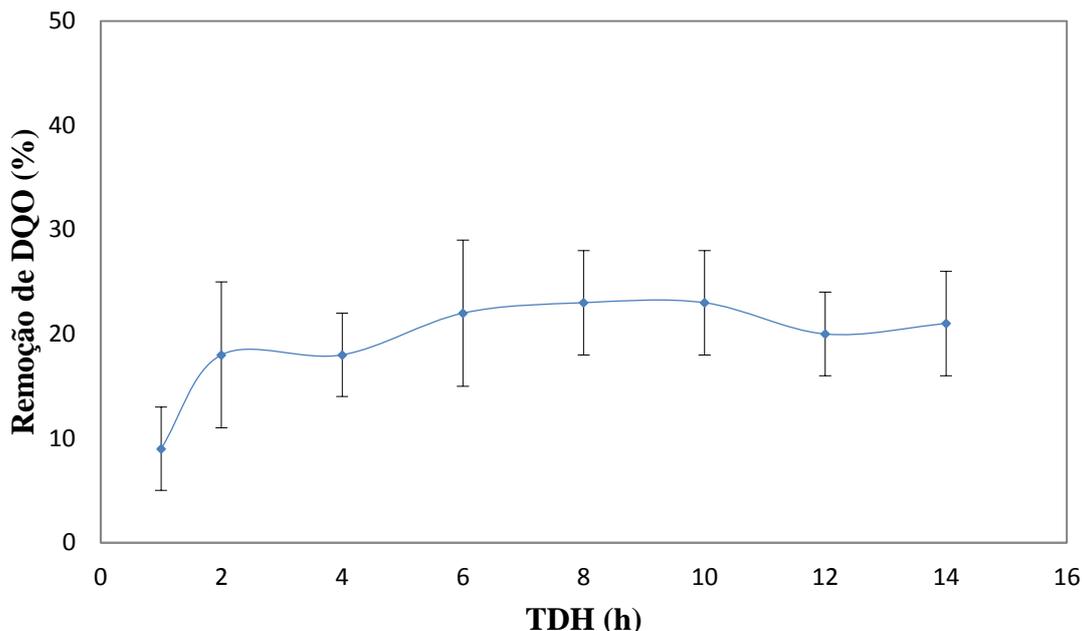


Figura 5. 2 – Remoção de DQO do reator RALF em todas as fases de operação.

A remoção de DQO no RALF atingiu valores bem próximos em quase todos os TDH, com os seguintes valores 21, 20, 23, 23, 22, 18 e 18% para os TDH de 14, 12, 10, 8, 6, 4 e 2 horas, respectivamente. Apenas no TDH de 1 hora a remoção foi mais baixa 9%. Esta diminuição é esperada, uma vez que também foi observada a diminuição da degradação do substrato, a remoção da DQO está diretamente ligada ao consumo deste.

Assim como este estudo alguns trabalhos reportam uma baixa remoção de DQO quando a finalidade é a produção de hidrogênio. REIS e SILVA (2011) operando reator RALF com glicose a 5g.L^{-1} para produzir H_2 , cultura mista e argila expandida como meio suporte, obteve uma remoção máxima de 30% no TDH de 6 horas e de 25% para os TDH de 8 e 4 horas.

LIMA et al. (2012) operando dois reatores de leito fixo para produção de hidrogênio com TDH de 2 horas, utilizando glicose ($1,8\text{g.L}^{-1}$) e sacarose ($1,7\text{g.L}^{-1}$) como substrato obteve uma redução de 19% de DQO em ambos reatores.

É possível concluir que a remoção de DQO deste reator RALF em estudo, é semelhante aos reatores reportados na literatura e que em reatores acidogênicos esta remoção é baixa.

5.1.3 – pH

A Figura 5.3 mostra a variação do pH no afluente e efluente do reator RALF durante todos os períodos de operação para os respectivos TDH.

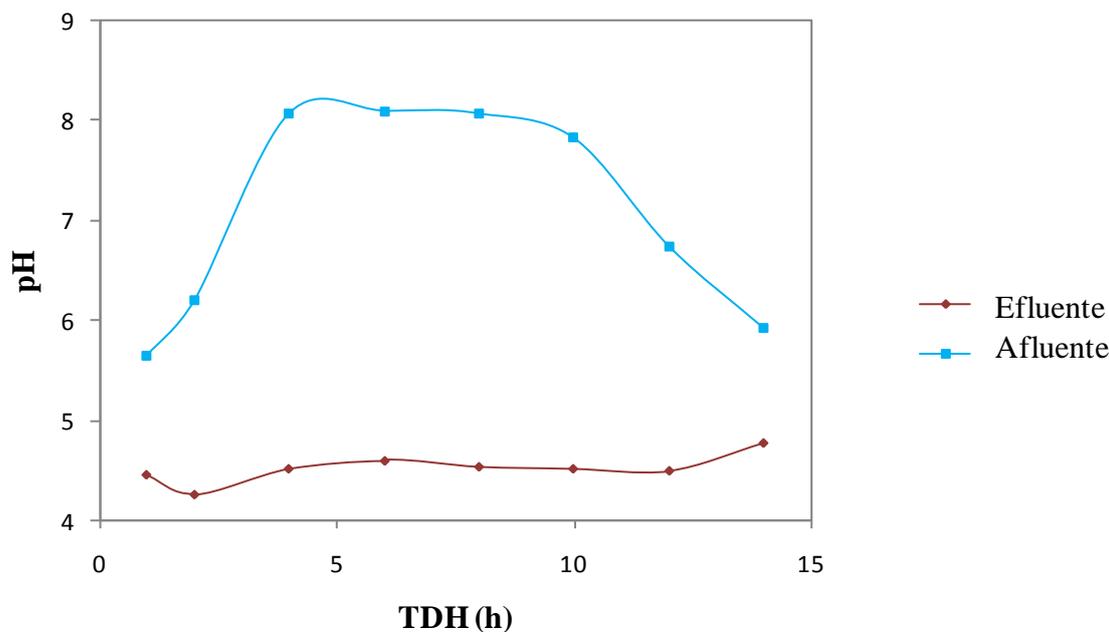


Figura 5. 3 – Variação do pH afluente e efluente do reator RALF.

Os valores de pH do efluente no RALF intercalaram entre 4 e 5, esses valores obtidos se devem ao fato de que além de produzir hidrogênio, o reator produz também ácidos que provocam a diminuição do pH no meio reacional. Outra característica na produção de hidrogênio é de ocorrer em meio ácido, sendo então o pH do efluente favorável para tal. Entretanto, à medida que o TDH diminuía, existia a necessidade de controlar o pH da entrada, para que o do efluente não variasse e interferisse na produção de hidrogênio.

Contudo, é observado que o pH do afluente principalmente nos TDH de 10 à 4 horas está em torno de 8. Com isso, é fácil concluir que o reator produz um quantidade relevante de ácidos, uma vez que promove a queda do pH para cerca de 4,5 no efluente.

Meios ácidos também são relatados em outros estudos que tem como finalidade a produção de hidrogênio. SHIDA et al. (2009) também trabalhando para a produção de

hidrogênio com reator RALF e glicose como substrato, teve o pH do meio reacional em torno de 3,8.

NGO et al. (2011) operaram reatores em batelada com concentração de 5g.L^{-1} , temperatura de 75°C e pH inicial de 7,5. Durante a operação do reator o pH diminuiu gradativamente até atingir 6.

KUMAR et al. (2012) estudaram reatores em batelada para a produção de H_2 com 10g.L^{-1} de glicerol, temperatura de 55°C e pH inicial 8. No fim do ensaio o pH atingiu valores menores que o inicial com valores de 7 e 7,2.

Enquanto que LO et al. (2013) estudando reator CSTR com glicerol puro e bruto, temperatura de 35°C e TDH de 12 horas para a produção de hidrogênio controlou o meio reacional com pH de 7 e 6,5 para glicerol puro e bruto, respectivamente.

REUNGSANG et al. (2013) utilizando reator UASB para produzir H_2 com glicerol e TDH de 24 horas, manteve o pH entre 6 e 4.

Por sua vez VARRONE et al. (2013) operando reatores em batelada com glicerol a 15g.L^{-1} , temperatura de 37°C e pH inicial de 6,8. Detectaram ao final do experimento a diminuição do pH que atingiu 4,5.

E MUÑOZ-PÁEZ (2013) utilizando reator de leito fluidizado e sacarose como substrato para a produção de hidrogênio, manteve o meio reacional com pH entre 4 e 5.

Como é observado nos estudos reportados na literatura e no reator RALF em estudo o pH se manteve ou foi controlado para se manter sempre ácido, pois este meio favorece a produção de hidrogênio, uma vez que as metanogênicas tendem a não se manifestar em pH baixo.

5.1.4 – Conteúdo de Hidrogênio no Biogás

No biogás foram medidas as porcentagens de hidrogênio, gás carbônico e em alguns casos metano, todos estes gases são produzidos na digestão anaeróbia. Quando a finalidade é a produção de hidrogênio, é fundamental que os microrganismos metanogênicos não estejam presentes, pois estes convertem o hidrogênio produzido, juntamente com o carbono do meio, em metano. Portanto, o inóculo foi submetido ao tratamento térmico, a fim de eliminar estes microrganismos. A Figura 5.4 detalha os valores de H_2 do biogás no reator RALF.

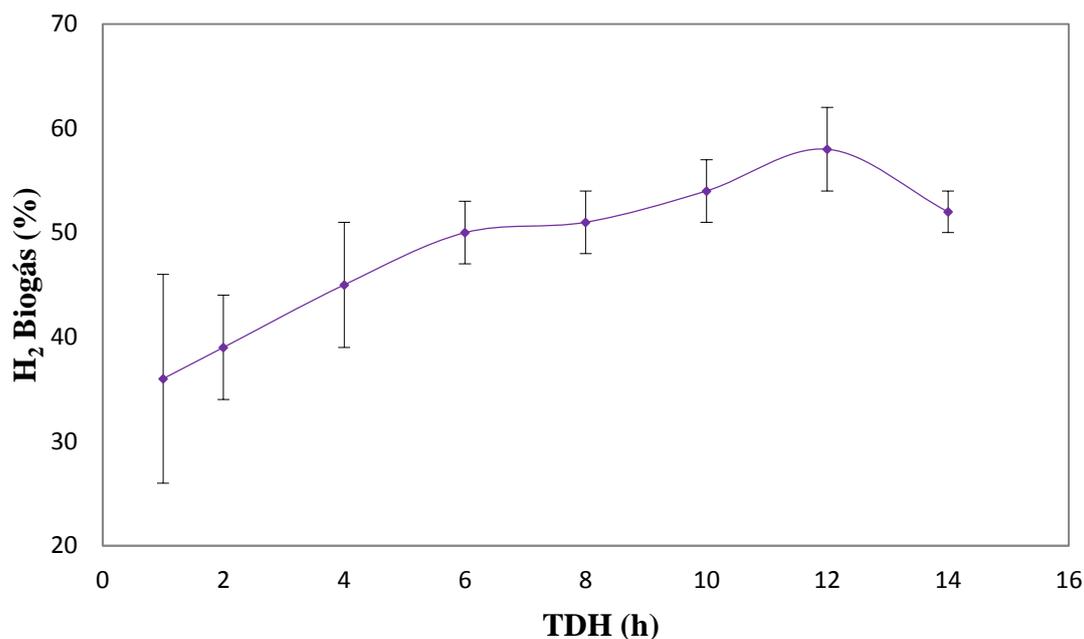


Figura 5.4 – Conteúdo de hidrogênio no biogás do reator RALF.

Com exceção do TDH de 14 horas com 52% de H₂ no biogás, a partir do TDH de 12 horas até o de 1 hora, ocorreu um decréscimo no conteúdo de hidrogênio no RALF com valores de 58, 54, 51, 50, 45, 39 e 36%. Durante toda a operação do reator não foi detectado metano, o tratamento térmico do lodo e o meio ácido foram fundamentais para inibir os microrganismos metanogênicos. Resultados similares foram reportados por AMORIM et al. (2009).

A diminuição de hidrogênio no biogás também foi relatada por CHANG et al. (2002) que operando um reator de leito fixo com sacarose, observou que com a diminuição do TDH ocorria também a diminuição do conteúdo de hidrogênio no biogás. O experimento se deu inicialmente em um TDH de 5 horas e diminuiu para 2, 1 e 0,5 horas, os resultados da porcentagem de hidrogênio no biogás foram 45,8; 34,9; 20,4 e 9,5 % respectivamente.

SELEMBO et al. (2009) estudando reatores em batelada com concentração de 3g.L⁻¹ de glicerol puro e bruto e temperatura controlada em 30°C, obtiveram conteúdos de H₂ no biogás de 61 e 53 % com glicerol bruto e puro, respectivamente.

WU et al. (2011) estudaram a conversão de glicerol puro em hidrogênio e metabólitos variando o pH, temperatura e concentração com cultura pura de *Klebsiella*

sp. HE1. Os autores obtiveram diferentes conteúdos de H₂ no biogás que variam de 33 à 54%.

MANGAYIL et al. (2012) avaliaram a produção de H₂ utilizando testes em batelada com diferentes concentrações de glicerol bruto, pH 6,5 e temperatura de 40°C. Os autores obtiveram diferentes conteúdos de H₂ no biogás que variaram de 3,7 à 15,2%.

A Tabela 5.1 reporta o conteúdo de hidrogênio no biogás em diferentes reatores e substratos.

Tabela 5. 1 - Conteúdo de hidrogênio em diferentes reatores e substratos

% de H₂	Reator	Substrato	Autor
37-40	CSTR	Extrato de Sacarose	ANTONOPOULOU et al. (2010)
8-35	RALF	Glicose	AMORIM et al. (2009)
40-67	RALF	Glicose	REIS e SILVA (2011)
12-53	RALF	Glicose	BARROS et al. (2011)
25-35	Leito Fixo	Sacarose	CHANG et al. (2002)
72	CSTR	Glicerol bruto	LO et al. (2013)
24,2	UASB	Glicerol bruto	REUNGSANG et al. (2013)
58-36	RALF	Glicerol	PRESENTE ESTUDO

Como pode-se observar a composição do biogás tem uma grande variabilidade, os reatores que utilizaram glicerol foram UASB e CSTR (REUNGSANG et al., 2013 e LO et al., 2013) utilizando como substrato glicerol bruto, o conteúdo de hidrogênio foi de 24,2% e 72%, respectivamente. Utilizando reatores RALF (AMORIM et al., 2009; REIS e SILVA., 2011; BARROS et al., 2011) e glicose como substrato, os autores obtiveram diferentes porcentagens de H₂ no biogás estando entre 8 e 35%, 40 e 67% e 12 e 53%, respectivamente. É notório que o conteúdo de hidrogênio no biogás é bastante variado e não segue um padrão nem em função do tipo de reator, nem em relação ao substrato.

O reator RALF em estudo teve um decréscimo no conteúdo de hidrogênio, muito provavelmente pela mudança do metabolismo consórcio microbiano ou pela seleção de

microrganismos em diferentes TDH. O valor de H₂ no biogás (58%) foi maior que a maioria dos trabalhos relatados, até mesmo para reatores com glicose. Isso comprova que o glicerol utilizado é um substrato em potencial para a produção de H₂.

5.1.5 – Produtividade Volumétrica de Hidrogênio

A Figura 5.5 representa a produção volumétrica de hidrogênio dos TDH do reator RALF.

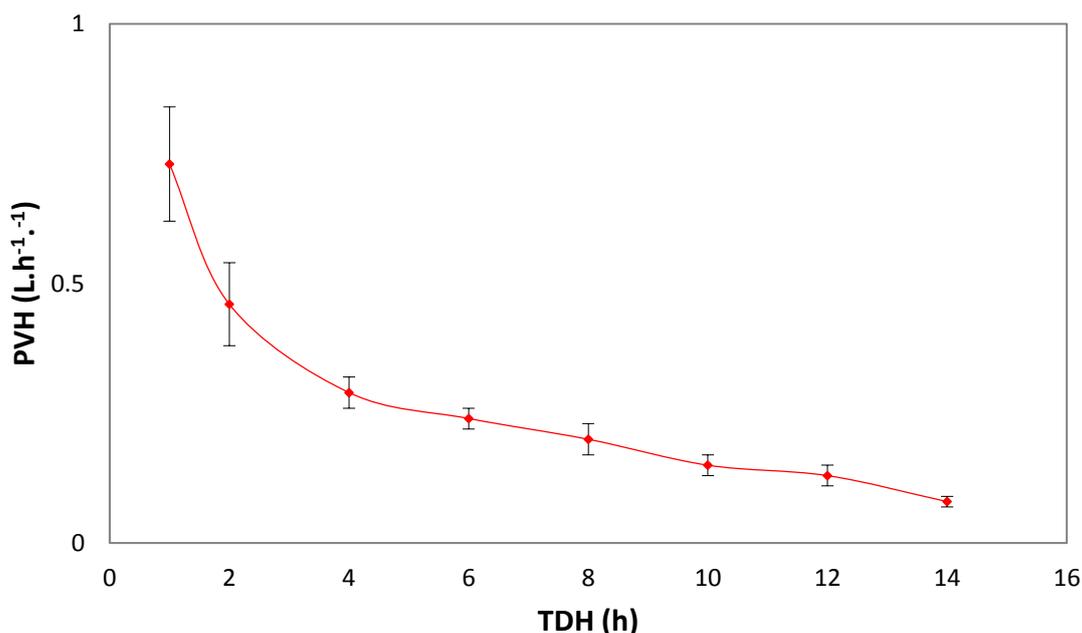


Figura 5. 5 – Produtividade volumétrica de hidrogênio no reator RALF.

Como se pode notar, com a diminuição do TDH houve um aumento na produção volumétrica de hidrogênio, tendo a maior produtividade no TDH de 1 hora. Para os TDH empregados de forma decrescente os valores medidos foram 0,08, 0,13, 0,15, 0,20, 0,24, 0,29, 0,46 e 0,73 L.h⁻¹.L⁻¹. Para se diminuir o TDH é necessário o aumento da vazão de entrada, conseqüentemente com o aumento da vazão uma quantidade maior de glicerol é liberada no reator, sendo assim existe uma maior quantidade de substrato para ser convertido em hidrogênio. Isso pode ser uma das explicações para o aumento na produção de H₂.

LO et al. (2013) utilizando glicerol bruto em um TDH de 12 horas obtiveram produtividade de hidrogênio de 0,166L.h⁻¹.L⁻¹ operando um reator CSTR. O valor

encontrado pelos autores é semelhante aos valores obtidos neste trabalho para os TDH de 10 e 8 horas.

Poucos trabalhos reportam a produção contínua de H₂ com glicerol, por isso alguns reatores em batelada são detalhados para melhor ilustrar os resultados obtidos neste experimento. Um deles é o trabalho realizado por SEIFERT et al. (2009) que operando reatores em batelada com temperatura de 37°C, pH 6 e concentração de 30 g.L⁻¹, obtiveram produtividade volumétrica máxima de 0,031 L.h⁻¹.L⁻¹.

SELEMMBO et al. (2009) estudando reatores em batelada para produção de hidrogênio e glicerol (3 g.L⁻¹), os autores reportaram produção máxima de 133 mL de H₂ para glicerol puro e 71 mL para glicerol bruto.

WU et al. (2011) estudaram a conversão de glicerol puro em hidrogênio e metabólitos variando o pH, temperatura e concentração com cultura pura de *Klebsiella* sp. HE1. Os autores obtiveram produtividade máxima de 11,76 mmol.h⁻¹.L⁻¹ com 50 g.L⁻¹ de concentração de substrato, temperatura de 50°C e pH 6.

KUMAR et al. (2012) avaliaram a produção de H₂ com glicerol a concentração de 10 g.L⁻¹, temperatura de 55°C e pH 8. A produtividade máxima de hidrogênio foi de 0,061 L.h⁻¹.L⁻¹.

VARRONE et al. (2013) realizaram experimentos em batelada para a produção de hidrogênio com glicerol. A temperatura foi controlada em 37°C, o pH inicial foi de 6,8 e concentração de glicerol bruto de 15 g.L⁻¹, nestas condições a produção volumétrica máxima foi de 0,13 L.h⁻¹.L⁻¹.

Comportamento semelhante foi observado no trabalho realizado por SHIDA et al. (2009) que operaram RALF contendo 2g.L⁻¹ de glicose como substrato. Estes autores variaram o TDH de 8 à 1 hora e observaram o aumento da produção volumétrica de H₂ a medida que o TDH diminuía, a maior produtividade foi também para o TDH de 1 hora com 1,15 L.h⁻¹.L⁻¹. Os autores justificaram que o aumento significativo foi devido ao fato de que com a diminuição do TDH ocorreu um aumento da taxa de carregamento orgânico, ou seja, uma maior quantidade de glicose estava entrando na alimentação do reator. Assim como a diminuição do TDH de 8 para 1 hora ocasionou a mudança no metabolismo e que a maioria do substrato foi canalizada para reações de produtos finais em vez de crescimento e manutenção microbiano, levando assim a um aumento na produção de hidrogênio. Resultados similares foram obtidos no presente estudo e por BARROS et al. (2010) que operaram dois reatores RALF, alimentados com 4g.L⁻¹ de glicose, um com argila expandida e outro com poliestireno como material suporte. Os

experimentos detectaram que com a diminuição do TDH, que variou de 8 à 1 hora, ocorria o aumento da produtividade de H_2 . Os valores máximos para o reator com argila expandida e poliestireno foram de 1,21 e 0,95 $L.h^{-1}.L^{-1}$ para o TDH de 1 hora, respectivamente. Os autores chegaram a conclusão de que a produção volumétrica de hidrogênio é influenciada pelo TDH e pela concentração de substrato.

Em se tratando de glicerol como substrato, o RALF estudado obteve os melhores resultados de produtividade volumétrica, entretanto reatores com glicose obtiveram melhores resultados com relação à produtividade.

5.1.6 – Rendimento de Hidrogênio

Na Figura 5.6 observa-se o rendimento de hidrogênio do reator RALF.

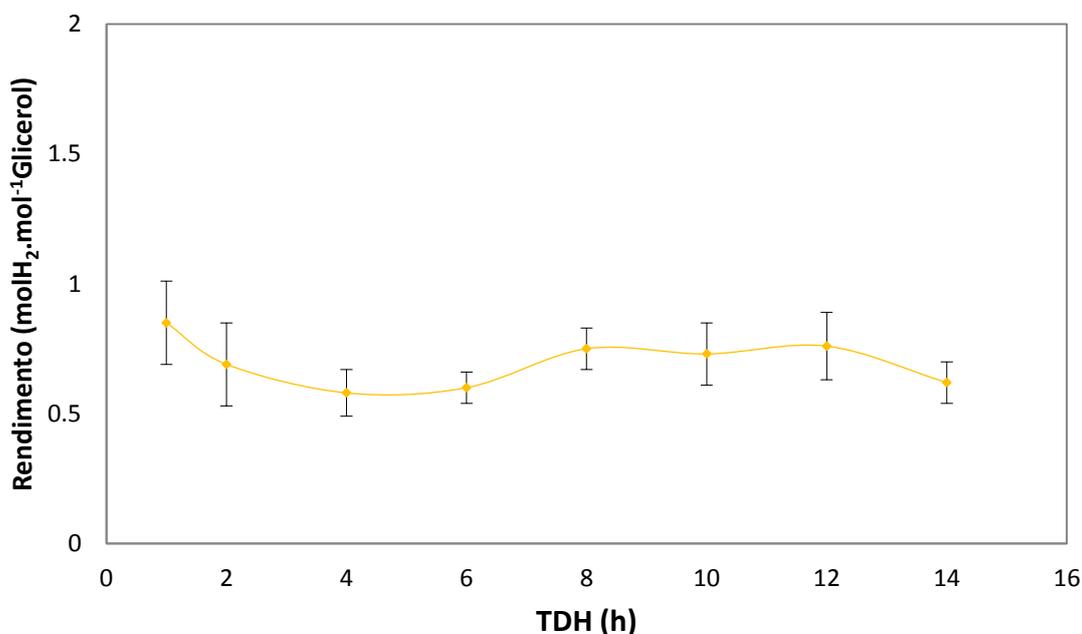


Figura 5. 6 – Rendimento de hidrogênio no reator RALF.

O rendimento de hidrogênio no reator RALF não teve alterações relevantes durante toda a operação do mesmo. Ou seja, o TDH não influenciou o valor do rendimento que foi de 0,62, 0,76, 0,73, 0,75, 0,60, 0,58, 0,69 e 0,85 para os TDH de 24, 20, 16, 12, 8, 4, 2 e 1 hora, respectivamente. Mesmo com valores similares o rendimento máximo ocorreu no TDH de 1 hora.

Um dos resultados que se assemelha ao reator RALF deste trabalho é o de LO et al. (2013), que operando CSTR em TDH de 14 horas, obtiveram rendimento de 0,5 e 0,77 molH₂.mol⁻¹Glicerol para glicerol puro e bruto, respectivamente.

São poucos trabalhos contínuos na literatura que utilizam glicerol como substrato, entretanto trabalhos em batelada demonstram muitas vezes comportamentos e resultados similares à de reator contínuo. ITO et al. (2005) estudando a produção de hidrogênio a partir de glicerol a concentração de 0,80mM, temperatura controlada em 37°C e pH não controlado, obteve rendimento de 0,89 molH₂.mol⁻¹Glicerol.

SEIFERT et al. (2009) operando reatores em batelada a temperatura de 37°C, pH 6 na concentração de 10 g.L⁻¹, obtiveram rendimento obtido foi de 0,41 molH₂.mol⁻¹Glicerol. Enquanto que SELEMBO et al. (2009) estudando também reatores em batelada e glicerol a 3 g.L⁻¹, relatam rendimentos máximos de 0,31 molH₂.mol⁻¹Glicerol.

KIVISTO et al. (2010) estudaram reatores em batelada para a produção de hidrogênio com glicerol em diferentes concentrações de 2,5, 5, 10 e 20 g.L⁻¹ e pH inicial 7. Os autores detectaram que o maior rendimento foi na menor concentração, obtendo rendimento máximo de 1,21 molH₂.mol⁻¹Glicerol.

NGO et al. (2011) estudando a produção biológica de H₂ com glicerol a 5 g.L⁻¹, temperatura de 75°C e pH 7,5, obtiveram rendimento máximo de hidrogênio foi de 1,28 molH₂.mol⁻¹Glicerol.

SÁ et al. (2013) utilizaram glicerol puro em reatores em batelada com concentração de 10g.L⁻¹, pH ajustado para 5,5 e agitação de 100 rpm, utilizando lodo obtido a partir de cultura mista proveniente de estação de tratamento de esgoto municipal, obtiveram rendimento de 0,8 molH₂.mol⁻¹Glicerol.

Apesar de trabalhar com substrato diferente SHIDA et al. (2009) observaram o mesmo comportamento no rendimento. Os autores operaram um reator RALF com 2 g.L⁻¹ de glicose, temperatura mantida a 30°C e pH 3,8 e variação do TDH de 8 à 1 hora. O rendimento se manteve entre 1,84 e 2,29 molH₂.mol⁻¹Glicose em todos os TDH.

É possível concluir que o reator RALF operado obteve rendimentos condizentes com a literatura e que os resultados para este reator que opera continuamente são satisfatórios, uma vez que reatores em batelada, com rendimentos maiores, possuem uma maior facilidade de manuseio e controle. Outra conclusão relevante é que o glicerol é um bom substrato para produção de hidrogênio, já que quase 1/3 do mesmo foi degradado durante quase toda a operação para produzir H₂.

5.1.7 – Produção de Metabólitos

Na Figura 5.7 estão demonstrados os metabólitos produzidos durante todas as fases do reator RALF nos diferentes TDH.

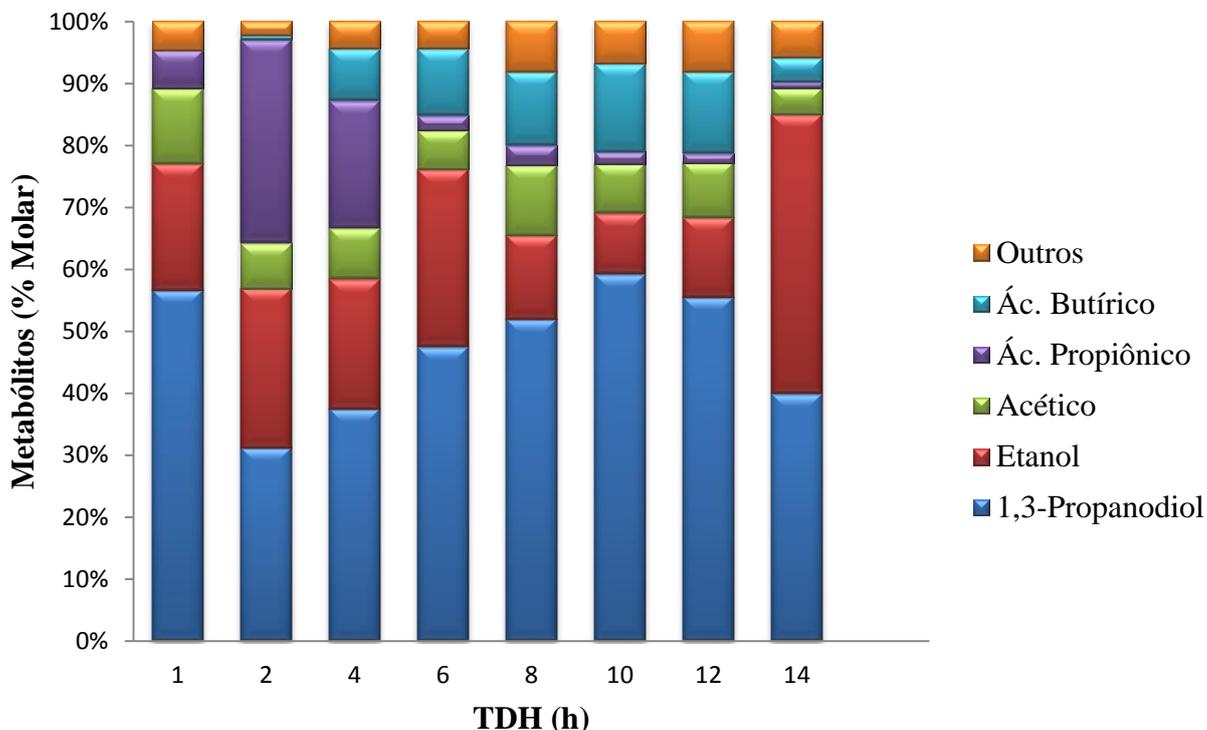


Figura 5. 7 – Metabólitos produzidos no RALF nos diferentes TDH.

Alguns metabólitos foram produzidos em maior quantidade como 1,3-propanodiol, etanol, ácido acético, ácido butírico e ácido propiônico. Entretanto outros ácidos também foram detectados em menor quantidade como ácido succínico, ácido láctico, ácido fórmico, ácido valérico, ácido capróico, ácido isovalérico e ácido isobutírico. Contudo estão últimos somados não chegam a 10% da porcentagem molar de todos os metabólitos produzidos e foram plotados na Figura 5.7 como outros.

A Figura 5.8 demonstra o comportamento dos principais metabólitos no decorrer da operação. Pode-se observar que a rota de produção do 1,3-propanodiol é concorrente com a rota de produção de ácido propiônico e etanol, uma vez que, à medida que a concentração destes aumenta, ocorre a diminuição da produção de 1,3-propanodiol e vice versa. As diferentes concentrações em cada fase são afetadas principalmente pelo

TDH, este deve portanto ser um dos parâmetros que mais afeta a predominância ou definição de uma rota a ser seguida pelos microrganismos. O TDH pode afetar as rotas, pois quando este varia provavelmente ocorre uma seleção natural de microrganismos dentro do reator.

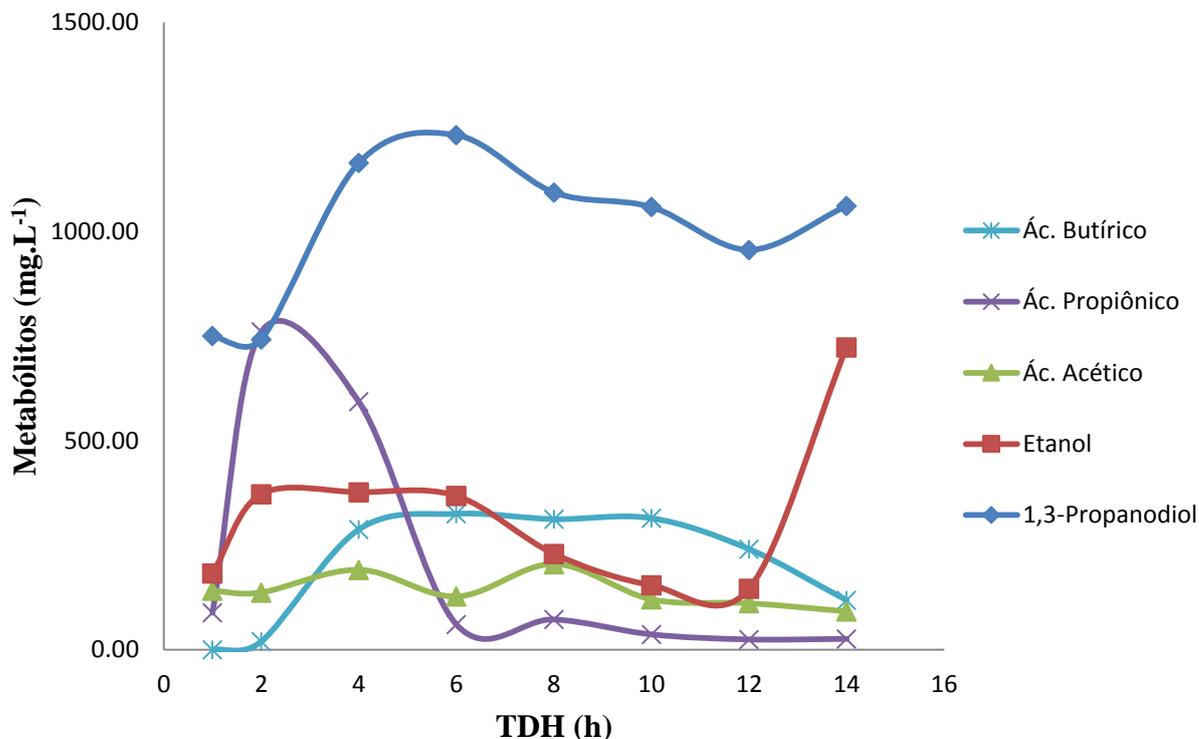


Figura 5. 8 – Concentração de metabólitos no reator RALF.

Na Tabela 5.2 podem ser observadas as concentrações molares de todos os metabólitos produzidos em todas as fases de operação do reator RALF. É possível notar que os ácidos succínico, láctico, fórmico, valérico, capróico, isolavérico e isobutírico representam individualmente menos que 3 %. Sendo assim pode-se concluir que as rotas para a produção destes foram pouco favorecidas nas fases de operação, enquanto que 1,3-propanodiol foi o metabólito com maior porcentagem molar em quase todas as fases, exceto na primeira. Conclui-se assim que a rota de formação deste metabólito foi altamente favorecida. Etanol e ácido acético mantiveram porcentagens que quase não mudaram durante a variação do TDH. Enquanto que o ácido propiônico manteve uma produção baixa até o TDH de 6 horas e no TDH de 4 horas a produção aumentou atingindo o máximo no TDH de 2 horas, voltando a diminuir novamente no TDH de 1 hora. O ácido butírico teve uma produção relevante apenas entre as fases 2 e 6.

Tabela 5. 2 – Porcentagem molar (% Molar) dos metabólitos produzidos no reator RALF.

Fase	1,3-Propanodiol	Etanol	Acético	Ác. Propiônico	Ác. Butírico	Ác. Succínico	Ác. Lático	Ác. Fórmico	Ác. Valérico	Ác. Capróico	Ác. Isovalérico	Ác. Isobutírico
1	39,98	45,02	4,38	0,99	3,85	1,72	2,22	1,19	0,33	0,33	0,00	0,00
2	56,26	14,17	8,29	1,48	12,24	1,31	1,28	2,17	0,82	1,13	0,85	0,00
3	55,60	13,37	8,01	1,97	14,28	0,78	1,77	1,18	0,47	2,05	0,00	0,53
4	48,35	16,74	11,49	3,28	11,93	0,38	2,05	0,88	0,46	2,09	0,00	2,34
5	50,15	24,76	6,57	2,53	11,45	0,00	0,67	0,00	0,46	0,58	0,73	2,10
6	38,62	20,64	8,04	20,22	8,25	0,00	0,84	0,00	0,82	0,00	0,69	1,89
7	31,18	25,81	7,28	32,83	0,71	0,73	0,59	0,00	0,86	0,00	0,00	0,00
8	54,01	21,71	12,87	6,53	0,00	1,16	1,64	0,00	0,00	0,00	0,00	2,08

Para uma representação quantitativa estão expostas na Tabela 5.3 as concentrações em mg.L^{-1} de todos os metabólitos produzidos no reator RALF, durante todas as fases de operação.

Tabela 5. 3 – Concentrações (mg.L-1) dos metabólitos do reator RALF

Fase	1,3-Propanodiol	Etanol	Acético	Propiônico	Butírico	Succínico	Lático	Fórmico	Valérico	Capróico	Ácido Isovalérico	Ácido Isobutírico
1	1060,88	723,17	91,58	25,68	118,29	70,78	69,54	19,03	11,62	13,55	0,00	0,00
2	956,00	145,80	111,04	24,45	240,54	34,50	25,80	22,30	18,70	29,40	19,28	0,00
3	1058,30	154,00	120,19	36,45	314,32	23,10	39,90	13,60	11,88	59,44	0,00	11,71
4	1093,30	229,20	204,81	72,23	312,01	13,40	54,90	12,00	13,91	72,16	0,00	61,17
5	1230,25	367,60	127,10	60,30	324,91	0,00	19,36	0,00	15,28	21,62	23,99	59,54
6	1163,75	376,50	190,98	592,68	287,41	0,00	29,91	0,00	33,22	0,00	27,90	65,83
7	742,08	371,80	136,71	759,95	19,50	27,10	16,62	0,00	27,34	0,00	0,00	0,00
8	750,00	182,50	140,95	88,22	0,00	24,96	27,00	0,00	0,00	0,00	0,00	33,35

Trabalhos com glicerol para produção de hidrogênio relatam a produção de muitos metabólitos, um deles é o de LO et al. (2013) que operando CSTR, com 10g.L^{-1} de glicerol bruto, TDH de 12 horas e 35°C de temperatura, encontraram nos de metabólitos totais 1,3-propanodiol (23,5%), butanol (23,5%) e ácido acético (4,1%), ácido butírico (16,6%) e ácido láctico (14,9%).

Outro parâmetro para avaliar a utilização do glicerol é o rendimento, este está detalhado na tabela 5.4 onde podem ser constatados os rendimentos para o hidrogênio, 1,3-propanodiol, ácido propiônico e etanol.

Tabela 5. 4 – Rendimento de alguns metabólitos a partir do glicerol.

Fase	TDH (h)	(molProduto.mol ⁻¹ Glicerol)			
		H ₂	1,3-propanodiol	Ác. Propiônico	Etanol
1	14	0,62	0,42	0,01	0,47
2	12	0,76	0,38	0,01	0,09
3	10	0,73	0,39	0,01	0,09
4	8	0,75	0,41	0,03	0,14
5	6	0,6	0,42	0,02	0,21
6	4	0,58	0,41	0,22	0,22
7	2	0,69	0,60	0,63	0,49
8	1	0,85	0,66	0,08	0,26

É possível observar altos rendimentos de metabólitos e de hidrogênio numa mesma fase como é o caso da fase 7, onde foi operado o TDH de 2 horas. O rendimento teórico de hidrogênio, 1,3-propanodiol, ácido propiônico e etanol é 3, 1, 1 e 1, respectivamente. Esses rendimento se somados ultrapassam o valor teórico. Entretanto esses altos rendimentos podem ser explicados, devido ao fato de que o glicerol utilizado no experimento é bruto, ou seja, outras substâncias presentes, podem ser utilizadas como substrato para produção de hidrogênio e metabólitos.

O aumento no rendimento do etanol nas últimas fases pode ser a explicação para o aumento da produção volumétrica de hidrogênio, uma vez que ao produzir uma molécula de etanol há também a produção de uma molécula de H₂ (ZENG, 1995).

SELEMBO et al. (2009), aplicaram glicerol puro e bruto com concentração de 3g.L^{-1} e cultura mista para produção de hidrogênio e 1,3 propanodiol. A quantidade de 1,3-propanodiol produzida para o glicerol puro e bruto foi de aproximadamente 22 e 14

mM, respectivamente e o rendimento foi de $0,69 \text{ mol}_{1,3\text{-PD}} \cdot \text{mol}^{-1} \text{Glicerol}$ para o glicerol puro e $0,59 \text{ mol}_{1,3\text{-PD}} \cdot \text{mol}^{-1} \text{Glicerol}$ para o glicerol bruto.

SEIFERT et al. (2009) estudaram utilizando reatores em batelada com temperatura de 37°C e pH inicial de 6 (como a concentração de glicerol influencia na produção de hidrogênio). O lodo utilizado foi oriundo do esgoto municipal tratado termicamente e as concentrações de glicerol utilizadas foram 5, 10 e $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Os autores detectaram além de hidrogênio, ácido láctico, 1,3-propanodiol, ácido acético, etanol e ácido butírico. O metabólito com maior produção foi o 1,3-propanodiol que aumentou a medida que a concentração de glicerol aumentava chegando à concentração de $7,7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ para a concentração de $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

KOŠMIDER et al. (2010) estudaram a produção de ácido propiônico com glicerol puro e bruto em concentração de $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Os autores obtiveram para o glicerol puro e bruto produções máximas de $13,75$ e $11,16 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, respectivamente e rendimentos de $0,84$ e $0,7 \text{ mol}_{\text{Ác. Propiônico}} \cdot \text{mol}^{-1} \text{Glicerol}$ para glicerol puro e bruto, respectivamente.

KUMAR et al. (2012) operaram reatores em batelada para a produção de hidrogênio a partir de glicerol ($10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), a 55°C e pH inicial 8. Os metabólitos detectados foram etanol, ácido propiônico, n-butanol e ácido acético, este foi reportado em maior concentração de $1.612 \text{ mgDQO} \cdot \text{L}^{-1}$.

MARU et al. (2013) estudando a produção de H_2 a partir do glicerol $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, com microrganismo *Enterobacter* spH1 chegou a atingir rendimento para hidrogênio e etanol de $0,85 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}^{-1} \text{Glicerol}$ e $0,96 \text{ mol}_{\text{Etanol}} \cdot \text{mol}^{-1} \text{Glicerol}$, respectivamente. E com microrganismo *Citrobacter freundii* H3 atingiu rendimentos simultâneos de hidrogênio, etanol e 1,3-propanodiol de $0,94 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}^{-1} \text{Glicerol}$, $0,31 \text{ mol}_{\text{Etanol}} \cdot \text{mol}^{-1} \text{Glicerol}$ e $0,34 \text{ mol}_{1,3\text{-PD}} \cdot \text{mol}^{-1} \text{Glicerol}$, respectivamente.

VARRONE et al. (2013) com reatores em batelada a 37°C , pH 6,8 e concentração de substrato de $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, os autores detectaram nos metabólitos ácido láctico, ácido succínico, ácido fórmico, ácido acético, ácido propiônico, etanol e 1,3-propanodiol, dentre estes a maior produção foi de etanol com 127 mM e rendimento de $0,78 \text{ mol}_{\text{Etanol}} \cdot \text{mol}^{-1} \text{Glicerol}$.

É possível observar que em todos os trabalhos reportados há produção simultânea de diversos metabólitos com a de hidrogênio. Isso pode ser explicado pela existência de uma cultura mista, que dependendo das condições como a quantidade de substrato disponível e parâmetros aplicados no reator pode ocasionar uma mudança da

rota metabólita. Um melhor esclarecimento destas produções seria através da análise que detecta qual a concentração microbiana predominante no interior do reator em cada fase.

5.1.8 – Balanço de DQO

Na Tabela 5.5 está ilustrado o balanço de DQO das substâncias detectadas nas análises, o balanço foi realizado a partir da DQO teórica das substâncias e da DQO medida no efluente. É possível notar que existe uma diferença entre a DQO medida e a DQO teórica, muito possivelmente devido ao fato de existirem metabólitos não detectados, os quais deveriam ser levados em consideração no cálculo.

Tabela 5. 5– Balanço de DQO do reator RALF em todas as fases de operação.

Fase	TDH (h)	DQO (mg.L ⁻¹)									Diferença de DQO	% Dif	
		1,3-Propanodiol	Etanol	Ác. Acético	Ác. Propiônico	Ácido Butírico	Outros metabólitos detectados *	Glicerol Efluente	SSV	DQO total			DQO medida
1	14	1784,60	1005,92	97,62	38,85	215,06	193,65	532,64	1217,17	5085,51	5933,64	848,13	14,29
2	12	1608,18	202,81	118,37	36,99	437,29	193,24	736,79	887,87	4221,55	5809,72	1588,17	27,34
3	10	1780,27	214,21	128,12	55,15	571,43	211,96	826,18	959,34	4746,67	6461,34	1714,66	26,54
4	8	1839,15	318,82	218,32	109,28	567,23	332,96	603,26	996,07	4985,08	6272,22	1287,14	20,52
5	6	2069,53	511,33	135,49	91,23	590,68	243,88	481,00	945,44	5068,58	6524,20	1455,61	22,31
6	4	1957,66	523,71	203,58	896,73	522,52	275,48	593,96	1251,23	6224,86	6258,48	33,62	0,54
7	2	1248,33	517,17	145,73	1149,80	35,45	98,91	2655,89	1334,26	7185,54	6756,35	-429,19	-6,35
8	1	1261,65	253,86	150,25	133,48	0,00	112,99	2946,48	1186,64	6045,34	7087,85	1042,50	14,71

* Ácidos succínico, láctico, fórmico, valérico, capróico, isovalérico e isobutírico.

5.2 – Reator EGSB

5.2.1 – Consumo de Glicerol

A Figura 5.9 traz os valores de consumo de glicerol para o reator EGSB em todos os TDH utilizados na operação do reator.

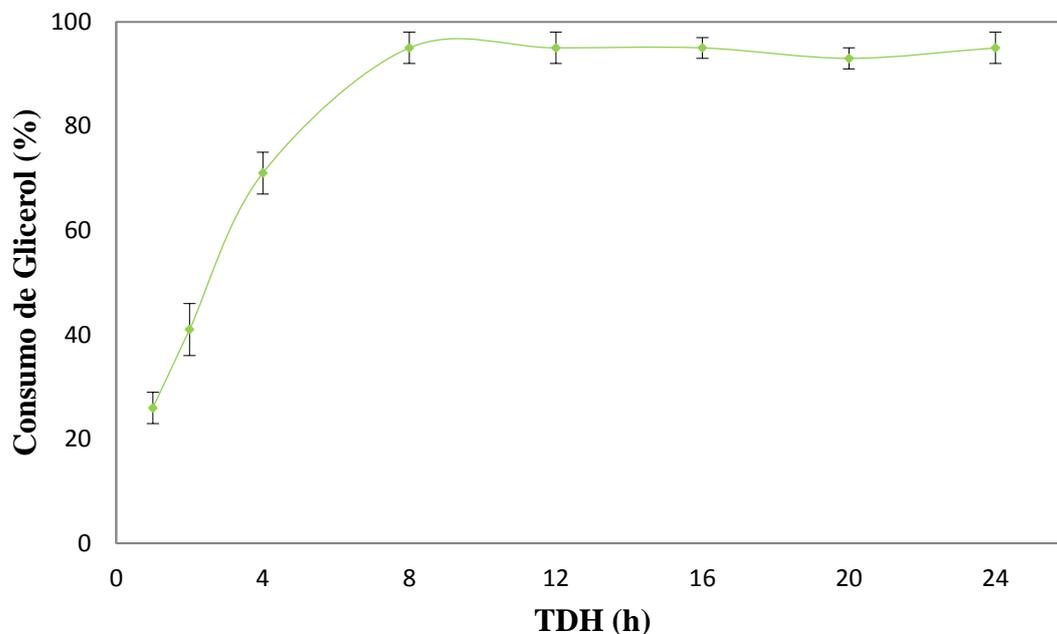


Figura 5. 9 – Consumo de glicerol do reator EGSB em todas as fases de operação.

Neste reator o consumo do substrato ocorreu de maneira constante para os TDH de 24 à 8 horas, com os respectivos valores de 95, 93, 95, 95 e 95%. Com a diminuição do TDH ocorreu uma diminuição no consumo de glicerol, na mudança do TDH para 4 e 2 horas o consumo foi de 71 e 41%, obtendo-se o menor valor no TDH de 1 hora com apenas 26% de substrato consumido. Essa diminuição na degradação do glicerol se deve provavelmente ao fato de que o tempo de detenção do mesmo, dentro do reator, não é suficiente para que o microrganismo o consuma em grande quantidade.

Os altos valores de consumo de substrato estão de acordo com resultados encontrados em literatura. Elevados consumos de glicerol também foram constatados em reator contínuo por REUNGSANG et al. (2013) que utilizaram um reator UASB e glicerol bruto para a produção de H₂. Obtiveram consumo de glicerol de 99,6% para uma concentração de 10 g.L⁻¹ em um TDH de 24h.

Poucos trabalhos contínuos relatam a utilização de glicerol como substrato. Por isso para elucidar e comparar o trabalho estudado, também são detalhados trabalhos em batelada como o realizado por SEIFERT et al. (2009) que utilizando glicerol a 10g.L^{-1} , temperatura de 37°C e pH inicial de 6, obteve consumo de glicerol de aproximadamente 100%.

Enquanto que KIVISTO et al. (2010) utilizando $2,5\text{g.L}^{-1}$ de glicerol para a produção de biohidrogênio com pH inicial de 7 e culturas puras obteve máximo consumo de substrato de 38%.

WU et al. (2011) operaram reatores em batelada com glicerol em diferentes concentrações, temperaturas e pH. Para todos os experimentos o consumo de glicerol variou entre 91,5 e 99,9 %.

Alguns reatores contínuos são reportados em literatura, entretanto com outro tipo de substrato como BARROS et al (2012) que operando RALF com $3,5\text{g.L}^{-1}$ obtiveram comportamento similar na conversão de glicose que de 91% foi para 60% com a diminuição do TDH de 8 para 1 hora.

Isso também foi constatado por BARROS et al. (2011) que operando reator RALF com 4g.L^{-1} de glicose obteve consumo do substrato de 90% para TDH de 8 e 6 horas, com a diminuição do TDH para 4, 2 e 1 hora, observou-se a redução da eficiência da remoção de glicose para 85, 71 e 60%, respectivamente.

Em comparação com a literatura o reator EGSB utilizado neste trabalho apresenta valores de consumo de substrato semelhantes aos da literatura, assim como comportamento ao se diminuir o TDH e conseqüentemente também diminuir o consumo de substrato. Com base nos resultados obtidos pode-se afirmar que o melhor TDH a ser empregado para degradar o glicerol é o de 8 horas, uma vez que neste TDH uma maior quantidade de substrato é consumida, em um menor intervalo de tempo.

5.2.2 – Remoção de DQO

A Figura 5.10 demonstra as remoções de DQO nos diferentes TDH empregados neste reator.

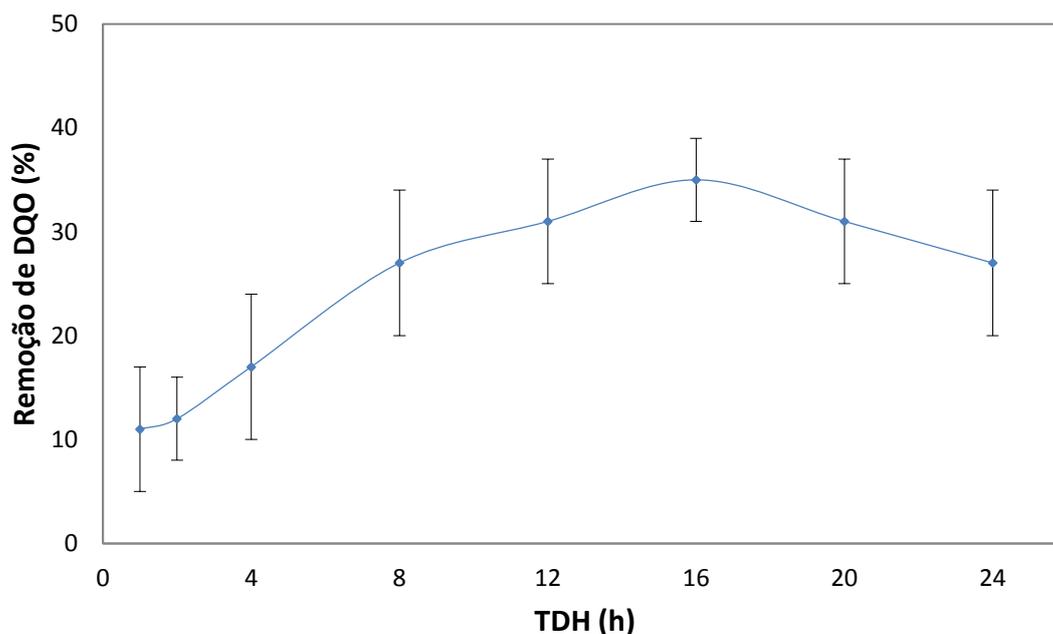


Figura 5. 10 – Remoção de DQO no reator EGSB nas diferentes fases.

A remoção de DQO no reator EGSB aumentou com a diminuição do TDH de 24, 20 e 16 horas para os valores de 27, 31 e 35%, respectivamente. Nos TDH de 12, 8, 4, 2 e 1 hora a remoção de DQO diminuiu para 31, 27, 17, 12 e 11%, respectivamente. A diminuição do consumo de glicerol, ocorre conseqüentemente com a diminuição na remoção de DQO.

Fato semelhante foi verificado no trabalho realizado por GUO et al. (2008b) que estudaram um reator EGSB com amido como substrato para produção de hidrogênio. Os autores concluíram que a melhor remoção de DQO aconteceu em um TDH de 24 horas, com valor máximo de 31%, enquanto que para TDH menores a remoção ficou em torno de 20%.

SINGH et al. (2013) utilizando reator UASB para a produção de hidrogênio com diferentes TDH (32, 24, 16 e 8 horas) e alimentado com efluente de fábrica de óleo de palma a concentração de 20gDQO.L⁻¹. Observaram que a remoção de DQO se manteve constante em 62 %, mesmo com a diminuição do TDH.

A baixa remoção de DQO do reator EGSB em estudo é esperada, uma vez que reatores que produzem hidrogênio convertem boa parte do substrato em metabólitos que são contabilizados na DQO.

5.2.3 – pH

A Figura 5.11 mostra a variação do pH do afluente e do efluente em todas as fases do reator EGSB.

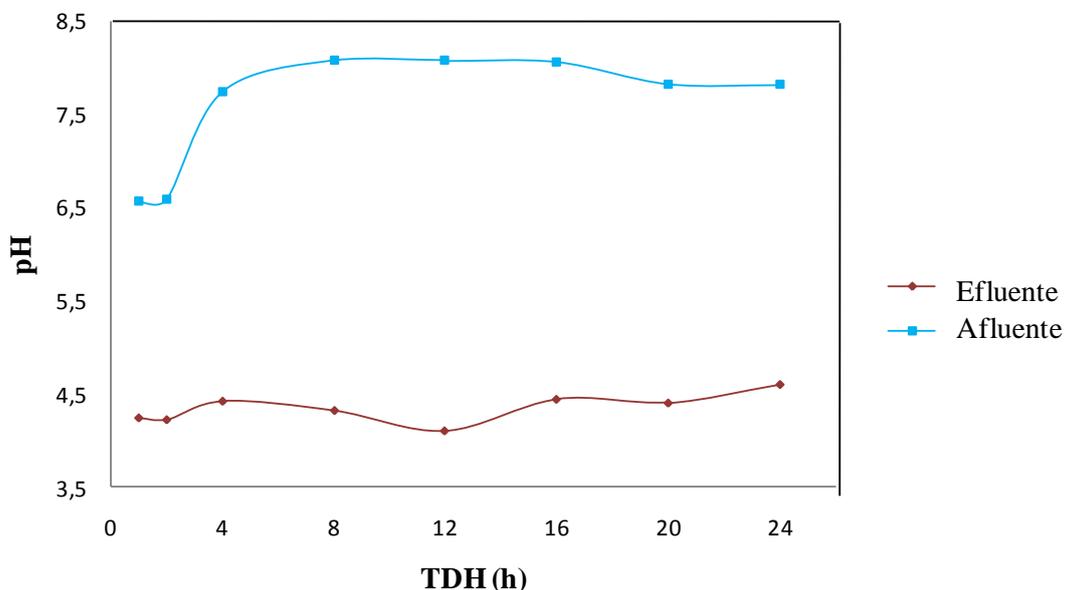


Figura 5. 11 – pH do afluente e do efluente do reator EGSB.

O pH do efluente se manteve entre 4 e 5 durante toda a operação do reator e é possível notar que o afluente só necessitou de uma intervenção nos TDH de 2 e 1 hora, ainda assim a entrada se manteve sempre acima de 6,5. Conclui-se então que houve a produção de ácidos em todas as fases do reator, já que a diferença de pH da entrada e da saída do reator é relativamente elevada. E que os microrganismos responsáveis por essas produções se adequaram as adversidades do meio reacional.

Um trabalho que relata pH baixo é o de GUO et al. (2008a) onde os autores estudaram um reator EGSB e melão contido em água residuária como substrato, obtiveram produção de hidrogênio em pH que variaram de 5,33 e 3,88. Porém, os valores máximos foram contabilizados para pH entre 4,2 e 4,4. A maior produtividade volumétrica conseguida no estudo foi de $0,71 \text{ L.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$.

GUO et al. (2008b) também constaram que a produção de H_2 em reator EGSB e amido como substrato foi possível em pH baixo, uma vez que o pH de operação foi de 4,42. Os autores sugerem que este fato pode estar associada a variável de microrganismos presentes no inóculo. E ainda concluem pelo estudo realizado que

algumas bactérias tolerantes a ácidos poderiam sobreviver e produzir ativamente H_2 mesmo com pH baixo, em torno de 3,95.

AMORIM et al. (2009) utilizando reator de leito fluidizado controlou o pH do efluente entre 3,68 e 4,05 utilizando glicose como fonte de substrato. Já SEIFERT et al. (2009) operaram reatores em batelada para a produção de hidrogênio com glicerol, temperatura de 37°C, e pH inicial 6. Ao final dos experimentos o pH atingiu valores de 4,8.

KIVISTO et al. (2010) operando reatores em batelada com glicerol como substrato e pH inicial de 7, obtiveram pH final de 5,7, enquanto que WU et al. (2011) operando reatores em batelada com glicerol a $70g.L^{-1}$, temperatura controlada em 35°C e pH inicial 6,6, no fim da operação o pH do meio reacional foi de 6,2.

REIS e SILVA (2011) estudaram RALF na produção de hidrogênio com glicose, mantendo o pH entre 4,5 e 5. E AGUILAR et al. (2013) mantiveram o reator de mistura perfeita com pH em torno de 5,5 para a produção de hidrogênio a fim de inibir o desenvolvimento das metanogênicas.

Pode-se então concluir que um meio reacional ácido é de extrema importância quando se trata de produção de hidrogênio, uma vez que todos os trabalhos citados mantiveram o pH ácido. Este meio ácido também tem a finalidade de manter fora do sistema operacional as metanogênicas, que consomem o hidrogênio produzido.

5.2.4 – Conteúdo de Hidrogênio no Biogás

Na Figura 5.12 está demonstrado o conteúdo de hidrogênio no biogás do reator EGSB.

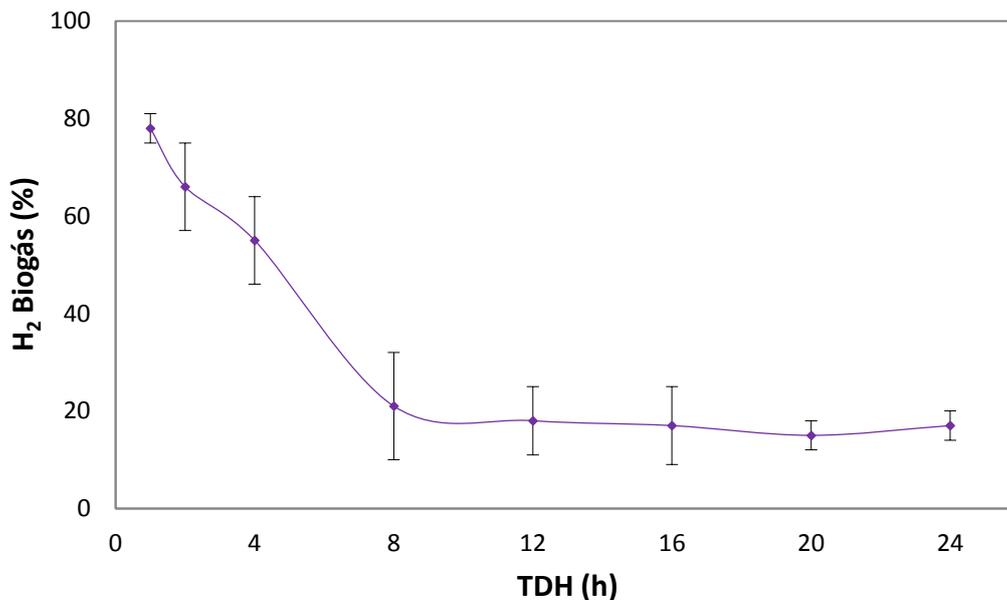


Figura 5. 12 – Conteúdo de hidrogênio no biogás do reator EGSB.

Como é notado na Figura 5.12 o conteúdo de hidrogênio no reator EGSB se manteve linear nos TDH de 24, 20, 16, 12 e 8 horas com 17, 15, 17, 18 e 21 %, respectivamente. Com a diminuição do TDH para 4, 2 e 1 hora o conteúdo de hidrogênio teve um grande aumento, atingido 55, 66 e 78%, respectivamente. Metano não foi detectado em nenhuma fase, isso se deve muito provavelmente ao fato do lodo ter sido submetido ao tratamento térmico, além do meio reacional ter sido mantido em pH baixo.

Comportamento semelhante foi verificado por BARROS et al. (2012) que trabalharam com três reatores RALF utilizando diferentes meio suporte (poliestireno, pneu triturado e polietileno) e 5g.L^{-1} de glicose como substrato. Estes autores observaram um aumento no conteúdo de hidrogênio no biogás de 33 para 51%, quando o TDH diminuiu de 8 para 1 hora, utilizando reator com poliestireno. Para os reatores com pneu triturado e polietileno variando o TDH de 8 para 2 horas, os autores obtiveram um aumento de hidrogênio no biogás de 46 para 61% e de 38 para 51%, respectivamente.

GUO et al. (2008a) estudaram a produção de hidrogênio em reator EGSB e melação como fonte de carbono. Os autores detectaram biogás composto apenas de H_2 e CO_2 , tendo o hidrogênio atingido valores entre 30 e 53%.

KUMAR et al. (2012) avaliaram a produção de hidrogênio com diferentes tipos de inóculo a partir de resíduos da produção de biodiesel em reatores em batelada com 10 g.L⁻¹. Os autores obtiveram conteúdo de hidrogênio máximo de 56,3%.

Enquanto que VARRONE et al. (2013) operando reatores em batelada com 15 g.L⁻¹, temperatura de 37°C e pH inicial de 6,8, obtiveram conteúdo de H₂ no biogás que variaram de 14 à 54%.

FERREIRA ROSA et al. (2013) estudaram dois reatores RALF, com TDH fixado em 6 horas e aumento gradativo de soro em relação a glicose como substrato em ambos reatores. A diferença existente nos reatores foi o inóculo, sendo lodo de tratamento de águas residuárias de suínos e aves. Os autores observaram que para o lodo de suíno o aumento de soro no substrato não afetou o conteúdo de hidrogênio no biogás que se manteve em torno de 18%. Contudo, para o lodo de aves, o aumento de soro no substrato favoreceu o aumento de H₂ no biogás, variando de 13,54% (com apenas 33% de soro) para 18,55% (com 100% de soro).

É possível concluir com os relatos da literatura, que o conteúdo de H₂ no biogás é bastante variado e não depende do tipo de substrato utilizado. O aumento de hidrogênio neste reator em estudo muito provavelmente ocorreu pela adaptação dos microrganismos produtores de hidrogênio e ou pela mudança no metabolismo dos mesmos, ocasionada pela mudança do TDH.

5.2.5 – Produtividade Volumétrica de Hidrogênio

Na Figura 5.13 é possível observar a produtividade volumétrica de hidrogênio no reator EGSB.

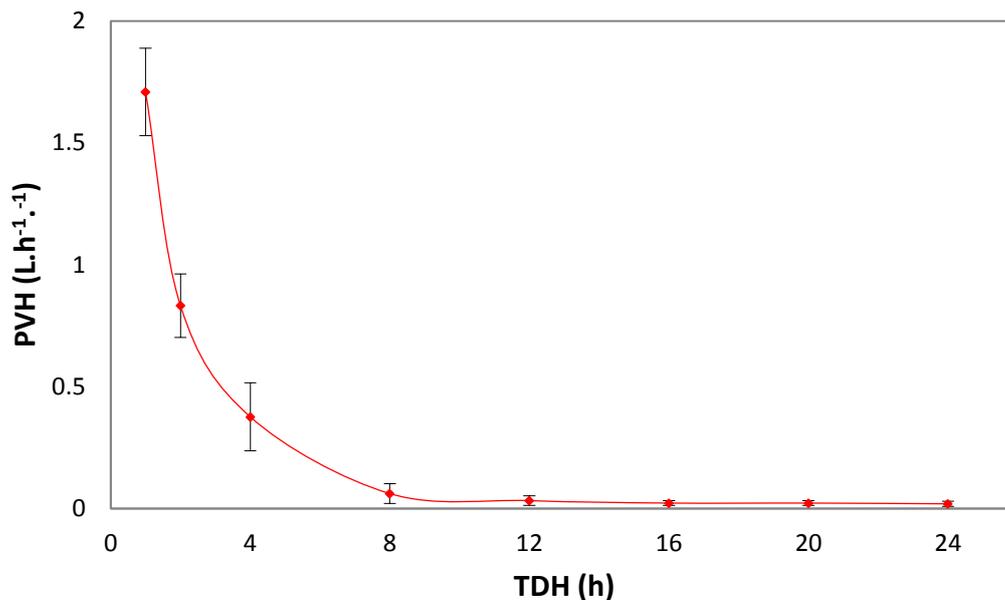


Figura 5.13 – Produtividade Volumétrica do reator EGSB.

É possível notar claramente que a produção de hidrogênio para os TDH de 24 à 8 horas não teve uma variação significativa, entretanto a partir do TDH de 8 à 1 hora, essa variação foi crescente, chegando ao valor máximo no TDH de 1 hora. Os valores de produtividade volumétrica dos TDH de 24 à 1 hora foram 0.019; 0.022; 0.022; 0.03; 0.06; 0.376; 0.832 e 1.709 L.h⁻¹.L⁻¹, respectivamente. Isso se deve muito provavelmente pelo fato de que com a diminuição do TDH ocorreu uma maior alimentação de glicerol no reator, disponibilizando assim uma maior quantidade de substrato a ser degradado.

ITO et al. (2005) estudando a produção de hidrogênio a partir de glicerol puro e bruto, com temperatura controlada em 37°C e pH não controlado, obtiveram produções volumétricas de 1,95 e 1,54 L.h⁻¹.L⁻¹ para glicerol puro e bruto, respectivamente.

Fato semelhante ao que ocorreu no reator EGSB aconteceu com AMORIM et al. (2009) com reator RALF e 2g.L⁻¹ de glicose. A medida que o TDH diminuía a produtividade volumétrica de hidrogênio aumentou de 0,08 L.h⁻¹.L⁻¹ no TDH de 8 horas para 0,97 L.h⁻¹.L⁻¹ no TDH de 1 hora. Os autores atribuíram este aumento, ao fato de que, há mudança no metabolismo dos microrganismos à medida que o TDH diminui e que a uma maior quantidade de glicose foi utilizada para produção de metabólitos que ocasionaram uma maior produção de H₂.

GUO et al. (2008) estudando EGSB com $1\text{gAmido.L}^{-1}\text{.h}^{-1}$, observaram o aumento da produção volumétrica de hidrogênio à medida que o TDH diminuía, obtendo valor máximo de aproximadamente $0,068\text{ L.h}^{-1}\text{.L}^{-1}$ de H_2 .

HU e WOOB (2010) utilizando reatores em batelada para a produção de hidrogênio com 10 g.L^{-1} de glicerol de substrato e adaptação de microrganismos, obtiveram produtividade volumétrica de H_2 de $0,68\text{ mmol.h}^{-1}\text{.L}^{-1}$.

BARROS et al. (2012) trabalharam com dois reatores RALF utilizando 2 materiais suporte (polietireno e PET) ambos com 4g.L^{-1} de glicose e variação do TDH de 8 à 1 hora. Nos dois reatores os autores observaram que com a diminuição do TDH ocorria o aumento na produção volumétrica de H_2 , que foi máxima para os dois reatores no TDH de 1 hora, sendo $0,52$ e $0,30\text{ L.h}^{-1}\text{.L}^{-1}$ para os reatores 1 e 2, respectivamente.

SITTIJUNDA e REUNGSANG (2012) estudaram a produção de hidrogênio a partir de 25 g.L^{-1} de glicerol, 35°C e pH inicial de 5,5, os autores obtiveram produtividade volumétrica de $1,37\text{ mmol.h}^{-1}\text{.L}^{-1}$.

REUNGSANG et al. (2013) operando reator UASB com TDH de 24 horas e glicerol puro e bruto obteve taxa de produção de hidrogênio de $0,22$ e $0,15\text{ L.h}^{-1}\text{.L}^{-1}$, respectivamente.

SINGH et al. (2013) operando reator UASB para produzir hidrogênio com água residuária de óleo de palma e variando o TDH de 32 à 8 horas, observaram que a produção volumétrica de hidrogênio seguiu a mesma linha deste estudo, ou seja, com a diminuição do TDH observaram o aumento na produtividade volumétrica de H_2 . O aumento foi de $0,215\text{ L.h}^{-1}\text{.L}^{-1}$ no TDH de 32 horas para $0,350\text{ L.h}^{-1}\text{.L}^{-1}$ no TDH de 8 horas. Os autores concluíram que o reator estudado por eles poderia produzir hidrogênio em TDH menores que o operado, e que TDH muito elevados, ocasionam a inibição de bactérias produtoras de hidrogênio devido a baixa concentração de substrato, pois ocorre uma mudança na população bacteriana para não produtoras de hidrogênio.

Comparando-se o presente estudo aos dados obtidos em literatura é possível concluir que o reator EGSB deste estudo é viável na produção de hidrogênio, uma vez que os dados obtidos são, em sua maioria, superiores aos reportados pela literatura utilizando o mesmo ou outro substrato.

5.2.6 – Rendimento de Hidrogênio

Na Figura 5.14 pode ser visualizado o rendimento de hidrogênio do reator EGSB em todas as fases de operação.

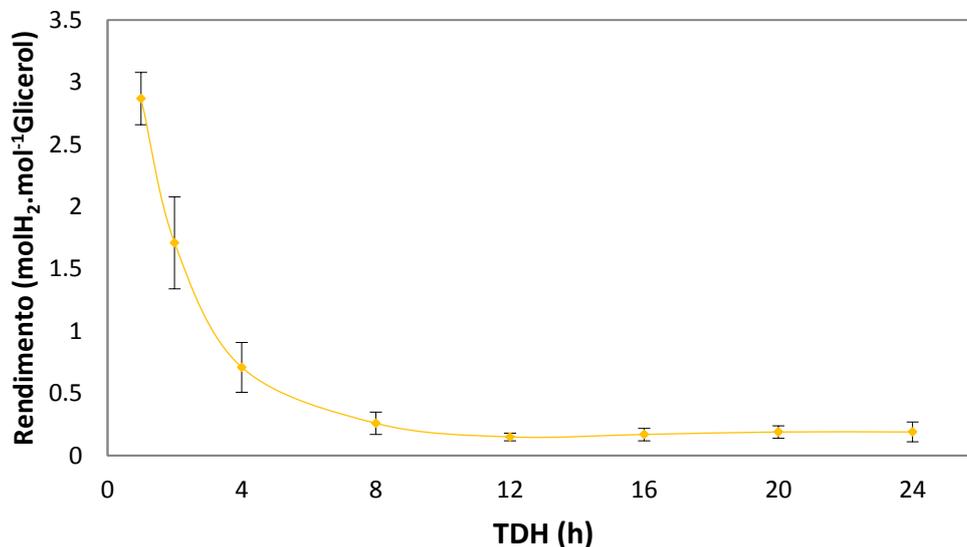


Figura 5. 14 – Rendimento de H₂ do reator EGSB em todas as fases de operação.

Como é observado na Figura 5.14 o rendimento de H₂ no reator EGSB se manteve linear até o TDH de 12 horas, entretanto a partir de 8 horas, à medida que o TDH diminuiu verificou-se aumento do rendimento de H₂. Nos TDH de 24, 20, 16 e 12 horas o rendimento de H₂ foram 0,19, 0,19, 0,17 e 0,15 molH₂.mol⁻¹Glicerol, respectivamente, ou seja, TDH relativamente elevados não alteraram o rendimento de hidrogênio no reator EGSB. Nos TDH de 8, 4, 2 e 1 hora os rendimentos obtidos foram 0,26, 0,71, 1,71 e 2,87 molH₂.mol⁻¹Glicerol, isso se deve ao fato de que a produção volumétrica de hidrogênio aumentou enquanto que o consumo de substrato diminuiu.

TEMUDO et al. (2008) operando reator CSTR para a produção de H₂ a partir de 4g.L⁻¹ de glicerol, TDH de 8 horas, temperatura de 30°C e pH 8, obtiveram rendimento de 0,05molH₂.mol⁻¹Glicerol. Enquanto que KIVISTO et al. (2010) estudando a produção de hidrogênio em bateladas com glicerol em diferentes concentração e dois tipos isolados de cultura, obtiveram rendimentos máximos de 0,58 molH₂.mol⁻¹Glicerol para *H. saccharolyticum* sub. *saccharolyticum* e 2,5g.L⁻¹ de concentração de glicerol e 1,21 molH₂.mol⁻¹Glicerol com *H. saccharolyticum* sub. *senegalensis* e 2,5g.L⁻¹ de substrato. Os autores fizeram experimentos para concentração de 2,5, 5,0, 10,0 e 20,0

g.L^{-1} e observaram que o rendimento de hidrogênio diminuía a medida que a concentração aumentava chegando a valores de $0,35 \text{ molH}_2.\text{mol}^{-1}\text{Glicerol}$ para concentração de 20.0 g.L^{-1} .

Por sua vez MANGAYIL et al. (2012) utilizando batelada com diferentes concentrações de glicerol bruto, pH 6,5 e temperatura de 40°C . Obtiveram na concentração de 1 g.L^{-1} de glicerol, rendimento máximo de $1,1 \text{ molH}_2.\text{mol}^{-1}\text{Glicerol}$.

WU et al. (2011) estudaram a conversão de glicerol puro em hidrogênio e metabólitos variando o pH, temperatura e concentração com cultura pura de *Klebsiella* sp. HE1. Os autores obtiveram produtividade máxima de $0,345 \text{ molH}_2.\text{mol}^{-1}\text{Glicerol}$ com 50 g.L^{-1} de concentração de substrato, temperatura de 50°C e pH 6.

REUNGSANG et al. (2013) obtiveram rendimento de $0,32 \text{ molH}_2.\text{mol}^{-1}\text{Glicerol}$ trabalhando com glicerol bruto e reator UASB com TDH de 24 horas. Este valor se assemelha bastante ao deste estudo para o TDH de 8 horas.

KIVISTO et al. (2013) operando reatores em batelada a 37°C e pH controlado em 7,4 com glicerol bruto (5g.L^{-1}), conseguiram rendimento de $3 \text{ molH}_2.\text{mol}^{-1}\text{Glicerol}$.

Apesar de utilizar outro tipo de substrato e reator AMORIM et al. (2009) operando reator RALF com glicose (2g.L^{-1}), temperatura de 30°C e TDH variado de 8 à 1 hora, obteve comportamento de rendimento semelhante ao reator EGSB empregado neste estudo. Os autores notaram que à medida que o TDH diminuía ocorria o aumento do rendimento de hidrogênio, que foi crescente até o TDH de 2 horas, no TDH de 1 hora houve uma redução. Os valores obtidos foram 1.41, 2.49 e 2.41 $\text{molH}_2.\text{mol}^{-1}\text{Glicose}$ para 8, 2 e 1 hora, respectivamente.

Outro trabalho similar ao de AMORIM et al. (2009) é o de BARROS et al. (2011) que operaram dois reatores RALF com 4g.L^{-1} de glicose e varia com o TDH de 8 à 1 hora. No primeiro reator com pneu triturado como meio suporte o rendimento aumentou até o TDH de 2 horas e diminui no TDH de 1 hora, o valor máximo obtido foi de $2,15 \text{ molH}_2.\text{mol}^{-1}\text{Glicose}$ para 2 horas e o mínimo $1,20 \text{ molH}_2.\text{mol}^{-1}\text{Glicose}$ para o TDH de 8 horas. O mesmo comportamento foi verificado no reator com PET como material suporte, obtendo máximo rendimento de $1,87 \text{ molH}_2.\text{mol}^{-1}\text{Glicose}$ no TDH de 2 horas e mínimo de $1,14 \text{ molH}_2.\text{mol}^{-1}\text{Glicose}$ para o TDH de 8 horas.

Pode-se concluir que o reator EGSB operado teve valores ótimos de rendimento principalmente nos TDH de 2 e 1 hora, entretanto nestes TDH o consumo de glicerol foi menor (41 e 26%, respectivamente). Ou seja, o glicerol não foi degradado totalmente,

mas houve por sua vez uma melhor utilização do substrato para a produção de hidrogênio.

5.2.7 – Produção de Metabólitos

A Figura 5.15 detalha a porcentagem molar dos metabólitos produzidos no reator EGSB, durante a operação do reator.

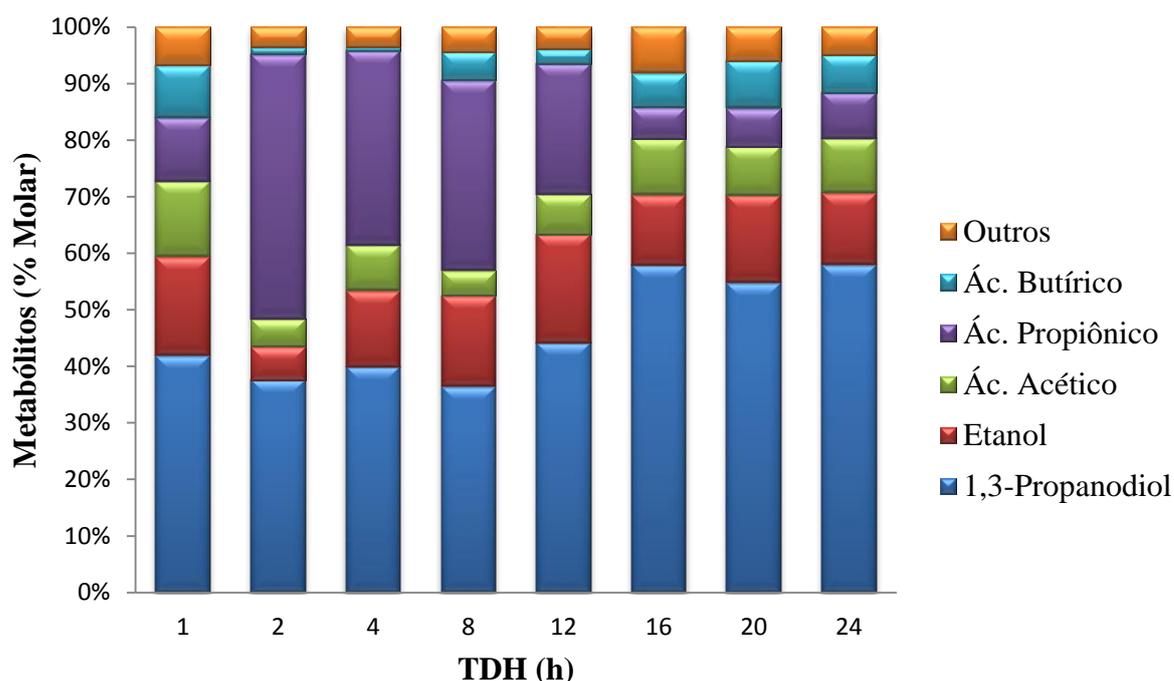


Figura 5.15 – Produção de metabólitos do reator EGSB.

Como pode ser observado na Figura 5.15 houve produção de 1,3-propanodiol, etanol e ácido acético, ácido propiônico e ácido butírico, em maiores quantidades. Entretanto também ocorreu a produção de ácido succínico, ácido lático, ácido fórmico, ácido capróico, ácido isobutírico, ácido valérico e ácido isovalérico em menores quantidades. Na Tabela 5.2 para melhor elucidar os outros ácidos detectados podem ser constados as porcentagens de cada metabólito produzido. E na Tabela 5.7 são demonstradas as concentrações (mg.L^{-1}) dos metabólitos produzidos.

Tabela 5. 6 – Porcentagem molar (% Molar) dos metabólitos do reator EGSB.

Fase	1,3-Propanodiol	Etanol	Acético	Propiônico	Butírico	Succínico	Lático	Fórmico	Valérico	Capróico	Ácido Isovalérico	Ácido Isobutírico
1	57,98	12,65	9,64	8,15	6,71	0,66	0,93	1,22	0,63	0,53	0,00	0,91
2	54,77	15,44	8,70	6,73	8,43	0,57	0,00	1,07	1,03	2,52	0,00	0,75
3	57,88	12,41	10,03	5,52	5,97	0,39	0,87	0,54	1,68	3,76	0,00	0,96
4	44,17	19,17	7,08	23,16	2,57	0,34	0,29	0,32	1,27	0,38	0,78	0,49
5	36,43	16,07	4,43	33,63	5,06	0,30	0,30	0,00	1,90	0,21	0,59	1,09
6	39,93	13,42	8,09	34,40	0,60	0,52	0,93	0,51	0,70	0,00	0,92	0,00
7	37,58	5,88	4,86	46,88	1,26	0,76	0,68	0,00	0,74	0,00	0,51	0,86
8	30,29	12,65	9,64	8,15	6,71	0,66	0,93	1,22	0,63	0,53	0,00	0,91

Tabela 5. 7 – Concentração (mg.L⁻¹) dos metabólitos do reator EGSB.

Fase	1,3-Propanodiol	Etanol	Ác. Acético	Ác. Propiônico	Ác. Butírico	Ác. Succínico	Ác. Lático	Ác. Fórmico	Ác. Valérico	Ác. Capróico	Ác. Isovalérico	Ác. Isobutírico
1	1363,25	180,10	178,69	186,38	182,37	24,08	25,76	17,27	19,91	18,86	0,00	24,64
2	1395,08	238,00	174,66	166,64	248,20	22,58	0,00	16,48	35,19	97,77	0,00	22,15
3	1606,80	208,50	219,63	149,16	191,60	16,90	28,62	9,10	62,41	158,97	0,00	30,70
4	1526,17	400,83	192,77	778,14	102,52	18,18	11,67	6,73	58,76	19,84	36,06	19,77
5	1198,33	320,00	114,82	1075,87	192,58	15,18	11,85	0,00	84,04	10,40	25,98	41,37
6	1118,50	227,50	178,72	937,18	19,33	22,38	30,70	8,56	26,31	0,00	34,51	0,00
7	711,66	67,40	72,57	863,46	27,58	22,31	15,14	0,00	18,75	0,00	12,90	18,83
8	486,88	289,38	27,62	544,34	16,77	19,29	14,92	0,00	10,62	0,00	0,00	0,00

É possível observar que o 1,3-propanodiol teve uma produção elevada durante todo o período de operação do reator, enquanto que o etanol teve um aumento na produção até a fase 4 (TDH 12 horas) e diminuiu até a fase 8 (THD 1 hora) onde aumentou novamente. O ácido acético apresentou comportamento semelhante ao do etanol com aumento gradativo da concentração até a fase 3 (TDH 16 horas) e diminuição também gradativa até a fase 8 (TDH 1 hora). O ácido propiônico teve

comparativamente entre as fases operadas, produções muito elevadas nas fases 4, 5, 6 e 7 (TDH 12, 8, 4 e 2 horas, respectivamente), na fase 8 (TDH 1 hora), houve a diminuição da concentração embora tenha sido o metabólito com maior produção nesta fase. O ácido butírico teve produções médias entre as fases 1 e 5 (TDH 24 e 8 horas), porém nas fases subsequentes a produção deste metabólico foi muito baixa. Esta variação na produção dos metabólitos se deve ao fato de que com a diminuição do TDH, pode ocorrer a seleção e adaptação de microrganismos no interior do reator, com isso dependendo da predominância de uma espécie, ocorre o favorecimento da rota de produção de um metabólito específico.

Na Figura 5.16 nota-se o comportamento e a concentração dos principais metabólitos no decorrer da operação do reator EGSB.

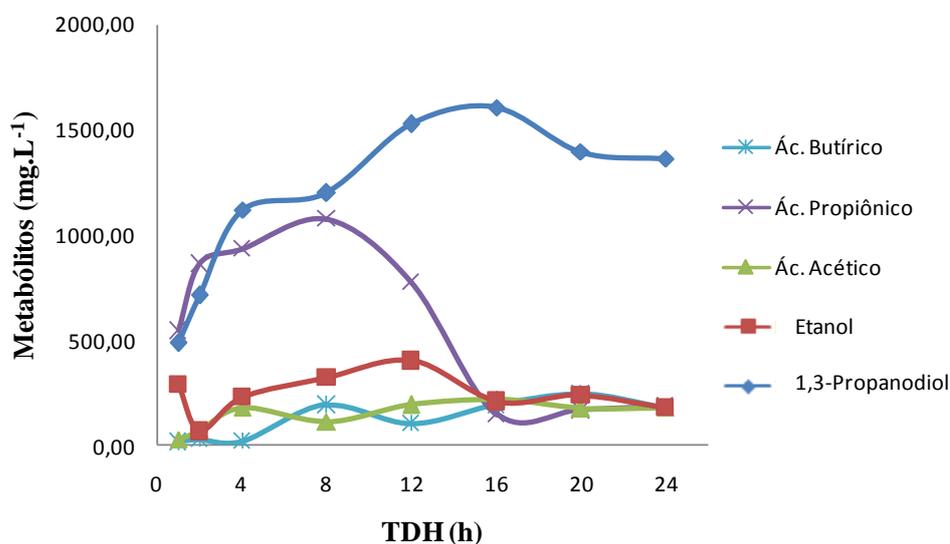


Figura 5. 16 – Concentração (mg.L-1) dos metabólitos do reator EGSB.

Pode se concluir também que a produção de ácido propiônico compete com a rota de produção de 1,3-propanodiol, já que, a medida que a concentração de ácido propiônico aumentava, a de 1,3-propanodiol diminuiu. Isso aconteceu com a diminuição do TDH que pode ser um dos principais fatores para a definição de uma rota.

REUNGSANG et al. (2013) estudaram reator UASB, com TDH fixo de 24 horas, pH 5,5 e 37°C para produção de hidrogênio a partir do glicerol. Os autores detectaram produções de 1,3-propanodiol, etanol, ácido fórmico, ácido acético, ácido láctico, ácido propiônico e ácido butírico. Os metabólitos produzidos em maior

quantidade foram 1,3-propanodiol (60 mmol.L^{-1}), etanol (100 mmol.L^{-1}), ácido fórmico ($66,5 \text{ mmol.L}^{-1}$) e ácido acético ($18,7 \text{ mmol.L}^{-1}$). Os autores concluíram que com a elevada produção de 1,3-propanodiol e etanol, existia simultaneamente concentração de microrganismos que utilizaram as vias redutivas e oxidativas.

Outro parâmetro para avaliar a utilização do glicerol é o rendimento. Para o 1,3-propanodiol o rendimento aumentou, devido ao fato de que maior parte do glicerol consumido é transformado neste metabólito. Isto pode ocorrer pela mudança de metabolismo dos microrganismos presentes no meio reacional, como também pela seleção dos microrganismos com a diminuição do TDH. Esta relação seria melhor elucidada com a análise dos microrganismos presentes em cada fase de operação. Na Tabela 5.8 é possível observar o rendimento do 1,3-propanodiol.

Tabela 5. 8 – Rendimento de 1,3-propanodiol do reator EGSB.

Fase	TDH (h)	Rendimento($\text{mol}1,3\text{-PD.mol}^{-1}\text{Glicerol}$)
1	14	0,42
2	12	0,38
3	10	0,39
4	8	0,41
5	6	0,42
6	4	0,41
7	2	0,60
8	1	0,66

Os maiores rendimentos de 1,3-propanodiol ocorreram nas últimas fases chegando ao valor máximo de $0,66 \text{ mol}1,3\text{-PD.mol}^{-1}\text{Glicerol}$.

WU et al. (2011) estudaram a conversão de glicerol puro em hidrogênio e metabólitos variando a concentração com cultura pura de *Klebsiella* sp. HE1. Na concentração de 70g.L^{-1} , foi encontrada a maior produtividade e rendimento do 1,3-propanodiol sendo os valores $6,95 \text{ mmol.h}^{-1}\text{.L}^{-1}$ e $0,37 \text{ mol}1,3\text{-PD.mol}^{-1}\text{Glicerol}$, respectivamente.

KIVISTÖ et al. (2012) estudaram em batelada a produção de 1,3-propanodiol com glicerol ($2,5\text{g.L}^{-1}$) e microrganismo *Halanaerobium saccharolyticum* subespécie *saccharolyticum*, entre os experimentos realizados o rendimento máximo de 1,3-propanodiol foi de $0,63 \text{ mol}1,3\text{-PD.mol}^{-1}\text{Glicerol}$. Os autores concluíram que se a

produção de 1,3-propanodiol é favorecida a de H₂ diminui, uma vez que as rotas para produção competem entre si.

Valor de rendimento igual ao reator EGSB em estudo foi relatado por KIVISTÖ et al. (2013). Com reatores em batelada a 37°C, pH 7,4 e 5 g.L⁻¹ de glicerol bruto como substrato para produção de 1,3-propanodiol, atingiram rendimento de 0,66 mol1,3-PD.mol⁻¹Glicerol. No mesmo estudo os autores avaliaram a produção de 1,3-propanodiol e H₂ simultaneamente, os máximos rendimentos obtidos para 1,3-PD e H₂ foram 0,50 mol1,3-PD.mol⁻¹Glicerol e 1,2 molH₂.mol⁻¹Glicerol, respectivamente.

O rendimento de ácido propiônico pode ser observado na Tabela 5.9. Uma explicação possível para o aumento na produção e no rendimento é que com a diminuição do TDH ocorreu um favorecimento da rota de produção deste ácido.

Tabela 5. 9 – Rendimento de ácido propiônico a partir do glicerol consumido.

Fase	TDH (h)	Rendimento molác.propiônico.mol ⁻¹ Glicerol
1	24	0,06
2	20	0,06
3	16	0,05
4	12	0,26
5	8	0,38
6	4	0,45
7	2	0,70
8	1	0,71

ITO et al. (2005) estudando a produção de hidrogênio a partir de glicerol 10 g.L⁻¹, com temperatura controlada em 37°C e pH não controlado, obtiveram rendimentos de metabólitos mol.mol⁻¹ de 0,14 de ácido láctico, 0,09 de ácido acético, 0,16 1,3-PD e 0,12 de ácido fórmico.

TEMUDO et al. (2008) estudaram CSTR para a produção de H₂ e metabólitos a partir de 4g.L⁻¹ de glicerol, TDH de 8 horas, temperatura de 30°C e pH 8. Os autores detectaram 1,3-PD com rendimento de 0,14 mol1,3-PD.mol⁻¹Glicerol, acetato com 0,04 molAcetato.mol⁻¹Glicerol de rendimento, etanol com rendimento de 0,67 molEtanol.mol⁻¹Glicerol e formato com 0,75molFormato.mol⁻¹Glicerol de rendimento.

ZHANG e YANG. (2009) estudaram reator em batelada com glicerol para produção de ácido propiônico, com temperatura de 32°C, concentração de glicerol de aproximadamente 43 g.L⁻¹, pH 7 e cultura pura de *Propionibacterium acidipropionici*.

Os autores obtiveram rendimento de 0,68 molÁc.propiônico.mol⁻¹Glicerol. Também foi detectado ácido acético e ácido succínico, porém em pequena quantidade. O autor explica que a alta produção de ácido propiônico se deve ao fato de que pelo estado reduzido do glicerol favoreceu a formação de produtos via rota reductiva como é o caso do ácido propiônico.

Uma provável explicação para altos rendimentos de H₂, 1,3-propanodiol e ácido propiônico em uma mesma fase, seria o fato de que outras substâncias podem estar presentes no resíduo utilizado no estudo, uma vez que o glicerol é bruto e não passou por nenhum tratamento de purificação. Com isso outras substâncias podem ter sido usadas pelos microrganismos para a produção de H₂ e metabólitos.

5.2.8 – Balanço de DQO

Na tabela 5.10 está demonstrado o balanço de DQO, que foi calculo com base nas substâncias encontradas no meio reacional e a DQO medida no efluente. É possível notar que existe uma diferença entre a DQO teórica e a medida. Isso acontece muito provavelmente pelo fato de que podem existir metabólitos que não foram detectados.

Tabela 5. 10 – Balanço de DQO do reator EGSB.

Fase	TDH (h)	DQO (mg/L)											
		1,3-Propanodiol	Etanol	Ác. Acético	Ác. Propiônico	Ácido Butírico	Outro metabólitos detectados *	Glicerol	SSV	DQO total	DQO medida	Diferença de DQO	% Dif
1	14	2293,26	250,52	190,48	281,99	331,55	172,36	267,01	1057,48	4844,65	5735,21	890,56	15,53
2	12	2346,81	331,06	186,19	252,13	451,23	299,04	309,72	871,50	5047,67	6002,81	955,15	15,91
3	10	2702,96	290,02	234,13	225,68	348,34	492,67	243,51	692,33	5229,63	5485,63	256,00	4,67
4	8	2567,32	557,56	205,49	1177,32	186,39	292,92	274,57	938,34	6199,91	6161,47	-38,44	-0,62
5	6	2015,83	445,12	122,40	1627,80	350,12	342,53	315,51	940,79	6160,10	5891,07	-269,03	-4,57
6	4	1881,54	316,45	190,51	1417,95	35,14	180,40	1738,37	876,36	6636,73	6559,46	-77,27	-1,18
7	2	1197,15	93,75	77,36	1306,42	50,14	135,74	2699,88	986,39	6546,84	6852,50	305,66	4,46
8	1	819,02	402,53	29,44	823,58	30,49	55,75	3301,14	1229,23	6691,18	6877,25	186,07	2,71

* Ácidos succínico, láctico, fórmico, valérico, capróico, isovalérico e isobutírico.

5.2.9 – Grânulos e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Na Figura 5.17 é possível observar os grânulos da fase 3 (TDH 16 horas) dentro do reator EGSB, eles que eram pretos no início da operação, ficaram esbranquiçados com o passar do tempo de operação, esse aspecto foi notado em todas as fases de operação do reator, sem grandes mudanças. AKTUSU et al. 2009 operando reator UASB com amido a produção de H₂, também observaram a mudança de coloração dos grânulos de preta para branca, no decorrer dos ensaios de produção de H₂ e ainda detectou na superfície do grânulo a existência de microrganismo em formas de bastão. GUO et al. (2008b) utilizando reator EGSB e amido como substrato, após realizar MEV nos grânulos do reator em operação, relataram que uma comunidade de diferentes microrganismos se formou no biofilme do grânulo.



Figura 5. 17 – Grânulos no interior do reator EGSB na fase 3.

Foram realizado nos grânulos da última fase do reator EGSB o procedimento de microscopia eletrônica de varredura (MEV) para observar a existência, o tamanho e a quantidade de microrganismos na superfície e no interior dos grânulos. Nas Figuras 5.18 (a), (b) e (c) é possível observar a superfície de três grânulos diferentes. Em todos é possível notar grande quantidade de microrganismos, todos em forma de bacilos. Já nas

Figuras 5.19 (a), (b) e (c) é possível notar que existem microrganismos com diferentes tamanhos, isso muito provavelmente se deve ao fato de pertencerem a diferentes grupos, mas esta confirmação só é possível com a realização de análise biomolecular que caracteriza o tipo de microrganismo.

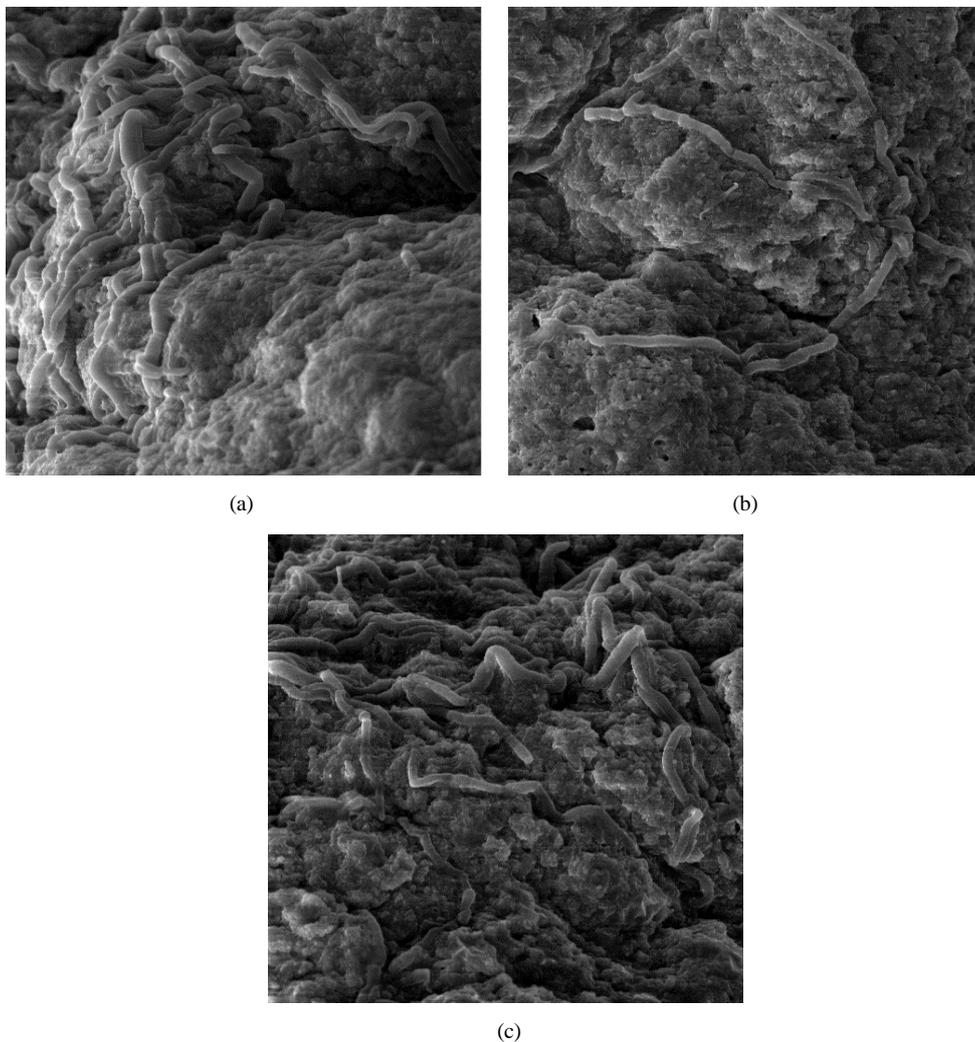


Figura 5. 18 (a), (b) e (c) - Superfícies de grânulos do reator EGSB ampliadas 500 vezes.

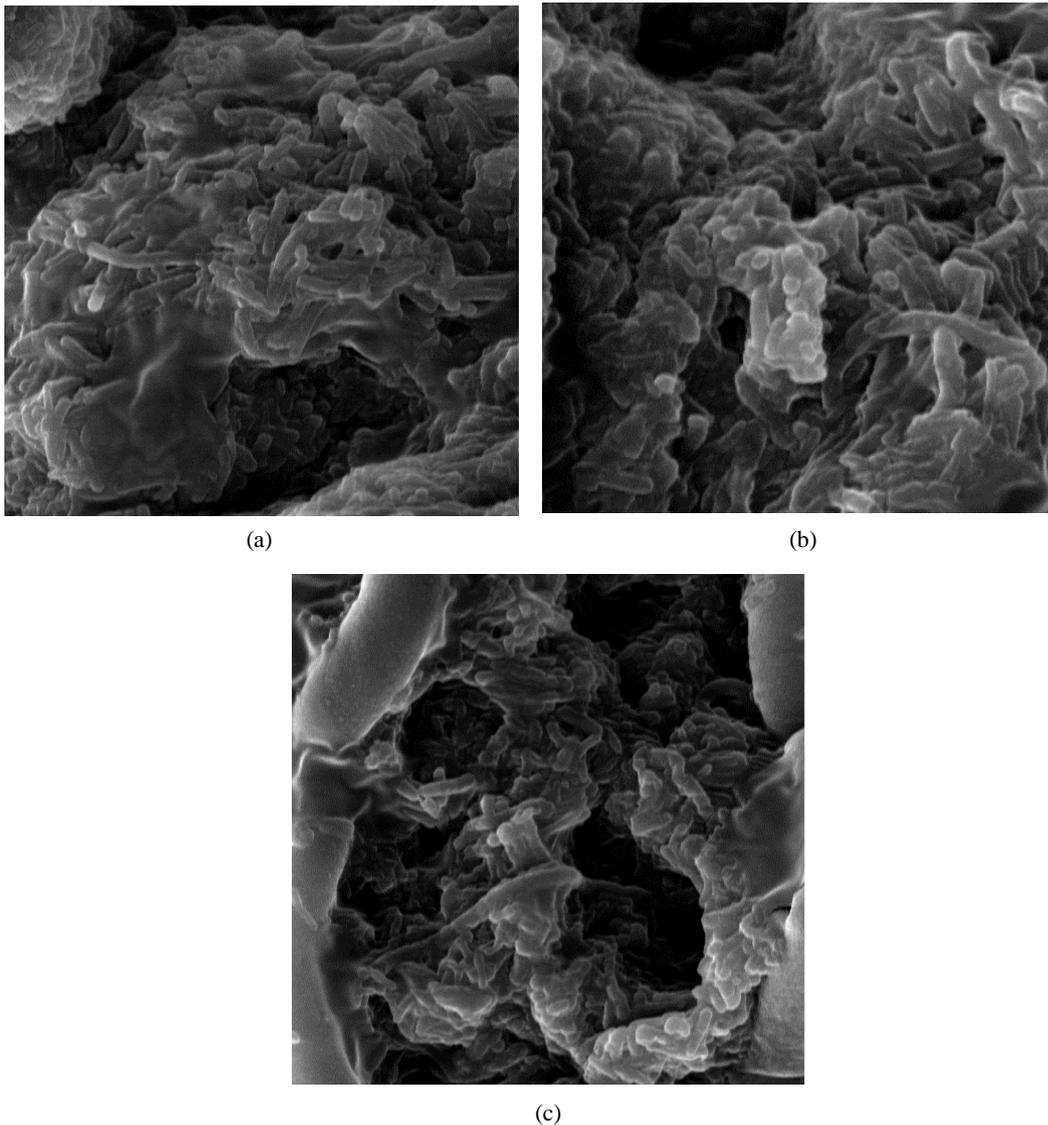


Figura 5. 19 (a), (b) e (c) – Superfície dos grânulos ampliadas 3.000 vezes.

Também foi realizada microscopia no interior dos grânulos para detectar se existia ou não microrganismos, assim como observar a característica física do grânulo. Como nota-se na Figura 5.20 não há presença de microrganismo no interior do grânulo. ABBASI e ABBASI (2012) dizem que um pH baixo é favorável para o desenvolvimento de microrganismos acidogênicos (produtoras de H_2) e que o grânulo formado por esses microrganismos são mais resistentes a uma variação brusca de pH e a pH ácido. E que nessas condições microrganismos metanogênicos podem morrer. Na Figura 5.21 observar-se a morfologia de um grânulo partido ao meio e é possível notar que em seu interior ele é totalmente oco. O interior do grânulo geralmente é formado por microrganismos metanogênicos.

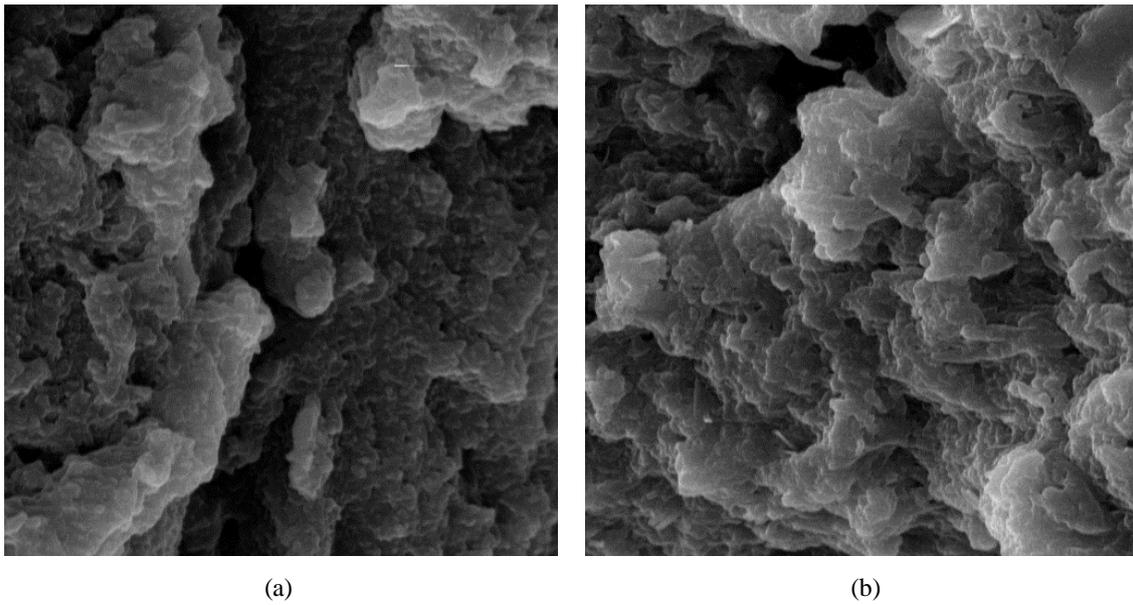


Figura 5. 20 – (a) ampliada 3.000 vezes e (b) ampliada 5.000 vezes de grânulos do reator EGSB.

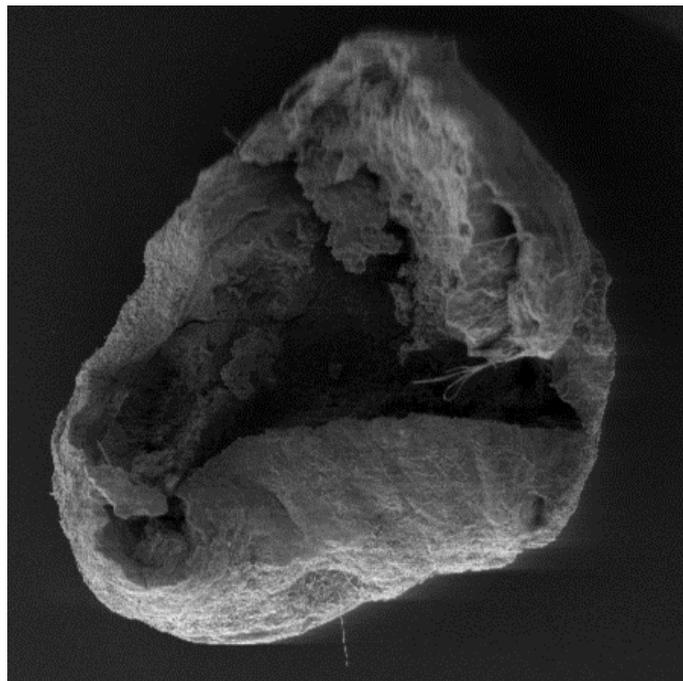


Figura 5. 21 – Grânulo do reator EGSB.

5.3 – Comparação entre os reatores RALF e EGSB

Embora os reatores RALF e EGSB tenham características diferentes e específicas, alguns parâmetros analisados em ambos tiveram comportamentos semelhantes. O reator EGSB mostrou comportamento semelhante nos TDH de 24, 20, 16 e 12 horas, por isso para uma análise comparativa entre os dois reatores estudados neste trabalho, será demonstrado para o reator EGSB as fases que foram realizadas a partir do TDH de 12 horas. Na tabela 5.11 está mais bem detalhada a fase e o TDH correspondente de cada reator.

Tabela 5. 11 – Número de fases e TDH correspondente de ambos os reatores.

Número de fases	RALF - TDH (h)	ESGB - TDH (h)
1	14	24
2	12	20
3	10	16
4	8	12
5	6	8
6	4	4
7	2	2
8	1	1

5.3.1 – Consumo de Glicerol

Na Figura 5.22 pode ser melhor observado o consumo de glicerol tanto no reator RALF quanto no reator EGSB. Comportamento semelhante ocorre em ambos os reatores. A medida que o TDH diminui o consumo de glicerol também diminui. Entretanto a diminuição do consumo do substrato no RALF ocorre no TDH de 2 horas, enquanto que no queda no consume de glicerol do reator EGSB a diminuição se inicia no TDH de 4 horas. O menor valor de consumo em ambos os reatores acontece simultaneamente no TDH de 1 hora, com valores de 37 e 26 % para os reatores RALF e EGSB, respectivamente.

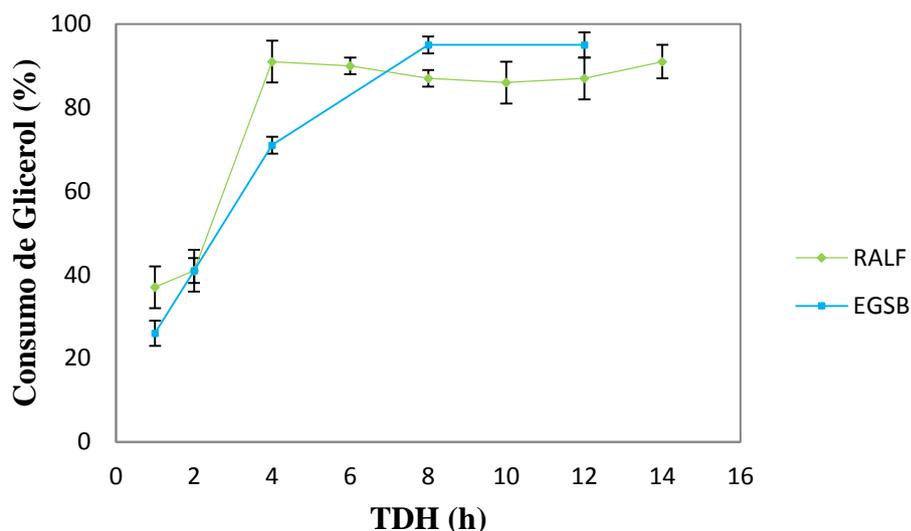


Figura 5. 22 – Consumo de glicerol dos reatores RALF e EGSB.

Os valores do consumo de substrato nas diferentes fases de cada reator e com o mesmo TDH estão na Tabela 5.12.

Tabela 5. 12 – Porcentagem de consumo de substrato nos reatores RALF e EGSB.

TDH (h)	RALF (%)	EGSB (%)
12	87	95
8	87	95
4	91	71
2	41	41
1	37	26

Altos valores de consumo de glicerol também são reportados por KUMAR et al. 2013 que operando reatores em batelada com glicerol a 30°C, obtiveram consumos de aproximadamente 95% de substrato. LIU e FANG (2007) operaram reatores em batelada com glicerol com concentração de 20,4g.L⁻¹ e cultura pura obtiveram consumo de glicerol de 95 %.

5.3.2 – Conteúdo de Hidrogênio no Biogás

A Figura 5.23 demonstra o conteúdo de hidrogênio no biogás nos reatores RALF e EGSB.

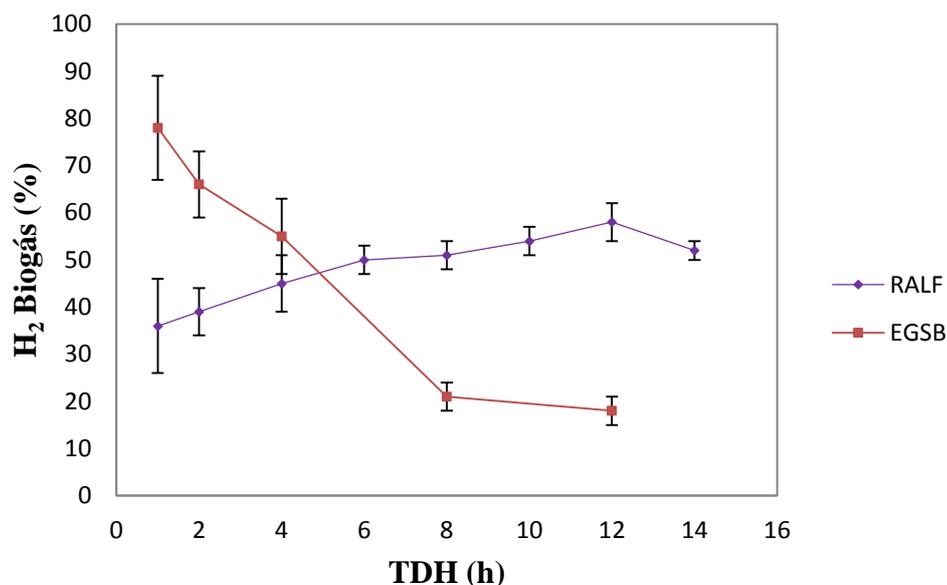


Figura 5. 23 – Conteúdo de hidrogênio no biogás nos reatores RALF e EGSB.

Os comportamentos no conteúdo de hidrogênio no biogás nos reatores RALF e EGSB seguiram caminhos diferentes. No reator RALF à medida que o TDH diminuía o conteúdo de hidrogênio também diminuía. Entretanto os valores reportados por este reator variaram de 58 à 36%, enquanto que no reator EGSB variou de 17 à 78 % e teve comportamento contrário, já que a medida que o TDH diminuiu o conteúdo de H₂ no biogás aumentou.

WU et al. (2011) operou reatores em batelada com glicerol a diferentes concentrações, temperaturas e pH, obtiveram valores de conteúdo de hidrogênio do biogás variaram de 33 à 54%. Pode-se então observar que o conteúdo é dependente de vários fatores.

5.3.3 – Produtividade Volumétrica de Hidrogênio

Na Figura 5.24 pode ser observada a produtividade volumétrica de hidrogênio nos reatores RALF e EGSB.

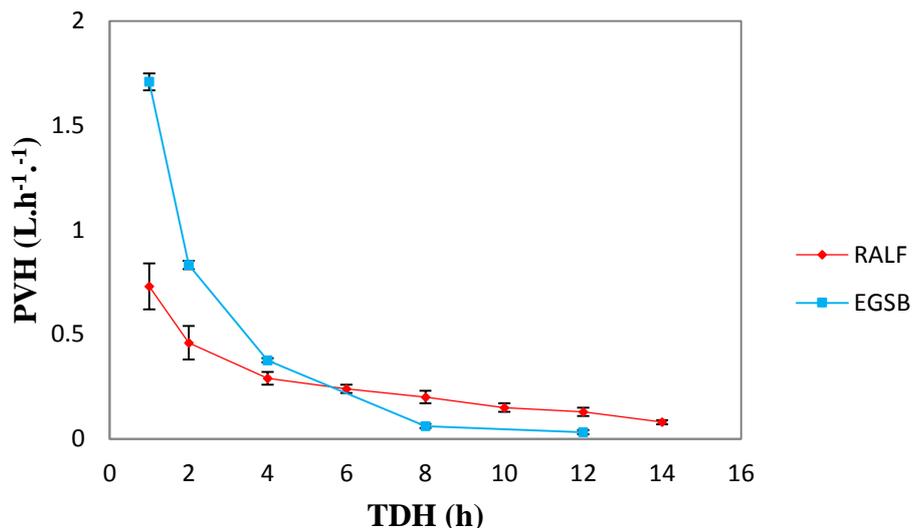


Figura 5. 24 – Produtividade de H₂ dos reatores RALF e EGSB.

É possível observar que a produtividade, contrária ao conteúdo de H₂, aumentou nos dois reatores à medida que o TDH diminuiu. A variação da produtividade volumétrica do reator RALF foi de 0,08 à 0,73 L.h⁻¹.L⁻¹. E a do reator EGSB foi de 0,019 à 1,709 L.h⁻¹.L⁻¹. No reator RALF a produtividade foi maior que a do reator EGSB até o TDH de 8 horas, após este TDH aconteceu o contrário a produtividade do reator EGSB foi maior. O aumento no reator EGSB corresponde também ao aumento de hidrogênio no biogás.

VARRONE et al. (2013) com reatores em batelada, temperatura de 37°C, pH inicial de 6,8 e concentração de glicerol bruto de 15 g.L⁻¹, obtiveram produtividade volumétrica de 0,13 L.h⁻¹.L⁻¹.

5.3.4 – Rendimento de Hidrogênio

A Figura 5.25 ilustra o rendimento de hidrogênio nos reatores RALF e EGSB.

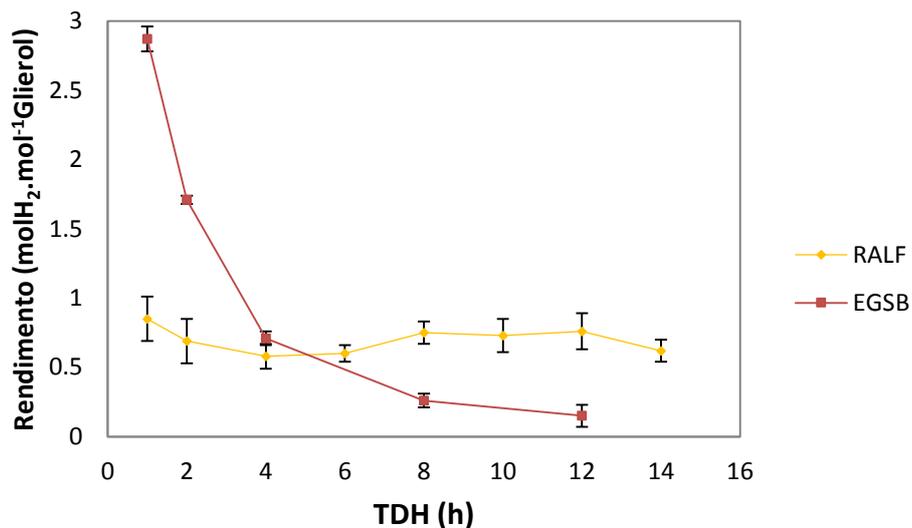


Figura 5. 25 – Rendimento dos reatores RALF e EGSB.

O comportamento do rendimento no reator RALF foi linear em todos os períodos de operação. No reator EGSB esse comportamento foi semelhante até o TDH de 8 horas. Somente a partir deste TDH é que aconteceu o crescente aumento do rendimento chegando as valor máximo de 2,87 molH₂.mol⁻¹Glicerol.

VARRONE et al (2013) operando reatores em batelada com 15 g.L⁻¹ de glicerol como substrato, temperatura de 37°C, pH inicial de 6,8, obteve rendimentos 0,91 molH₂.mol⁻¹Glicerol.

5.3.5 – Produção de Metabólitos

Apenas os principais metabólitos produzidos pelos reatores RALF e EGSB serão detalhados neste tópico, uma vez que a concentração de outros metabólitos produzidos foi bastante inferior.

Na figura 5.26 está demonstrado o comportamento da produção de 1,3-propanodiol. É notório que, tanto no reator RALF quanto no EGSB, à medida que o TDH diminui a produção de 1,3-PD também diminuiu.

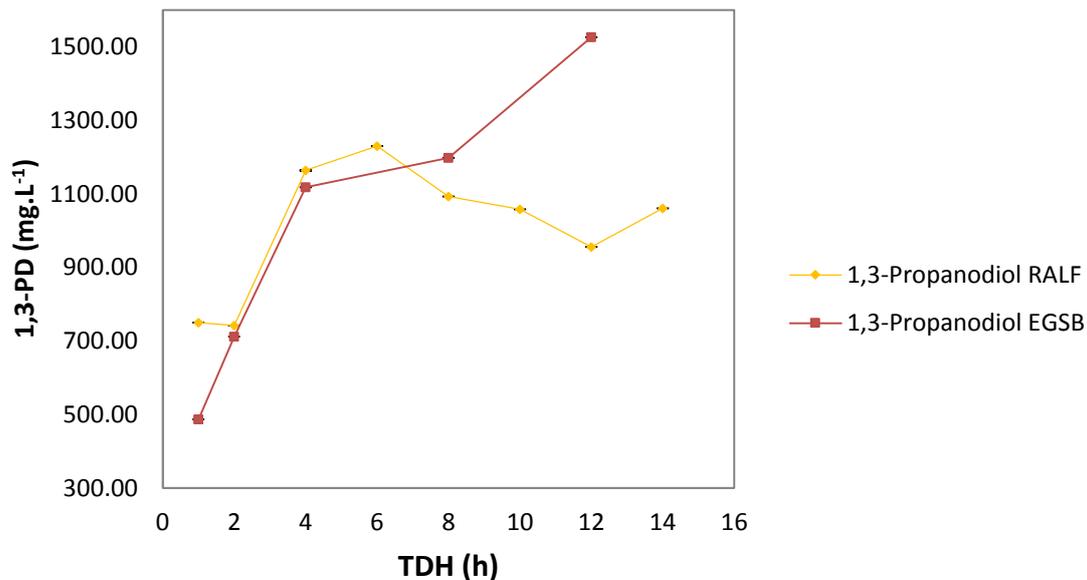


Figura 5. 26 – Concentração de 1,3-PD dos reatores RALF e EGSB em diferentes fases.

Na Figura 5.27 está demonstrado o comportamento da produção de etanol nos reatores RALF e EGSB em diferentes TDH. É possível observar que a produção deste metabólito no reator RALF não é estabelecida por um comportamento, enquanto que para o reator EGSB a produção diminui até o TDH de 2 horas e aumenta no TDH de 1 hora.

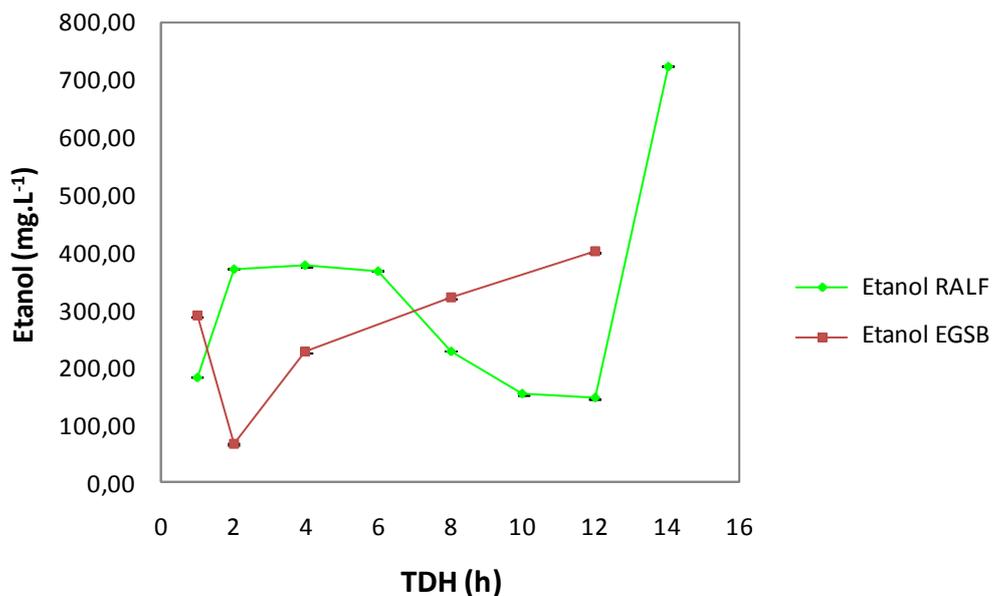


Figura 5. 27 – Produção de Etanol nos reatores RALF e EGSB.

Na Figura 5.28 estão reportadas as concentrações de ácido acético nos reatores RALF e EGSB nas diferentes fases de cada reator. Em ambos reatores a produção de ácido acético variou, ou seja, o TDH não interferiu no comportamento de produção deste ácido.

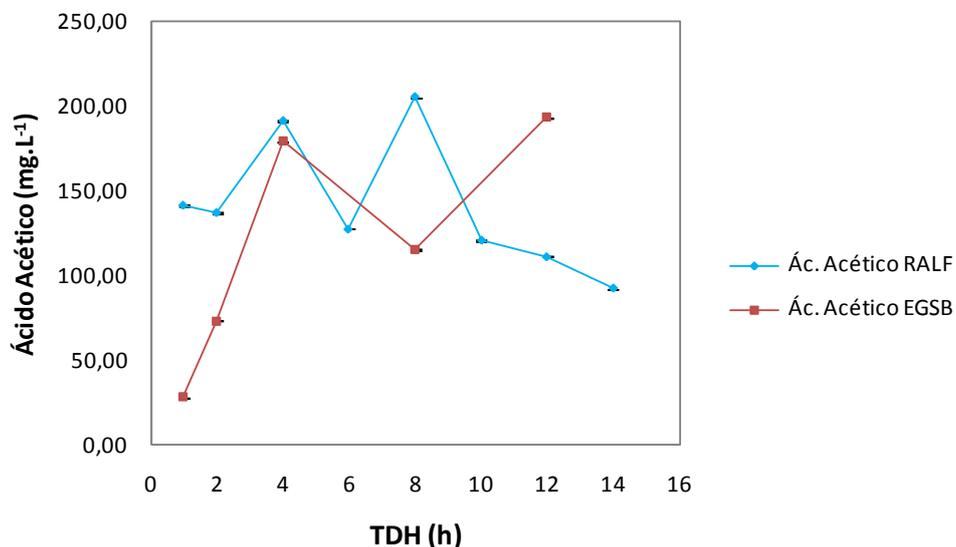


Figura 5. 28 – Produção de Ácido Acético nos reatores RALF e EGSB.

Na Figura 5.29 estão detalhadas as produções de ácido propiônico dos reatores RALF e EGSB em diferentes fases. A produção de ácido propiônico no reator RALF foi pequena até o TDH de 6 horas, aumentou no TDH de 2 e 4 horas e diminuiu novamente no TDH de 1 hora. No EGSB a produção foi máxima no TDH de 8 horas e diminuiu gradativamente nos TDH de 4, 2 e 1 hora.

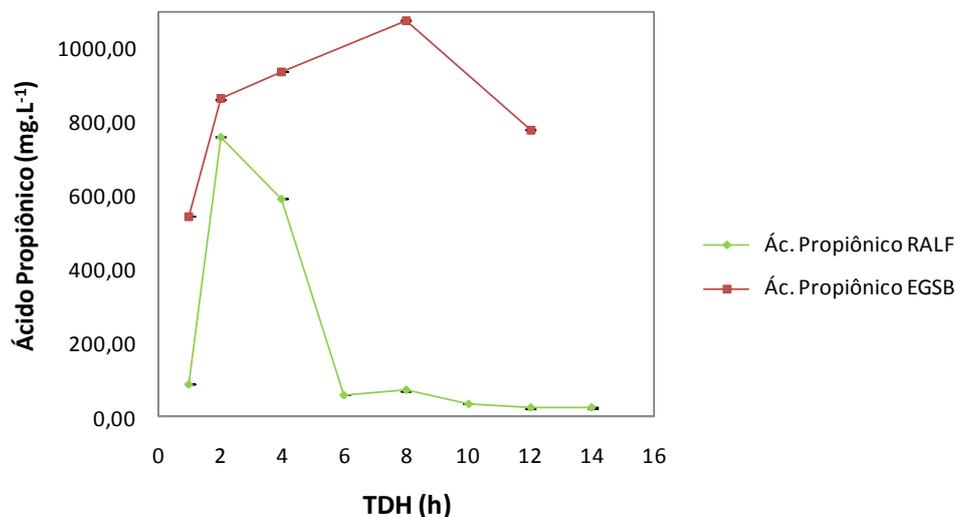


Figura 5. 29 – Produção de Ácido Propiônico nos reatores RALF e EGSB.

Na Figura 5.30 estão demonstrados os valores de concentração do ácido butírico dos reatores RALF e EGSB. O comportamento da produção deste metabólito foi semelhante nos dois tipos de reatores, entretanto no reator RALF observou-se uma produção maior no TDH de 6 horas, enquanto que no reator EGSB verificou-se maior concentração no TDH de 8 horas.

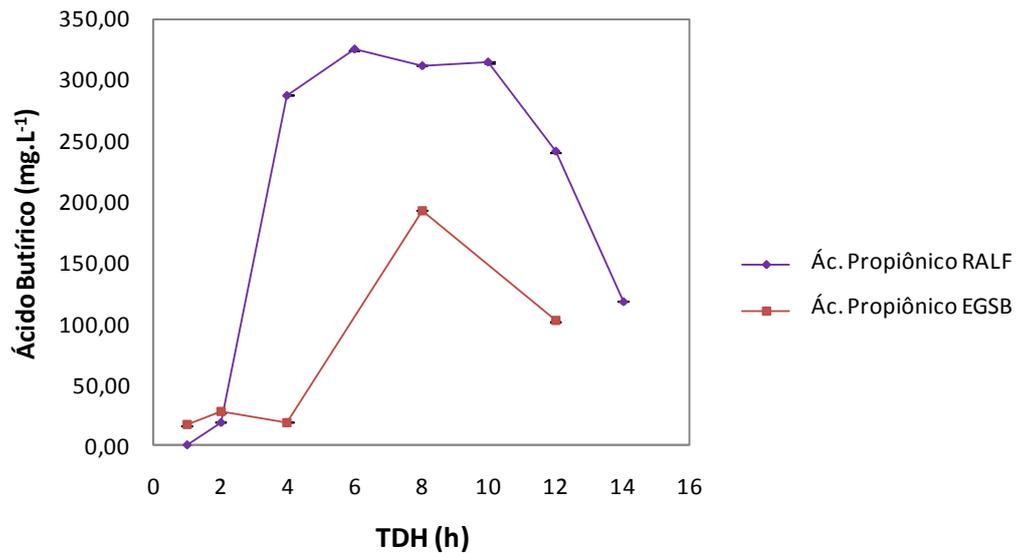


Figura 5. 30 – Produção de Ácido Acético nos reatores RALF e EGSB.

6 - CONCLUSÕES

No reator RALF a maior produção volumétrica de H₂ ocorreu no TDH de 1 hora e foi possível observar que, à medida que o TDH diminuía, a produtividade aumentava. Entretanto o rendimento de H₂ neste reator se manteve de maneira estável durante toda a operação.

O reator EGSB, assim como o RALF teve a maior produção volumétrica no menor TDH operado e comportamento semelhante foi observado. Contudo o rendimento aumentou à medida que diminuiu o TDH, tendo o máximo valor obtido no TDH de 1 hora.

Ocorreu produção de vários metabólitos durante toda a operação, nos reatores RALF e EGSB os metabólitos em maior concentração foram 1,3-propanodiol, etanol, ácido acético, ácido butírico e ácido propiônico.

O tratamento térmico juntamente com a operação em um pH baixo, foram eficientes para inibir os microrganismos metanogênicos no reator EGSB, uma vez que durante todo o período de operação não foi detectada presença de metano no biogás.

7 - REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ABBASI, T.; ABBASI S.A. Formation and impact of granules in fostering clean energy production and wastewater treatment in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. v. 16, p. 1696-1708, 2012.
- AKUTSU, Y.; LEE, D.Y.; CHI, Y.Z.; LI, Y.Y.; HADARA, H.; YU, H.Q. Hydrogen production potentials and fermentative characteristics of various substrates with different heat-pretreated natural microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 34, n. 13, p. 5365-5372, 2009.
- AMORIM, E.L.C.; BARROS, A.R.; DAMIANOVIC, M.H.R.Z.; SILVA, E.L. Anaerobic Fluidized Bed Reactor with Expanded Clay as Support for Hydrogen Production thorough Dark Fermentation of Glucose. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 34, p.783-790, 2009.
- ANP . AGENCIA NACIONAL DE PETROLEO - <http://www.anp.gov.br/?id=470> acessada em Agosto de 2013a.
- ANP . AGENCIA NACIONAL DE PETROLEO - <http://www.anp.gov.br/?dw=8739> acessada em Setembro de 2013b.
- ANTONOPOULOU, G.; GAVALA, H.N.; SKIADAS, I.V.;LYBERATOS, G. Influence Of Ph On Fermentative Hydrogen Production From Sweet Sorghum Extract. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 35, p. 1921-1928, 2010.
- BARROS, A.R; AMORIM, E.L.C; REIS, C.M; SHIDA, G.M; SILVA, E.L. Biohydrogen Production In Anaerobic Fluidized Bed Reactors: Effect Of Support Material And Hydraulic Retention Time. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 35, p. 3379-3388, 2010.
- BARROS, A. R.; ADORNO, M.A.T; SAKAMOTO, I. K.; MAINTINGUER, S. I.; VARESCHE, M. B. A.; SILVA, E. L. Performance evaluation and phylogenetic characterization of anaerobic fluidized bed reactors using ground tire and pet as

support materials for biohydrogen production. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 3840-3847, 2011.

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

BONDIOLI, P.; DELLA BELLA, L. An alternative spectrophotometric method for the determination of free glycerol in biodiesel. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*, v. 107, p. 153–157, 2005.

CAMPOS, J.R.; PEREIRA, J.A.R. Reator Anaeróbio de Leito Fixo Expandido/Fluidizado. In: Campos, J.R. (Coord.) *Tratamento de Esgotos Sanitários por Processos Anaeróbio e Disposição Controlada no Solo*, PROSAB/ABES. p. 199-219, 1999.

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

CHERNICHARO, C.A.L. *Reatores Anaeróbios – Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias*, v. 5. 2ª Ed. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental UFMG, 1997.

DAS, D.; VEZIROGLU, T.N. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 26, p. 13 – 18, 2001.

DEL NERY, V. Utilização de lodo anaeróbio imobilizado em gel no estudo de partida de reatores de fluxo ascendente com manta de lodo. *Dissertação (Mestrado)* Universidade Federal de São Paulo, 1987.

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

DINSDALE, R.M; HAWKES, F.R; HAWKES, D.L. Anaerobic digestion of short chain organic acids in a expanded granular sludge bed reactor. *Water Res.* 34(9):2433–8. 2000.

DRAPCHO, C.; NHUAN, N.; WALKER, T. *Biofuels Engineering Process Technology*. The McGraw-Hill Companies, Inc., 2008.

FANG, C.; O-THONG, S.; BOE, K.; ANGELIDAKI, I. Comparison of UASB And EGSB Reactors Performance, for Treatment Of Raw And Deoiled Palm Oil Mill Effluent (POME). *Journal of Hazardous Materials*, 189: 229 – 234. 2011.

FERREIRA ROSA, P.R.; SANTOS, S.C.; SILVA, E.L. Different ratios of carbon sources in the fermentation of cheese whey and glucose as substrates for hydrogen and ethanol production in continuous reactors. *International Journal of Hydrogen Energy*. p. 1-9, 2013.

GALLARDO, R.; FARIA, C.; PEREIRA, M.A.; RODRIGUES, L.R.; ALVES, M.M.. Production Of 1,3-Propanediol In EGSB Reactors By Open Mixed Cultures Using Glycerol As The Carbon Source. In 13th World Congress on Anaerobic Digestion. Santiago de Compostela, p. 1-4, 2013.

GRADY JR.,C.L.P; DAIGGER, G.T.; LIM, H.C. *Biological Wastewater Treatment*. Segunda edição. New York- Basel. Marcel Dekker, Inc. 1999.

GUO, W.Q; REN, N.Q; WANG, X.J; XIANG, W.S; MENG, Z.H; DING, J; QU, Y.Y; ZHANG, L.S. Biohydrogen production from ethanol-type fermentation of molasses in an expanded granular sludge bed (EGSB) reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33: 4981-4988. 2008a.

GUO, W.Q; REN, N.Q; CHENG, Z.B; LIU, B.F; WANG, X.J; XIANG, W.S; DING, J. Simultaneous biohydrogen production and starch wastewater treatment in acidogenic expanded granular sludge bed reactor by mixed culture for long-term operation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 1 – 8, 2008b.

- HALLENBECK, P., BENEMANN, J.R. Biological hydrogen, fundamentals and limiting process. *Int. J. Hydrogen Energy*, 27: 1185-1193. 2002.
- HIDALGO, M.D.; GARCÍA-ENCINA, P.A. Biofilm Development and Bed Segregation in a Methanogenic Fluidized Bed Reactor. *Water Research*. v. 36, p. 3083-3091, 2002.
- HICHEY, R.F.; OWENS, R.W. Methane Generation from High-Strength Industrial Wastes with the Anaerobic Biological Fluidized Bed. *Biotechnol. Bioeng.* v. 23, p. 399-413, 1981.
- HU, H.; WOOD, T.K. An evolved *Escherichia coli* strain for producing hydrogen and ethanol from glycerol. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. v. 391, p. 1033-1038, 2010.
- INTERNATIONAL ENERGY AGENCY. *World Energy Outlook*, Chap. 10. Paris. 2006.
- ITO, T.; NAKASHIMADA, Y.; SENBA, K.; MATSUI, T.; NISHIO, N. Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. *J. Biosci. Bioeng.*, v. 100, n. 3, p. 260-265, 2005.
- JUNG, K.W.; KIM, D.H.; SHIN, H.S. A simple method to reduce the start-up period in a H₂-producing UASB reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 36, p. 1466 – 1473, 2011.
- KAPDAN, I.K., KARGI, F. Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme Microb. Technol.* 38, 569–582. 2006.
- KATO, M.T. The anaerobic treatment of low strength soluble wastewaters. Ph.D. Thesis. Agricultural University of Wageningen, The Netherlands, 1994.

- KIM, S.; HAN, S.; SHIN, H. Effect of Substrate Concentration on Hydrogen Production and 16s Rdna-Based Analysis of the Microbial Community in a Continuous Fermenter. *Process Biochemistry*, v. 41, p. 199–207, 2006.
- KIVISTO, A.; SANTALA, V.; KARP, M. Hydrogen production from glycerol using halophilic fermentative bacteria. *Bioresource Technology*. v. 101, p. 8671-8677. 2010.
- KIVISTO, A.; SANTALA, V.; KARP, M. Closing the 1,3-propanediol route enhances hydrogen production from glycerol by *Halanaerobium saccharolyticum* subsp. *saccharolyticum*. . *International Journal of Hydrogen Energy*. v. 36, p. 7074-7080. 2011.
- KIVISTO, A.; SANTALA, V.; KARP, M. 1,3-Propanediol production and tolerance of a halophilic fermentative bacterium, *Halanaerobium saccharolyticum* subsp. *saccharolyticum*. *Journal of Biotechnology*. v. 158, p. 242-247. 2012.
- KIVISTO, A.; SANTALA, V.; KARP, M. Non-sterile process for biohydrogen and 1,3-propanediol production from raw glycerol. *International Journal of Hydrogen Energy*. v. 38, p. 11749-11755. 2013.
- KNOTHE, G; VAN GERPEN, J; KRAHL, J; RAMOS, L.P. *Manual de Biodiesel*. Editora Edgard Blücher. 1ª Edição, São Paulo. 2006.
- KOŚMIDER, A.; DROŹDŹYŃSKA, A.; BLASZKA, K.; LEJA, K.; CZACZYK, K. Propionic Acid Production by *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* Using Crude Glycerol and Whey Lactose Industrial Wastes. *Polish J. of Environ. Stud.* v. 19, p. 1249-1253, 2010.
- KUMAR, G.; LAY, C.H.; CHU, C.Y.; WU, J.H.; LEE, S.C.; LIN, C.Y. Seed inocula for biohydrogen production from biodiesel solid residues. *International Journal of Hydrogen Energy*. v. 37, p. 15489-15495. 2012.

- KUNII, D; LEVENSPIEL, O. Fluidization Engineering. New York. John Wiley & Sons Inc. 1969.
- 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.
- LETTINGA, G.; DE MAN, A.; VAN DER LAST, A. R. M.; WIEGANT, W.; VAN KNIPPENBERG, K.; FRIJNS, J.; VAN BUUREN, J. C.L. Anaerobic Treatment Of Domestic Sewage And Wastewater. Water Science And Technology, v. 27, p. 67-73, 1993.
- LETTINGA, G.; HULSHOFF POL, L. W.; ZEEMAN, G., FIELD, J.; VAN LIER, J. B.; VAN BUUREN, J. C. L.; JANSSEN, A. J.H.; LENS, P. Anaerobic treatment in sustainable environmental production concepts. Proceedings of the 8th International Conference on Anaerobic Digestion, Sendai, Japan, v. 1, p. 32-39, 1997.
- LI, C.L.; FANG, H.H.P. fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. Environmental Science Technology. p. 1-39, 2007.
- LIMA, D.M.F.; ZAIAT, M. The Influence Of The Degree Of Back-Mixing On Hydrogen Production In An Anaerobic Fixed-Bed Reactor. International Journal of Hydrogen Energy, v. 37, p. 9630 – 9635, 2012.
- LIU, I.; WHANG, L., REN, W.; LIN, P. The effect of pH on the production of biohydrogen by clostridia: Thermodynamic and metabolic considerations. International Journal of Hydrogen Energy, v. 36, p. 439-449, 2011.
- LIU, F.; FANG, B. Optimization of bio-hydrogen production from biodiesel wastes by *Klebsiella pneumonia*. Biotechnol Journal. v. 2, p. 374-380, 2007.

- LO, Y.C; CHEN, X.J; HUANG, C.Y; YUAN, Y.J. Dark fermentative hydrogen production with crude glycerol from biodiesel industry using indigenous hydrogen producing bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy*, 1 – 8, 2013.
- MANGAYIL, R.; KARP, M.; SANTALA, V. Bioconversion of crude glycerol from biodiesel production to hydrogen. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 37, n. 17, p. 12198-12204, 2012.
- MARU, B.T.; CONSTANTINI, M.; STCHIGEL, A.M.; MEDINA, F.; SUEIRAS, J.E. Biohydrogen Production by Dark Fermentation of Glycerol Using *Enterobacter* and *Citrobacter* Sp. *Biotechnol. Prog.* v. 29, p. 31-38, 2013.
- MIZUNO, O., DINSDALE, R., HAWKES, D.L., NOIKE, T. Enhancement of hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging. *Bioresour. Technol.*, 73(1): 59-65. 2000.
- MOTA, C.J.A; SILVA, C.X.A; GONÇALVES, V.L.C. Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. v, 32, n. 3, p. 639-648, 2009.
- MUÑOZ-PÁEZ, K.M.; RUIZ-ORDÁZ, N.; GARCÍA-MENA, J. et al. Comparison of biohydrogen production in fluidized bed bioreactors at room temperature and 35 °C. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2012.
- NGO T. A.; KIM M. S.; SIM S. J. High-yield biohydrogen production from biodiesel, manufacturing waste by *Thermotoga neapolitana*. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 36, p. 58336-42, 2011.
- NICOLLELA, C; VAN LOOSDRECHT, M.C.M.; HEIJNEN, J.J. Wastewater treatment with particulate biofilm reactors. *Journal of Biotechnology* , 80, 1–33. 2000.
- REIS, C.M; SILVA, E.L. Effect of upflow velocity and hydraulic retention time in anaerobic fluidized-bed reactors used for hydrogen production. *Chemical Engineering Journal*. 2011.

- REVISTA FAPESP. Resíduos bem-vindos – Subproduto do biodiesel pode ser usado para suprimir poeira de vagões de minério. p. 58 – 63, Junho, 2012.
- 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.
- RIPLEY, L.E.; BOYLE, W.C.; CONVERSE, J.C. Improved alkalimetric monitoring anaerobic digestion of high-strength wastes. Journal of Water Pollution Control Federation, 58:406-411. 1986.
- SÁ, L.R.V; CAMMAROTA, M.C; OLIVEIRA, T.C; OLIVEIRA, E.M.M; MATOS, A; FERREIRA-LEITÃO, V.S. Pentoses, hexoses and glycerol as substrates for biohydrogen production: An approach for Brazilian biofuel integration. International Journal of Hydrogen Energy, v. 38, p. 2986 – 2997, 2013.
- SARMA S. J.; BRAR S. K.; SYDNEY E.B.; BIHAN Y.L.; BUELNA G.; SOCCOL C. R. Microbial hydrogen production by bioconversion of crude glycerol: a review. International Journal of Hydrogen Energy, v. 37, p. 6473-90, 2012.
- SARMA, S.J; BRAR, S.K; BIHAN, Y.L; BUELNA, G; RABEB, L; SOCCOL, C.R; NACEUR, M; RACHID, B. Evaluation of different supplementary nutrients for enhanced biohydrogen production by *Enterobacter aerogenes* NRRL B 407 using waste derived crude glycerol. International Journal of Hydrogen Energy, v. 38, p. 2191 – 2198, 2013.
- SEGHEZZO, L; ZEEMAN, G; VAN LIEL, J.B; H. V. M. HAMELERS, H.V.M; LETTINGA, G. A Review: The Anaerobic Treatment of Sewage in UASB and EGSB Reactors. Bioresource technology, n.65, p. 175-90, 1998.
- SEIFERT, K. et al. Hydrogen generation from glycerol in batch fermentation process. International Journal of Hydrogen Energy, v. 34, n. 9, p. 3671-3678, 2009.

- SELEMBO, P.A; 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.
- 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.
- 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, n. 23, p. 5609-15, 2009.
- SINGH, L.; SIDDIQUI, M.F.; AHMAD, A.; AB.RAHIM, M.H.; SAKINAH, M.; WAHID, Z.A. Application of Polyethylene glycol immobilized *Clostridium* sp. LS2 for continuous hydrogen production from palm oil mill effluent in upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Biochemical Engineering Journal*. v. 70, p. 158-165, 2013.
- SITTIJUNDA, S; REUNGSANG, A. Biohydrogen production from waste glycerol and sludge by anaerobic mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 37, p. 13789 – 13796, 2012.
- STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER 20TH ED. American Public Health Association / American Water Works Association / Water Environment Federation, Washington, DC, USA. 1998.
- TEMUDO, M. F. et al. Glycerol fermentation by (open) mixed cultures: A chemostat study. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 100, n. 6, p. 1088-1098, 2008.

- UENO, Y., OTSUKA, S., MORIMOTO, M. Hydrogen production from industrial wastewater by anaerobic microflora in chemostat culture. *J Ferment Technol* 82(2): 194-197. ,1996.
- VARRONE, C.; ROSA, S.; FIOCCHETTI, F.; GUIASSANI, B.; IZZO, G. et al. Enrichment of activated sludge for enhanced hydrogen production from crude glycerol. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 38: p. 1319-1331, 2013.
- WANG. B.; LI, Y.; REN, N. Biohydrogen from molasses with ethanol-type fermentation: Effect of Hydraulic Retention Time. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38: 4361 – 4367. 2013.
- 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.
- WU, S. Y.; LIN, C.N.; CHANG, J.S. Hydrogen Production with Immobilized Sewage Sludge in Three-Phase Fluidized-Bed Bioreactors. *Biotechnology. Prog.*, 19: 828–832. 2003.
- WU, K.J; CHANG, C.F; CHANG, J.S. Simultaneous production of biohydrogen and bioethanol with fluidized-bed and packed bed bioreactors containing immobilized anaerobic sludge. *Process Biochem.* 42, 1165–1171. 2007.
- WU, K.J; LIN, Y.H; LO; Y.C; CHEN, C.Y; CHEN, W.M; CHANG, J.S. Converting glycerol into hydrogen, ethanol, and diols with a *Klebsiella* sp. HE1 strain via anaerobic fermentation. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers.* 42, 20-25. 2011.
- YAZDANI, S.S., GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Curr. Opin. Biotechnol.*, v. 18, p. 213-219. 2007.
- ZENG AP. A new balance equation of reducing equivalents for data consistency check

and bioprocess calculation. *Journal Biotechnol*; v. 43 p. 111–24, 1995.

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

ZHANG, Y.; YAN, L.; CHI, L.; LONG, X.; MEI, Z.; ZHANG, Z. Startup And Operation Of Anaerobic EGSB Reactor Treating Palm Oil Mill Effluent. *Journal of Environmental Sciences*, 20: 658-663. 2008.

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