



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA CIVIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL

SHYRLANE TORRES SOARES VERAS

**PRODUÇÃO DE COMPOSTOS COM VALOR AGREGADO A PARTIR DA
DEGRADAÇÃO ANAERÓBIA DO GLICEROL**

Recife

2019

SHYRLANE TORRES SOARES VERAS

**PRODUÇÃO DE COMPOSTOS COM VALOR AGREGADO A PARTIR DA
DEGRADAÇÃO ANAERÓBIA DO GLICEROL**

Tese realizada sob convênio de co-tutela entre a Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e a *Universidad Autónoma de Madrid* (UAM). A tese é apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, da UFPE, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Engenharia Civil, e ao *Programa de Doctorado en Microbiología*, da UAM, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Tecnologia Ambiental (UFPE) e Microbiologia (UAM).

Orientador interno: Prof. Dr. Mario Takayuki Kato.

Orientador externo: Prof. Dr. José Luis Sanz Martín.

Recife

2019

Catálogo na fonte
Bibliotecária Maria Luiza de Moura Ferreira, CRB-4 / 1469

V476p

Veras, Shyrlane Torres Soares.

Produção de compostos com valor agregado a partir da degradação anaeróbia do glicerol / Shyrlane Torres Soares Veras. - 2019.

192 folhas, il., tabs., abr. e sigl.

Orientador interno: Prof. Dr. Mario Takayuki Kato.

Orientador externo: Prof. Dr. José Luis Sanz Martín.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, 2019.

Inclui Referências e Apêndices.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil da Universidade Federal de Pernambuco em Regime de co-tutela com a Universidad Autónoma de Madrid.

1. Engenharia civil. 2. Ácido valérico e 1,3-propanodiol. 3. Filtro anaeróbio e reator UASB. 4. Sistema de pertração. 5. Biofilme em silicone e poliuretano. I. Kato, Mario Takayuki (Orientador interno). II. Sanz Martín, José Luis (Orientador externo). III. Título.

UFPE

624 CDD (22. ed.)

BCTG/2019-159

SHYRLANE TORRES SOARES VERAS

**PRODUÇÃO DE COMPOSTOS COM VALOR AGREGADO A PARTIR DA
DEGRADAÇÃO ANAERÓBIA DO GLICEROL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil da Universidade Federal de Pernambuco em Regime de co-tutela com a *Universidad Autónoma de Madrid*, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Engenharia Civil e em Ciências.

Aprovada em: 18 / 02 / 2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Jose Luis Sanz Martin – UAM (orientador externo)

Prof. Dr. Mario Takayuki Kato – UFPE (orientador interno)

Dr. Tito Augusto Gehring
RUB/ Rhur Universidade Bochum Alemanha (Examinador Externo)

Prof^a. Dr^a. Maria de los Angeles Perez Fernandez Palha
UFPE/Departamento de Engenharia Química (Examinadora Externa)

Prof^a. Dr^a. Savia Gavazza dos Santos Pessôa
UFPE/Departamento de Engenharia Civil e Ambiental (Examinadora Interna)

Prof. Dr. Wanderli Rogerio Moreira Leite
UFPE/Departamento de Engenharia Civil e Ambiental (Examinador Interno)

AGRADECIMENTOS

À DEUS por toda força, saúde, paciência e fé necessários para superar as dificuldades e alcançar objetivos ao longo dessa jornada.

Aos meus pais, que sempre fizeram o possível para que eu pudesse lutar por uma vida melhor. Agradeço por todo carinho, amor e dedicação. À minha mãe, por ter me ensinado a procurar o sorriso no meio de tristezas e grandes desafios. Ao meu pai, por mostrar que nunca se deve desistir, mesmo que o caminho seja longo e difícil. Por me mostrar que tudo é possível quando se tem fé.

À minha prima e praticamente irmã, Ingrid Torres, pelos momentos de distração e diversão. Por ser sempre meu “braço direito” e estar sempre disponível e disposta a ajudar.

Às minhas grandes amigas Renata Santos, Dafne Ramos e Eny Falcão pelos vários conselhos, incentivos e por estarem sempre ao meu lado nos bons e maus momentos.

Às amigas dos tempos do colégio: Paloma Barreto, Raissa Wanderley, Paula Fernanda, Ivany Araújo, Karina Pereira, Hosana Nascimento e Michelle Muniz pela amizade e apoio durante todos esses anos e por sempre estarem presentes nos melhores e mais “descontraídos” momentos da minha vida.

A todos os membros do Laboratório de Saneamento Ambiental (LSA), em especial: Danúbia Freitas, Selma Thaís, Antônio Gustavo, Jucélia Tavares, Marcus Vinicius Santos, Oucilane Alves, Julliana Melo, Larissa Martins, Luiz Galdino e Ronaldo Fonseca pela amizade, ajuda e apoio ao longo do curso.

Aos professores Mário Kato, Lourdinha Florencio e Sália Gavazza, pela oportunidade de vivenciar experiências inesquecíveis, orientação, aprendizado e dedicação sempre gentilmente prestados no desenvolvimento deste trabalho. Por acreditarem e me fazerem acreditar na minha capacidade.

À Norma Amorim e ao Prof. Eduardo Lucena, por todo apoio e aprendizado durante os dias em que passei na Universidade Federal de Alagoas (UFAL).

À Embrapa Agroindústria Tropical e ao pesquisador Renato Leitão pelo suporte técnico e oportunidade de trabalhar no Laboratório de Tecnologia da Biomassa, como parte de seu grupo de pesquisa, essenciais para conclusão dessa pesquisa.

Ao Willame Cavalcante e Tito Gehring, pessoas incríveis que conheci na Embrapa. Agradeço fortemente aos dois por todo apoio durante minha estadia em Fortaleza - CE, pelos conhecimentos acadêmico e informal compartilhados, pelos momentos divertidos e,

principalmente pelo incentivo a esta pessoa que se desespera facilmente quando as coisas não funcionam conforme o planejado. Não poderia deixar de agradecer a Will por me ensinar toda a parte operacional necessária para cuidar “direitinho” do reator, vulgo “*Meu Bichinho*” e pelos “*spoilers*” de *One Piece* e *Nanatsu no Taizai*.

Aos melhores alunos de iniciação científica que tive e conheci: Tasso Jorge e Alexandre Rodrigues. Por toda dedicação, disponibilidade, por todos os bons momentos incluindo os almoços na “*Domestic Economy*” com os “*dindins gourmet*”!

Aos funcionários, técnicos e bolsistas da Embrapa: Francisca (Chiquinha) pelas boas conversas e café na cantina; LÍlian e Natália pela atenção e disponibilidade, sempre gentilmente despendidas; Aldo e Nayane pelo comprometimento e ajuda durante todo trabalho desenvolvido.

À FACEPE (Processo IBPG-0194-3.07/14) e a CAPES (Processo: 88881.134642/2016.1) pelas bolsas concedidas durante o doutorado na UFPE e o doutorado sanduiche na UAM (*Universidad Autónoma de Madrid* – Espanha).

Ao Professor José Luis Sanz pela oportunidade, apoio, dedicação e orientação durante todo o doutorado sanduíche na Espanha.

À Patricia Rojas por toda ajuda com a parte de biologia molecular.

À Ana Morato por todo aprendizado técnico e pessoal. Agradeço também pela companhia e alegria compartilhada. Pelos vários momentos divertidos como as nossas reuniões para trocar receitas e comparar a culinária brasileira e espanhola.

A todos do Laboratório de Biologia Molecular da UAM, em especial: Dina, Irene, Esteban, Beatriz e aos professores Irma, Pascual e Concha que fizeram minha estadia bem mais leve.

E a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho.

“Às vezes, depois de uma batalha que parece não ter fim, o guerreiro tem uma ideia e consegue vencer em matéria de segundos.

Então pensa: Por que sofri tanto tempo, num combate que já podia ter sido resolvido com metade da energia que gastei?

Na verdade, todo problema – depois de resolvido – parece muito simples. A grande vitória, que hoje parece fácil, foi o resultado de uma série de pequenas vitórias que passaram despercebidas.

Então o guerreiro entende o que aconteceu e dorme tranquilo. Em vez de culpar-se pelo fato de haver demorado tanto tempo para chegar, alegra-se por saber que terminou chegando.”

(COELHO, 2017, p. 130)

RESUMO

A conversão de glicerol por meio de processos anaeróbios em subprodutos com valor agregado foi analisada em três partes. Na primeira, a produção e extração de ácidos orgânicos, com foco em valérico, foram avaliadas usando um filtro anaeróbio com um microbioma diversificado durante um período de 114 dias, sendo os últimos 21 dias com uso de um sistema de pertração. Etanol foi utilizado como doador de elétrons nas reações de alongamento de cadeia. O propiônico foi o principal ácido de cadeia curta produzido (0,63 a 1,75 g DQO.L⁻¹.d⁻¹), enquanto que o de cadeia média foi valérico (0,86 a 1,81 g DQO.L⁻¹.d⁻¹). A diminuição significativa na produção de 1,3-propanodiol (1,3-PDO) e aumento dos ácidos sugeriram que o sistema de pertração favoreceu a rota oxidativa. O valor máximo da taxa de extração de valérico foi 30 g DQO.m⁻².d⁻¹. O aumento concomitante na produtividade de valérico e da bactéria *Megasphaera elsdenii* com o uso do sistema de extração, indicou sua participação direta no processo de alongamento. Na segunda parte, a produção de 1,3-PDO foi avaliada em dois reatores UASB (R1 e R2), ambos contendo biomassa fixa em espumas de poliuretano, a partir de dois inóculos (C1 e C2). R1 foi alimentado somente com glicerol puro e os ácidos foram os produtos predominantes. R2 foi alimentado primeiro com glicerol puro, e depois, com o bruto. Elevados rendimentos de 1,3-PDO foram obtidos com o primeiro (0,51 mol.mol gli⁻¹), aplicando uma carga orgânica (COV) de 13,6 g gli.L⁻¹.d⁻¹. Com glicerol bruto, o rendimento diminuiu (0,41 mol.mol gli⁻¹, com COV de 8,3 g gli.L⁻¹.d⁻¹). A produção de 1,3-PDO foi atribuída principalmente ao gênero *Clostridium* na biomassa suspensa. Na terceira parte, a produção de 1,3-PDO foi avaliada em um reator UASB (R3) com biofilme formado com C1 em suporte de silicone. R3 apresentou rendimentos muito satisfatórios com glicerol puro (0,54 mol.mol gli⁻¹) e bruto (0,48 mol.mol gli⁻¹), ambos com consumo de glicerol entre 90 e 95 %. Quanto à produtividade, a maior foi com glicerol bruto (5,21 g.L⁻¹.d⁻¹) e as condições operacionais foram: COV entre 16,4 e 20 g gli.L⁻¹.d⁻¹; TDH próximo a 1,5 d; pH afluente entre 7,5 e 8,0; e pH do efluente entre 5,0 e 5,4. Com o glicerol puro, *C. pasteurianum* foi dominante na biomassa aderida, enquanto que foi co-dominante com *C. beijerinckii* na suspensa. A mudança de alimentação para glicerol bruto resultou numa inibição parcial de *Clostridium* spp. *C. pasteurianum* continuou sendo dominante, mas agora com presença significativa de *Klebsiella pneumoniae* e diferentes espécies de *Lactobacillus*. Já *C. beijerinckii* diminuiu drasticamente. Portanto, por fim conclui-se que usando glicerol e sistemas biológicos contínuos, a produção de ácido valérico e sua extração e a de 1,3-PDO com biofilmes aderidos, podem ser alternativas viáveis para estimular ainda mais a reutilização desse resíduo.

Palavras-chave: Ácido valérico e 1,3-propanodiol. Filtro anaeróbio e reator UASB. Sistema de pertração. Biofilme em silicone e poliuretano.

ABSTRACT

The glycerol conversion into value-added by-products through anaerobic processes was analyzed in three parts. In the first, the organic acids production and extraction with focus on valeric, was evaluated using an anaerobic filter with an open microbiome, during a 114-day period, being the last 21 days using a pertraction system. Ethanol was used as electron donor in the chain elongation reactions. The main short-chain acid produced was propionic (0.63 to 1.75 g COD.L⁻¹.d⁻¹), while that of medium-chain was valeric (0.86 to 1.81 g COD.L⁻¹.d⁻¹). The dramatic decrease of 1,3-propanediol (1,3-PDO) and the increase of acids production, suggested that the use of the pertraction system favored the oxidative pathway. Valeric extraction rate reached a maximum of 30 g COD.m⁻².d⁻¹. The concomitant increase of valeric productivity and *Megasphaera elsdenii* bacteria with the use of pertraction system indicated their direct participation in the elongation process. In the second part, the 1,3-PDO production was evaluated in two UASB reactors (R1 and R2), both containing biomass fixed in polyurethane foams from two inoculums (C1 and C2). R1 was fed only with pure glycerol, with acids as predominant products. R2 was firstly fed with pure glycerol, and then, with crude. High yields of 1,3-PDO (0.51 mol.mol gly⁻¹) was obtained using the first by applying an organic loading rate (OLR) of 13.6 g gly.L⁻¹.d⁻¹. In the case of crude glycerol, the yield decreased (0.41 mol.mol gly⁻¹, with OLR of 8.3 g gly.L⁻¹.d⁻¹). The 1,3-PDO production was attributed mainly to the genus *Clostridium* in the suspended biomass. In the third part, the 1,3-PDO production was evaluated in a UASB reactor (R3) with biofilm formed with C1 in silicone support. R3 showed very satisfactory yields with pure glycerol (0.54 mol.mol gly⁻¹) and crude (0.48 mol.mol gly⁻¹), both with glycerol consumption between 90 and 95 %. In terms of productivity, higher value was obtained with crude glycerol (5.21 g.L⁻¹.d⁻¹) when the operational conditions were: OLR between 16.4 and 20 g gly.L⁻¹.d⁻¹; HRT close to 1.5 d; pH in the range of 7.5-8.0 for influent and 5.0-5.4 for effluent. Using pure glycerol, *C. pasteurianum* was dominant in the adhered biomass whereas it was co-dominant with *C. beijerinckii* in the suspended. Changing the feed to crude glycerol resulted in a partial inhibition of *Clostridium* spp. *C. pasteurianum* remained dominant, but now with significant presence of *Klebsiella pneumoniae* and different species of *Lactobacillus*. There was a drastic decline of *C. beijerinckii*. Thus, at the end, it is concluded that using glycerol and continuous biological systems, the production of valeric acid and its extraction, and that of 1,3-PDO with adhered biofilms, can be viable alternatives to stimulate even more the reuse of that waste.

Keywords: Valeric acid and 1,3-propanediol. Anaerobic filter and UASB reactor. Pertraction system. Biofilm attached to silicone and polyurethane.

RESUMEN

La conversión de glicerol por medio de procesos anaeróbicos en subproductos con valor añadido fue analizada en tres partes. En la primera, se evaluó la producción y extracción de ácidos orgánicos, con énfasis en el valérico, usando un filtro anaerobio con un microbioma complejo, durante el período de 114 días, siendo los últimos 21 días con el uso de un sistema de extracción con membranas. El etanol fue utilizado como donador de electrones en las reacciones de elongamiento de cadena. El propiónico fue el principal ácido de cadena corta producido (0,63 a 1,75 g DQO.L⁻¹.d⁻¹), mientras que el valérico lo fue de cadena media (0,86 a 1,81 g DQO.L⁻¹.d⁻¹). La disminución significativa en la producción de 1,3-propanodiol (1,3-PDO) y aumento de los ácidos, sugirieron que la introducción de un sistema de extracción con membranas favoreció la ruta oxidativa. El valor máximo de la tasa de extracción del valérico fue de 30 g DQO.m⁻².d⁻¹. El aumento concomitante en la productividad de valérico y de la bacteria *Megasphaera elsdenii* con el uso del sistema de extracción, indicó su participación directa en el proceso de elongamiento. En la segunda parte, la producción de 1,3-PDO fue evaluada en dos reactores UASB (R1 y R2), cada uno conteniendo biomasa fijada en espumas de poliuretano a partir de dos inóculos (C1 y C2). R1 fue alimentado sólo con glicerol puro y los ácidos fueron los productos predominantes. R2 fue alimentado primero con glicerol puro, y después, con el crudo. Altos rendimientos de 1,3-PDO se obtuvieron con el primero (0,51 mol.mol gli⁻¹), aplicando una carga orgánica (COV) de 13,6 g gli.L⁻¹.d⁻¹. Con glicerol crudo, el rendimiento disminuyó (0,41 mol.mol gli⁻¹, con COV de 8,3 g gli.L⁻¹.d⁻¹). La producción de 1,3-PDO fue atribuida principalmente al género *Clostridium* en la biomasa suspendida. En la tercera parte, la producción de 1,3-PDO fue evaluada en un reactor UASB (R3) con biopelícula formada con C1 en soporte de silicona. R3 presentó rendimientos muy satisfactorios con glicerol puro (0,54 mol.mol gli⁻¹) y crudo (0,48 mol.mol gli⁻¹), ambos con consumo de glicerol entre 90 y 95 %. Además la productividad fue mayor con glicerol crudo (5,21 g.L⁻¹.d⁻¹) y las condiciones operacionales fueron: COV entre 16,4 e 20 g gli.L⁻¹.d⁻¹; TRH cercano a 1,5 d; pH afluente entre 7,5-8,0; y pH efluente entre 5,0-5,4. Con glicerol puro, *C. pasteurianum* fue dominante en la biomasa adherida mientras que fue co-dominante con *C. beijerinckii* en la suspendida. El cambio de alimentación a glicerol crudo tubo como consecuencia una inhibición parcial de *Clostridium* spp. *C. pasteurianum* continuó siendo dominante, pero ahora con presencia significativa de *Klebsiella pneumoniae* y diferentes especies de *Lactobacillus*, mientras que *C. beijerinckii* disminuyó drásticamente. Por lo tanto, por fin se concluye que usando glicerol y sistemas biológicos continuos, la producción de ácido valérico y su extracción y la de 1,3-PDO con biopelículas adheridas, pueden ser alternativas viables para estimular aún más la reutilización de ese residuo.

Palabras clave: Ácido valérico y 1,3-propanodiol. Filtro anaeróbico y reactor UASB. Sistema de extracción con membranas. Biopelículas en silicona y poliuretano.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Produção de biodiesel e geração de glicerol a partir da transesterificação de óleos vegetais e/ou gordura animal.....	22
Figura 2 –	Principais setores das indústrias e compostos que utilizam a glicerina como matéria-prima.....	23
Figura 3 –	Produtos obtidos com a hidrogenólise do glicerol.....	25
Figura 4 –	Produtos da reação de oxidação do glicerol.....	26
Figura 5 –	Transformações e aplicações convencionais do glicerol.....	27
Figura 6 –	Esquema simplificado do funcionamento de uma biorrefinaria destacando a importância dos processos biológicos na obtenção de compostos pertencentes às categorias de biomateriais, bioenergia e bioprodutos a partir do glicerol.....	29
Figura 7 –	Esquema simplificado das etapas de degradação anaeróbia da matéria orgânica.....	31
Figura 8 –	Produtos formados durante a fermentação do glicerol pela ação de diferentes grupos de micro-organismos.....	32
Figura 9 –	Rotas para produção de ácido valérico e seus derivados a partir de ácido levulínico.....	44
Figura 10 –	Mecanismo de equilíbrio químico entre ácido (HA) e agente extrator (E).....	50
Figura 11 –	Fluxograma da pertração com membranas de fibras ocas e regeneração simultânea do solvente.....	51
Figura 12 –	Glicerol bruto utilizado nos experimentos.....	61
Figura 13 –	Condições e esquema experimental dos testes em batelada.....	63
Figura 14 –	Meio de suporte e biomassa ao longo da coluna do reator.....	64
Figura 15 –	Fotografia e esquema do filtro anaeróbio acoplado a um sistema de pertração compostos por duas membranas de fibras ocas utilizado na produção e extração de ácidos.....	67
Figura 16 –	Concentração dos produtos usando (a) inóculo do reator caprogênico (T1), (b) inóculo do reator adaptado para uso de glicerol como substrato e (c) mistura (1:1) dos inóculos.....	71

Figura 17 –	Distribuição geral das concentrações de carboxilatos, etanol e 1,3-PDO ao longo das três fases operacionais (F1), (F2) e (F3)..	74
Figura 18 –	Valores da taxa de extração para o valerato durante a fase F3.....	77
Figura 19 –	Distribuição dos produtos nas três fases operacionais (F1, F2 e F3).....	80
Figura 20 –	Perfis taxonômicos no nível de filo (a), família (b) e gêneros (c) do biorreator.....	84
Figura 21 –	Esquema do procedimento para fracionamento do glicerol bruto.....	88
Figura 22 –	Esquema do procedimento adotado para a formação de biofilme em espuma de poliuretano.....	91
Figura 23 –	Fluxograma de funcionamento dos reatores R1 e R2	92
Figura 24 –	Rendimento de 1,3-PDO e pH (inicial e final) para os inóculos em batelada usando glicerol puro e bruto.....	98
Figura 25 –	Rendimento de 1,3-PDO durante as etapas para formação e comprovação de biofilme pelos inóculos C1 e C2 nas espumas de poliuretano.....	99
Figura 26 –	Parâmetros operacionais e rendimentos de subprodutos (mol.mol gli ⁻¹) durante a operação em fase única (F1, glicerol puro) do reator R1	101
Figura 27 –	Parâmetros operacionais e rendimentos de subprodutos (mol.mol gli ⁻¹) durante a as fases F1 (glicerol puro) e F2 (glicerol bruto) do reator R2.....	102
Figura 28 –	Distribuição dos produtos durante a fase F1 do reator R1.....	105
Figura 29 –	Distribuição dos produtos durante as fases F1 e F2 do reator R2.....	105
Figura 30 –	Estimativa do balanço de massa para R1 durante toda a operação com glicerol puro em função da carga de glicerol aplicada.....	106
Figura 31 –	Estimativa do balanço de massa para R2 durante toda a operação com glicerol puro (F1) e bruto (F2) em função da carga de glicerol aplicada.....	106

Figura 32 –	Curvas de rarefação das amostras do inóculo (C2) e biomassas suspensa (S _{F2}) e aderida ao suporte (A _{F2}).....	108
Figura 33 –	Perfis taxonômicos no nível de filo (a), ordem (b), família (c) e gênero (d) do reator R2.....	110
Figura 34 –	Morfologia de micro-organismos a partir de amostras de (a) inóculo (C2) e (b) biomassa fixa nos suportes (A _{F2}) em R2.....	113
Figura 35 –	Esquema do procedimento para formação de biofilme no interior da mangueira de silicone.....	118
Figura 36 –	Fotografia e fluxograma da operação do reator.....	119
Figura 37 –	Parâmetros operacionais e rendimentos de subprodutos (mol.mol gli ⁻¹) durante a as fases F1 (glicerol puro) e F2 (glicerol bruto) do reator.....	125
Figura 38 –	Crescimento microbiano ao longo da operação do reator.....	126
Figura 39 –	Distribuição dos produtos durante a F1 e F2 do reator	130
Figura 40 –	Estimativa do balanço de massa para R3 durante toda a operação com glicerol puro (F1) e bruto (F2) em função da carga de glicerol aplicada.....	131
Figura 41 –	Reator contendo biofilme em pequenos pedaços de mangueira de silicone dispostos verticalmente	133
Figura 42 –	Rendimento de 1,3-PDO pelo inóculo C1 com dez transferências consecutivas para meios frescos	134
Figura 43 –	Curvas de rarefação das amostras do inóculo (C1) e biomassas suspensa (S) e aderida (A) ao suporte durante a fase F1 (S _{F1} e A _{F1}) e F2 (S _{F2} e A _{F2}).....	137
Figura 44 –	Perfis taxonômicos no nível de filo (a), ordem (b), família (c) e gêneros (d) do reator.....	138
Figura 45 –	Morfologia de micro-organismos a partir de amostras de (a) inóculo (C1), (b) biomassa aderida ao suporte de silicone (A _{F2}), e (c) biomassa suspensa (S _{F2}) dentro do reator.....	142

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Algumas propriedades físico-químicas do glicerol a 20 °C.....	21
Tabela 2 –	Energia livre de Gibbs padrão (ΔG°_r) para alguns caminhos envolvidos na via oxidativa da degradação anaeróbia do glicerol.....	23
Tabela 3 –	Alguns dados reportados sobre o rendimento de 1,3-propanodiol obtido a partir de diferentes técnicas de fermentação e utilizando glicerol como substrato sob diferentes condições de temperatura e pH.....	38
Tabela 4 –	Energia livre de Gibbs padrão (ΔG°_r) de algumas reações envolvidas no alongamento de cadeia.....	40
Tabela 5 –	Características do glicerol bruto utilizado nos experimentos.....	61
Tabela 6 –	Concentração de macro e micronutrientes utilizada nos experimentos.....	63
Tabela 7 –	Fases e condições operacionais aplicadas.....	65
Tabela 8 –	Parâmetros, metodologia e frequência de monitoramento da operação do biorreator.....	68
Tabela 9 –	Concentração média em mol.L ⁻¹ de H ₂ e CO ₂ produzidos.....	73
Tabela 10 –	Taxa de produção volumétrica média obtida ao longo das fases de operação (F1, F2 e F3).....	76
Tabela 11 –	Visão geral dos produtos obtidos com e sem sistema de pertração.....	78
Tabela 12 –	Índices de cobertura, diversidade e uniformidade.....	81
Tabela 13 –	Composição da solução de nutrientes.....	89
Tabela 14 –	Fases e condições operacionais aplicadas aos reatores R1 e R2..	93
Tabela 15 –	Nomenclatura, descrição e dia de coleta das amostras para análises de biologia molecular.....	95
Tabela 16 –	Comparação entre o glicerol bruto antes e após separação das fases (acidificação).....	96
Tabela 17 –	Resumo das condições aplicadas e melhores resultados obtidos com R1 (biofilme com inóculo C1) e R2 (biofilme com inóculo C2) nas fases operacionais F1 (glicerol puro) e F2 (glicerol	103

	bruto).....	
Tabela 18 –	Produtividade volumétrica média dos metabólitos em cada fase operacional dos reatores R1 e R2.....	104
Tabela 19 –	Índices de cobertura, diversidade e uniformidade para as amostras do reator R2.....	108
Tabela 20 –	Fases e condições operacionais aplicadas ao reator.....	120
Tabela 21 –	Nomenclatura, descrição e dia de coleta das amostras para análises de biologia molecular.....	121
Tabela 22 –	Resumo das condições aplicadas e melhores resultados obtidos nas fases operacionais F1 (glicerol puro) e F2 (glicerol bruto)....	128
Tabela 23 –	Produtividade volumétrica média dos metabólitos em cada fase operacional do reator.....	129
Tabela 24 –	Índices de cobertura, diversidade e uniformidade para as amostras do reator.....	136
Tabela 25 –	Atribuição taxonômica em nível de espécie usando a sequência de consenso para cada OTU das amostras do reator.....	140

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1,3-PDO	1,3-Propanodiol
A _{F1} e A _{F2}	Amostras de biomassa aderida ao suporte, coletadas para análises de biologia molecular durante as fases operacionais F1 e F2, respectivamente (Seções 4 e 5)
ACCC	Ácido carboxílico de cadeia curta
ACCM	Ácido carboxílico de cadeia média
C1, C2 e C3	Cultivos utilizados como inóculos (Seções 4 e 5)
COV	Carga orgânica volumétrica
DQO	Demanda química de oxigênio
EtOH	Etanol
F1, F2 e F3	Fases operacionais dos biorreatores
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
OTU	Unidade taxonômica operacional, do inglês “ <i>Operational Taxonomic Unit</i> ”
pb	Número de pares de base
R	Taxa de extração total (carboxilatos)
R1	Reator UASB (escala de bancada) com biofilme formado pelo inóculo C1 em suporte de poliuretano
R2	Reator UASB (escala de bancada) com biofilme formado pelo inóculo C2 em suporte de poliuretano
R3	Reator UASB (escala de bancada) com biofilme formado pelo inóculo C1 em suporte de silicone
RCi	Taxa de extração para um determinado carboxilato
Reator UASB	Reator anaeróbico de fluxo ascendente e manta de lodo
S _{F1} e S _{F2}	Amostras de biomassa suspensa, coletadas para análises de biologia molecular durante as fases operacionais F1 e F2, respectivamente (Seções 4 e 5)
S1, S2, S3 e S4	Amostras de lodo coletadas ao longo da operação com o filtro anaeróbico (Seção 3) para análises de biologia molecular
T1, T2 e T3	Testes em batelada (Seção 3)
TDH	Tempo de detenção hidráulico
TOPO	Óxido de tri- <i>n</i> -octilfosfina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	18
2	REVISÃO GERAL DA LITERATURA.....	20
2.1	A PROBLEMÁTICA EM TORNO DA PRODUÇÃO DE BIODIESEL.....	20
2.2	O GLICEROL.....	21
2.1.1	Compostos com valor agregado obtidos a partir do glicerol.....	24
2.1.1.1	Rotas industriais e convencionais.....	24
2.1.1.2	Processos biológicos e sua importância dentro do conceito de biorrefinaria.....	27
2.3	BIOQUÍMICA DA DEGRADAÇÃO ANAERÓBIA DO GLICEROL.....	30
2.3.1	Via redutiva: Produção de 1,3-PDO e micro-organismos envolvidos....	34
2.3.2	Via oxidativa: Produção de carboxilatos e reações de alongamento de cadeia.....	39
2.3.3	Ácido valérico: Processos termoquímicos versus processos biológicos..	42
2.4	PARÂMETROS OPERACIONAIS: EFEITOS SOBRE OS PRODUTOS E ATIVIDADE MICROBIANA.....	44
2.4.1	Concentração inicial e tipo de substrato.....	45
2.4.2	Carga orgânica e tempo de detenção hidráulico (TDH).....	45
2.4.3	Temperatura, pH e meio nutricional.....	46
2.4.4	Composição dos gases.....	47
2.4.5	Toxicidade dos metabólitos.....	48
2.5	SEPARAÇÃO DE ÁCIDOS CARBOXÍLICOS DE CADEIA MÉDIA (ACCM) COM MEMBRANAS DE FIBRAS OCAS.....	49
2.6	BIOFILME E CÉLULAS IMOBILIZADAS.....	52
2.7	CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA: IMPORTÂNCIA E TÉCNICAS APLICADAS.....	54
3	PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DE ÁCIDO VALÉRICO COM MEMBRANAS DE FIBRAS OCAS A PARTIR DE GLICEROL RESÍDUAL EM FILTRO ANAERÓBIO.....	58

4	PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL EM REATORES UASB A PARTIR DE GLICEROL POR CULTURAS MICROBIANAS MISTAS FIXAS EM SUPORTES DE POLIURETANO.....	86
5	PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL A PARTIR DE GLICEROL EM REATOR UASB COM BIOMASSA FIXA EM SUPORTE DE SILICONE.....	115
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	145
7	CONCLUSÕES FINAIS.....	147
	REFERÊNCIAS.....	150
	APÊNDICE A – RESUMEN EXTENSO EN CASTELLANO.....	166
	APÊNDICE B – RESUMO DAS CONDIÇÕES OPERACIONAIS APLICADAS AOS REATORES R1, R2 E R3.....	191

1 INTRODUÇÃO GERAL

A crescente quantidade de resíduos orgânicos seja resultado da atividade industrial ou agrícola, assim como seu tratamento e disposição, são questões que vêm sendo bastante discutidas devido aos impactos ambientais e riscos à saúde que eles podem proporcionar.

O glicerol é um resíduo orgânico resultante da produção de biodiesel e tem sido utilizado pelas indústrias como matéria-prima para fabricação de diversos produtos como: cosméticos, fármacos, aditivos para combustíveis, surfactantes, flavorizantes, gelatinizantes, solventes, lubrificantes, anticongelantes e polímeros. Estes são obtidos em sua maioria a partir de éteres, ésteres, acetais, acroleína, ácido acrílico e gás de síntese (H_2 e CO), que por sua vez, são derivados do glicerol com outros compostos por meio de vários tipos de reações químicas (ex. desidratação, carboxilação).

Este resíduo tem recebido especial atenção devido à crescente produção de biodiesel no mundo. Estima-se que sejam gerados em torno de 100 gramas de glicerol para cada quilograma de biodiesel produzido (CHEN *et al.*, 2018). Em 2016, a produção brasileira de biodiesel foi 3,8 milhões de m^3 , sendo 2,6 milhões a mais do que a produção inicial em 2008. Além disso, com o aumento na mistura com óleo diesel de 8 % para 10 %, espera-se uma produção em torno de 5,5 milhões de m^3 em 2018 (ANP, 2018). Considerando a produção mundial, espera-se um valor próximo a 42 milhões de m^3 até 2026 (OECD/FAO, 2017).

Uma vez que existe a tendência de aumento da produção de biodiesel, a oferta de glicerol pode ser muito maior do que a demanda nas indústrias e sendo assim, uma parcela significativa poderia ficar sem destinação definida. Além disto, o aproveitamento do glicerol bruto geralmente está associado a elevados custos e algumas vezes as vantagens de seu reuso como matéria-prima nas indústrias são questionadas. Desta forma, desenvolver métodos que permitam a obtenção de produtos com maior capacidade energética e/ou maior valor agregado em relação ao material inicial, tornam-se fundamentais.

A utilização do glicerol em processos biológicos tem sido considerada uma alternativa em potencial, visto que é possível obter compostos com grande interesse para o mercado. Alguns trabalhos têm mostrado o emprego desse resíduo como fonte de carbono para vários grupos de micro-organismos, tanto em condições aeróbias quanto anaeróbias (ABAD; TURON, 2012). Dentre estes, os processos em condições anaeróbias têm ganhado destaque principalmente por exigir menor custo de implantação e operação em relação aos aeróbios.

A digestão anaeróbia do glicerol foi inicialmente estudada e indicada para produção principalmente de metano. Contudo, como é possível obter outros bioprodutos com interesse para o mercado, com o tempo o foco das pesquisas incluíram a produção de hidrogênio e os produtos líquidos de degradação por vias redutiva e oxidativa, como o 1,3-propanodiol (1,3-PDO) e os ácidos orgânicos (acético, propiônico, butírico, etc.). Recentemente, a produção desses ácidos carboxílicos por meio de resíduos orgânicos (industriais ou agrícolas), tem agregado conhecimentos para o desenvolvimento da plataforma do carboxilato, que junto com a plataforma do açúcar e a termoquímica, compõem o conceito de biorrefinaria.

Dessa maneira, o objetivo desse estudo foi dividido em duas partes: (i) avaliar pela primeira vez a produção de ácido valérico a partir da degradação anaeróbia de glicerol bruto, suplementado com etanol, por meio de reações de alongamento de cadeia. E complementarmente, avaliar no final destes experimentos, um sistema de extração em linha com membranas de fibras ocas acoplado ao biorreator, focando na capacidade de extração de valerato (C5) produzido e sua influência sobre os produtos obtidos; e (ii) analisar a produção de 1,3-PDO a partir de glicerol e diferentes culturas mistas em reatores UASB (escala de bancada), com biomassa fixa em meios de suporte de silicone e espumas de poliuretano. Com isso, o presente estudo aborda a obtenção de produtos provenientes das duas rotas de degradação do glicerol: a oxidativa e redutiva, ampliando as possibilidades de reuso do glicerol em processos biológicos (mais simples e com menores custos) e viabilizando a crescente produção de biodiesel.

2 REVISÃO GERAL DA LITERATURA

Nas subseções seguintes estão apresentados os conceitos básicos necessários para uma melhor compreensão em torno da pesquisa realizada com produção e extração de ácidos (com foco em valérico) assim como produção de 1,3-PDO, ambos, a partir da fermentação do glicerol usando culturas mistas.

2.1 A PROBLEMÁTICA EM TORNO DA PRODUÇÃO DE BIODIESEL

A exigência em relação ao emprego de tecnologias limpas tem incentivado e intensificado o uso de biocombustíveis no decorrer dos anos. E isso tem acontecido porque os combustíveis fósseis são finitos e seu uso está diretamente relacionado não só ao aquecimento atmosférico (emissão de CO₂), mas também à poluição atmosférica em virtude da emissão de óxidos gasosos (SO₂ e SO₃), que são responsáveis pelas chuvas ácidas (CHANG *et al.*, 2010).

Por isso, a produção de biocombustíveis tem sido uma alternativa com vantagens ambientais, econômicas e sociais em relação à produção de combustíveis fósseis. O Brasil é um dos maiores produtores de etanol decorrente da cana-de-açúcar e sua produção de biodiesel também é grande. O biodiesel tem sido obtido a partir de óleos tanto de origem animal (ex. sebo bovino) como vegetal (ex. óleo de soja, dendê, girassol, amendoim, mamona, algodão, babaçu, pinhão manso) (ANP, 2018).

No entanto, assim como qualquer atividade industrial, há a questão da geração de resíduos. A crescente produção de biodiesel levanta questionamentos sobre a quantidade de glicerol gerada durante o processo e como destiná-lo adequadamente. Estima-se que sejam gerados em torno de 100 gramas de glicerol para cada quilograma de biodiesel produzido (ABAD; TURON, 2012; MONTEIRO *et al.*, 2018).

Em 2016, a produção brasileira de biodiesel foi 3,8 milhões de m³, sendo 2,6 milhões a mais do que a produção em 2008. Considerando as cinco regiões brasileiras, 43 % foram produzidos na região centro-oeste, 41 % no sul, 8 % no nordeste, 7 % no sudeste e 1 % no norte. Além disso, com o aumento na mistura com óleo diesel de 8 % para 10 %, espera-se uma produção em torno de 5,5 milhões de m³ em 2018 (ANP, 2018). Fazendo uma comparação com os maiores produtores no cenário global, em 2016, o Brasil ficou em segundo lugar, atrás dos Estados Unidos (5,5 milhões de m³) e na frente da Alemanha (3 milhões de m³), que é o maior produtor entre os demais países da União Europeia; e também,

países da América do Sul como Argentina (2,7 milhões de m³) (EBB, 2018; MONTEIRO *et al.*, 2018). No que diz respeito à produção total global, espera-se um aumento de 34 milhões de m³ (produção média referente aos anos de 2014-2016) para 42 milhões de m³ até 2026 (OECD/FAO, 2017).

Atualmente, parte do glicerol gerado durante a produção de biodiesel é destinada para as indústrias como matéria-prima. Vários produtos são obtidos a partir deste resíduo, no entanto, algumas limitações estão envolvidas (ex. elevados custos para purificação do glicerol bruto). Deste modo, diante da produção anual crescente de biodiesel, há a preocupação tanto da comunidade científica quanto do setor industrial sobre o que fazer com o volume extra de glicerol produzido (BEATRIZ *et al.*, 2011). Sendo assim, a ideia é incentivar o uso de glicerol, principalmente na forma bruta (visando reduzir gastos adicionais) para obter produtos com maior valor agregado em relação ao material inicial, viabilizando a crescente produção de biodiesel.

2.2 O GLICEROL

O glicerol é um tri-álcool, sua nomenclatura oficial (IUPAC) é 1,2,3-propanotriol e os três grupos hidroxila em sua estrutura garantem sua natureza higroscópica e solubilidade em água. Ele é viscoso, não tóxico, incolor e inodoro. Em temperatura ambiente (~25 °C), encontra-se na forma líquida. Algumas de suas propriedades físico-químicas estão reunidas na Tabela 1.

Tabela 1 - Algumas propriedades físico-químicas do glicerol a 20 °C

Parâmetro	
Fórmula química	C ₃ H ₈ O ₃
Peso molecular	92,09 g.mol ⁻¹
Densidade	1,26 g.cm ⁻³
Viscosidade	1,5 Pa.s
Ponto de fusão	18,2 °C
Ponto de ebulição	290 °C
Tensão superficial	64,0 mN.m ⁻¹

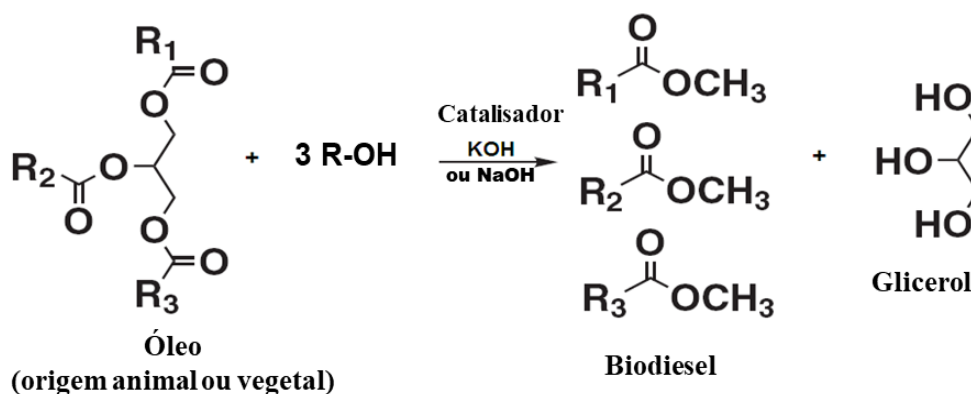
Fonte: Adaptado de Beatriz *et al.* (2011).

Em 1779, o químico sueco Carl Wilhelm Scheele sintetizou o glicerol pela primeira vez por meio de aquecimento usando azeite de oliva e óxido de chumbo. Após sua descoberta, novas formas de empregá-lo foram desenvolvidas para obtenção de novos produtos como a

nitroglicerina (em 1846) e seu uso em dinamite por meio da absorção em diatomita (1867). Por volta de 1870, processos de recuperação de glicerina já eram realizados. Em 1940, o glicerol passou a ser obtido de compostos petroquímicos como o propeno, já sendo utilizado na Europa e América (BEATRIZ *et al.*, 2011; MOTA *et al.*, 2009). Em 1960, o uso de ésteres de ácidos graxos do poliglicerol passou a ser permitido nos Estados Unidos na indústria de alimentos (CORMA *et al.*, 2007).

A formação de glicerol a partir do biodiesel ocorre por meio de reação de transesterificação entre óleos (origem animal ou vegetal) e álcool (metanol ou etanol) em presença de catalisador (KOH ou NaOH) (FUKUDA *et al.*, 2001), conforme mostra a Figura 1. Segundo Ma e Hanna (1999), essa reação também é conhecida como alcóolise e pode ser utilizada para converter ácidos graxos ou óleos em ésteres e glicerol. Apesar da estequiometria da reação consistir em 3 moles de álcool para 1 mol de triglicerídeo, aplica-se um excesso de álcool no meio da reação para aumentar o rendimento de éster. No entanto, o rendimento da reação depende também de outros fatores como concentração e tipo de catalisador, temperatura, pressão, tempo de reação, agitação, índice de umidade e natureza do óleo (CETINKAYA; KARAOSMANOGLU, 2004).

Figura 1 - Produção de biodiesel e geração de glicerol a partir da transesterificação de óleos vegetais e/ou gordura animal



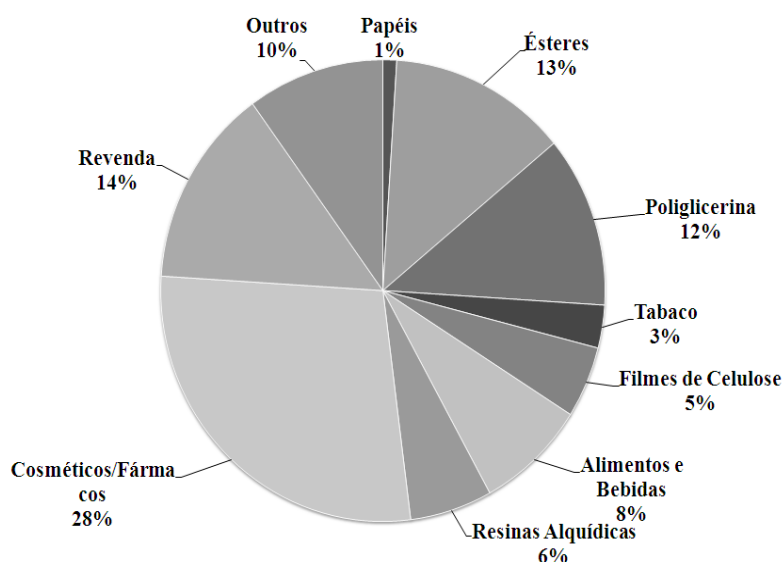
Fonte: Adaptado de Ma e Hanna (1999) e Mota *et al.* (2009).

O metanol, etanol, propanol e butanol estão entre os álcoois que podem ser utilizados na reação de transesterificação, no entanto, usualmente são empregados metanol ou etanol. Entre estes, o metanol tem sido escolhido por seu baixo custo e vantagens físico-químicas: polaridade e menor cadeia em relação ao etanol. Devido a isso, ele reage de forma mais eficiente com triglicerídeos. Outro ponto importante é que o hidróxido de sódio se dissolve

facilmente em metanol, embora hidróxido de potássio, carbonatos, metóxido de sódio e etóxido de sódio também possam ser usados como catalisadores alcalinos. Também podem ser utilizados enzimas (lipases) e catalisadores ácidos (ácido sulfúrico, ácidos sulfônicos, ácido clorídrico). No entanto, o uso de catalisadores alcalinos tem se mostrado mais eficiente e por isso, eles têm sido mais empregados comercialmente (MA; HANNA, 1999)

O glicerol formado neste processo apresenta impurezas como ácidos graxos, álcool, catalisadores (sais de sódio e potássio), entre outros. As características físicas, químicas e nutricionais bem como a concentração de impurezas, dependem da origem do óleo empregado e do processo aplicado para produzir biodiesel. Já a glicerina (glicerol comercial purificado) tem ampla aplicação nas indústrias química, têxtil, alimentícia e farmacêutica, sendo o maior percentual destinado à produção de fármacos e cosméticos (Figura 2) (MOTA *et al.*, 2009).

Figura 2 - Principais setores das indústrias e compostos que utilizam a glicerina como matéria-prima



Fonte: Adaptado de Mota *et al.* (2009).

No entanto, para atingir o grau de pureza exigido para sua comercialização como glicerina (no mínimo 95 %), os custos são altos e há a necessidade do emprego de processos mais complexos. Além disto, há o risco da demanda de glicerol para posterior uso nas indústrias ser muito menor do que a sua produção.

Como o glicerol bruto apresenta em sua constituição elementos nutricionais (ex. fósforo, cálcio, sódio, nitrogênio e enxofre), é possível aplicá-lo em processos biológicos como fonte de carbono para os micro-organismos e aproveitar esses nutrientes presentes em sua composição. No entanto, alguns elementos residuais como metanol, cloretos, sódio,

glicerídeos e ésteres metílicos de ácidos graxos, também podem atuar como inibidores para determinados grupos de micro-organismos.

2.2.1 Compostos com valor agregado obtidos a partir do glicerol

As duas subseções seguintes reúnem os principais compostos obtidos pelas rotas industriais e os com grande potencial para serem produzidos por processos biológicos. Além disso, está apresentada uma breve descrição em torno do conceito de biorrefinaria.

2.2.1.1 Rotas industriais e convencionais

De acordo com Corma *et al.* (2007) e Brandner *et al.* (2009), as indústrias obtêm uma grande variedade de compostos a partir do glicerol como alcoóis, ésteres, éteres, cetonas e ácidos carboxílicos. Cada um destes, por sua vez, pode ser reprocessado junto com outros componentes por meio de vários tipos de processos, para dar origem a novos compostos como é o caso da obtenção de monoglicerídeos a partir da esterificação de ácidos graxos (ácidos carboxílicos) descrita mais adiante. De acordo com Haron *et al.* (2018), o glicerol tem sido destinado em mais de 1500 aplicações e espera-se um número maior no futuro.

Geralmente os processos convencionais de conversão do glicerol reportados pela literatura incluem: gaseificação, hidrogenólise, oxidação/fermentação, redução, desidratação, carbonatação, esterificação e transesterificação. Nestes processos muitas vezes são utilizados catalisadores sólidos como: óxidos metálicos (ex. óxidos de alumínio, zinco, titânio), silicatos, carbonatos e zeólitas; e em alguns casos, são empregados solventes (ex. benzeno, tolueno).

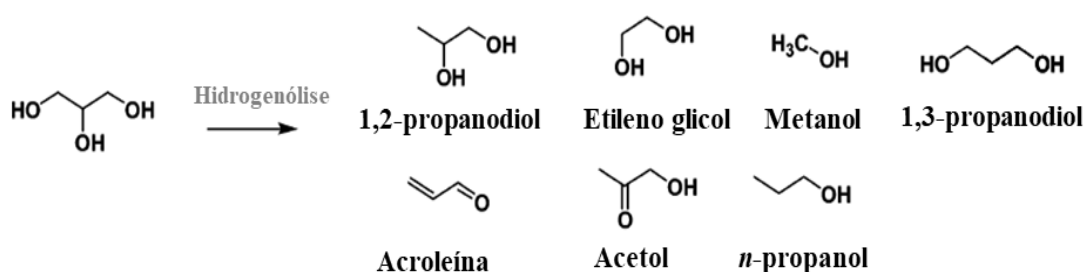
Um exemplo disso é a formação de gliceril carbonato a partir da transesterificação do carbonato de etileno com glicerol usando o carbonato de sódio (Na_2CO_3) como catalisador em temperatura entre 25 °C e 35 °C (CORMA *et al.*, 2007; NAKAGAWA; TOMISHIGE, 2011; ZHOU *et al.*, 2008). O gliceril carbonato oriundo do glicerol pode ser empregado como solvente em cosméticos e fármacos ou destinado à fabricação de revestimentos (ex. poliuretano). Este composto também pode ser aplicado na síntese de compostos com interesse no mercado como o glicidol, que geralmente é utilizado em reações com alcoóis, cetonas e aminas para formar ésteres, éteres e aminopropanodióis, respectivamente.

Assim como os vários produtos derivados do glicerol, todos têm amplas aplicações (CORMA *et al.*, 2007). Por meio de reações entre glicerol e ácidos carboxílicos, e também,

destes últimos com o glicidol, é possível obter mono e diglicerídeos, que são compostos valiosos para as indústrias químicas (ex. produção de alimentos e surfactantes), principalmente por sua biodegradabilidade e não-toxicidade, viabilizando o processo do ponto de vista ambiental.

A reação de hidrogenólise do glicerol também é muito aplicada nas indústrias a fim de obter insumos químicos com amplas aplicações como: 1,2-propanodiol, etileno glicol, metanol, 1,3-propanodiol, acroleína, acetol e n-propanol (Figura 3) (BRANDNER *et al.* 2009; CORMA *et al.*, 2007).

Figura 3 - Produtos obtidos com a hidrogenólise do glicerol



Nota: ~ 24 % de rendimento para 1,3-PDO nesse processo.

Fonte: Adaptado de Corma *et al.* (2007).

A principal rota química de produção de 1,3-propanodiol tem sido a partir da acroleína. Os caminhos reacionais feitos pela DuPont (EUA), inclui hidratação da acroleína, com formação de 3-hidroxipropanol, seguida de hidrogenação a 1,3-propanodiol (SAXENA *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2014). Estes autores ainda destacam que esse tipo de processo exige condições que elevam os custos e, além disso, muitas vezes envolvem o uso de catalisadores e intermediários tóxicos.

Segundo Fiuza Junior (2012), a via mais valorizada da hidrogenólise do glicerol é a responsável pela produção de 1,2-propanodiol. Esse composto, assim como seu isômero (1,3-propanodiol), tem sido destinado à fabricação de polímeros, bem como às indústrias alimentícias e farmacêuticas. Outras possíveis aplicações são sua utilização como agente anticongelante, solvente, umectante para resinas naturais e produção de álcool e hidrocarboneto (propanol e propano) (YANG *et al.*, 2017).

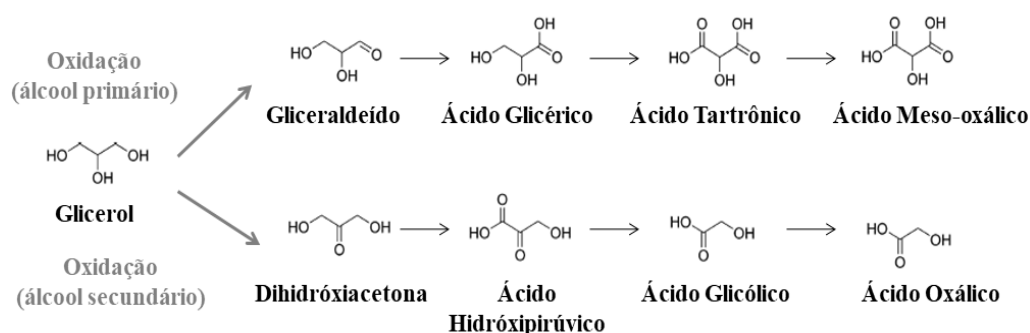
Além de todos estes compostos normalmente produzidos pelas indústrias, também pode ser citada a produção de gás de síntese ($H_2 + CO$) e bio-óleo a partir de processos termoquímicos como a pirólise e gaseificação. Nesses processos, são utilizados resíduos orgânicos como o glicerol, palha de arroz, cana de açúcar (bagaço e palha), casca de coco e

lodo de esgoto (FONTES *et al.*, 2012; TSAI *et al.*, 2006; NG *et al.*, 2017), reforçando e incentivando o reaproveitamento de resíduos orgânicos.

A oxidação do glicerol por meio de processos químicos também é um caminho convencional seguido pelas indústrias e permite a obtenção de ácidos orgânicos, que são essenciais na síntese de novos compostos. Apesar de serem obtidos principalmente por processos químicos, muitos desses produtos também podem ser obtidos por meio de processos biológicos (discutido nas seções seguintes).

Com a oxidação do glicerol, são formados compostos oxigenados provenientes da oxidação do grupo hidroxila do carbono primário ou secundário, como mostra a Figura 4. O ácido glicérico, por exemplo, tem sido muito utilizado no ramo da medicina devido a sua importância como metabólito na glicólise, enquanto que a dihidróxiacetona é empregada em processos de curtimento (CORMA *et al.*, 2007).

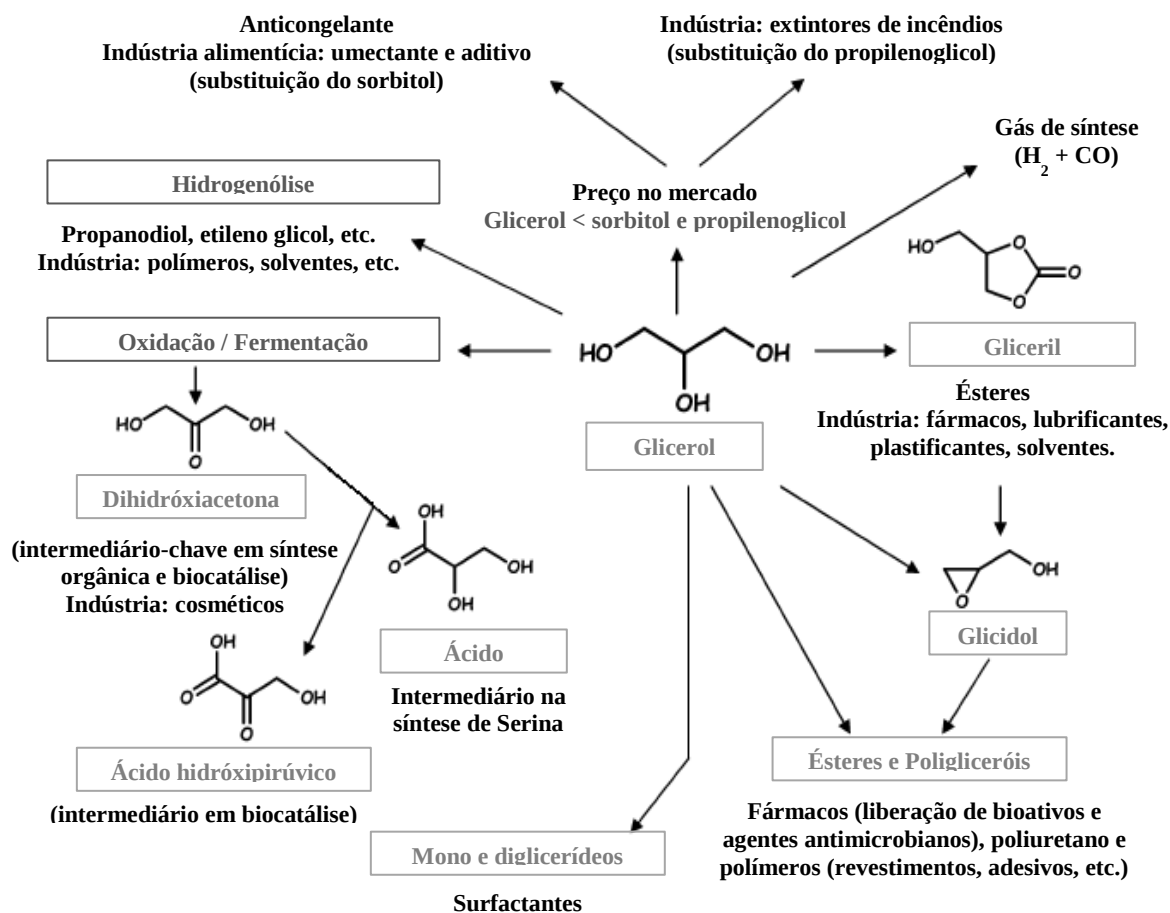
Figura 4 - Produtos da reação de oxidação do glicerol



Fonte: Adaptado de Corma *et al.* (2007).

O esquema apresentado na Figura 5 reúne os principais processos e transformações citados, bem como as aplicações industriais mais comuns dos compostos formados a partir do glicerol. Por muito tempo, muitos desses subprodutos foram obtidos por meio processos químicos. Nesse caso, várias etapas reacionais eram realizadas para formar o composto de interesse, como bem descrito por Corma *et al.* (2007). No entanto, o emprego de processos (i) mais simples, (ii) com menores custos e, muitas vezes, (iii) sem formação de intermediários tóxicos; tem sido valorizado e aos poucos foram marcando presença na cadeia produtiva desses compostos. E, nesse contexto, de modo interessante, principalmente do ponto de vista ambiental, resíduos orgânicos têm sido utilizados como matéria-prima. A biodegradação de resíduos orgânicos como é o caso do glicerol, assim como a produção dos compostos de interesse do presente estudo serão detalhados nas seções seguintes.

Figura 5 - Transformações e aplicações convencionais do glicerol



Fonte: Adaptado de Brander *et al.* (2009) e Corma *et al.* (2007).

2.2.1.2 Processos biológicos e sua importância dentro do conceito de biorrefinaria

O glicerol assim como outros resíduos orgânicos, pode ser utilizado por micro-organismos como fonte de carbono e energia. Segundo Silva *et al.* (2009), sua conversão através da fermentação microbiológica resulta na obtenção de muitos compostos que usualmente são obtidos por meio de processos químicos e termoquímicos nas indústrias, conforme detalhado na seção anterior. Deste modo, seu emprego em processos biológicos tem se mostrado bastante atraente, principalmente, se for considerada a grande quantidade que vem sendo gerada desse resíduo, bem como os menores custos associados (comparado à maioria dos processos convencionais).

Muitos compostos têm sido obtidos a partir da conversão biológica de glicerol, como hidrogênio (FABER; FERREIRA-LEITÃO, 2016; HARON *et al.*, 2018; SARMA *et al.*, 2013), metano (VIANA *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2015), ômega 3 e carotenoides que têm

aplicações farmacêuticas (GUPTA *et al.*, 2013; LEE CHANG *et al.*, 2015), álcoois como o etanol (LEE *et al.*, 2017; VIKROMVARASIRI *et al.*, 2014), 1,3-propanodiol (NAKAZAWA *et al.*, 2017; NAKAZAWA, 2015; VIVEK; PANDEY; BINOD, 2016a; YANG *et al.*, 2017) e butanol (YADAV *et al.*, 2014); poli-hidroxicarboxilatos (BURNIOL-FIGOLS *et al.*, 2018), polióis que são comumente aplicados em indústrias químicas, cosméticas, alimentícias e farmacêuticas (TOMASZEWSKA *et al.*, 2014; UPRETY *et al.*, 2017); e ácidos carboxílicos como: succínico (SADHUKHAN *et al.*, 2016), acético (ZHANG *et al.*, 2015), propiônico (DISHISHA *et al.*, 2015), *n*-butírico (VARRONE *et al.*, 2017) e *n*-capróico (LENG *et al.*, 2017, 2019).

De acordo com de Steinbusch *et al.*, (2011), Vasudevan *et al.* (2014) e Weimer *et al.*, (2015), esses ácidos carboxílicos, têm ampla aplicação como matéria-prima. Nos últimos 10 anos, a obtenção dos ácidos de cadeia média e longa tem recebido destaque por apresentarem baixa relação O/C (oxigênio/carbono) e maior cadeia hidrofóbica em relação aos ácidos de cadeia curta. Essas propriedades facilitam o processo de extração e também sua conversão, principalmente em biocombustíveis.

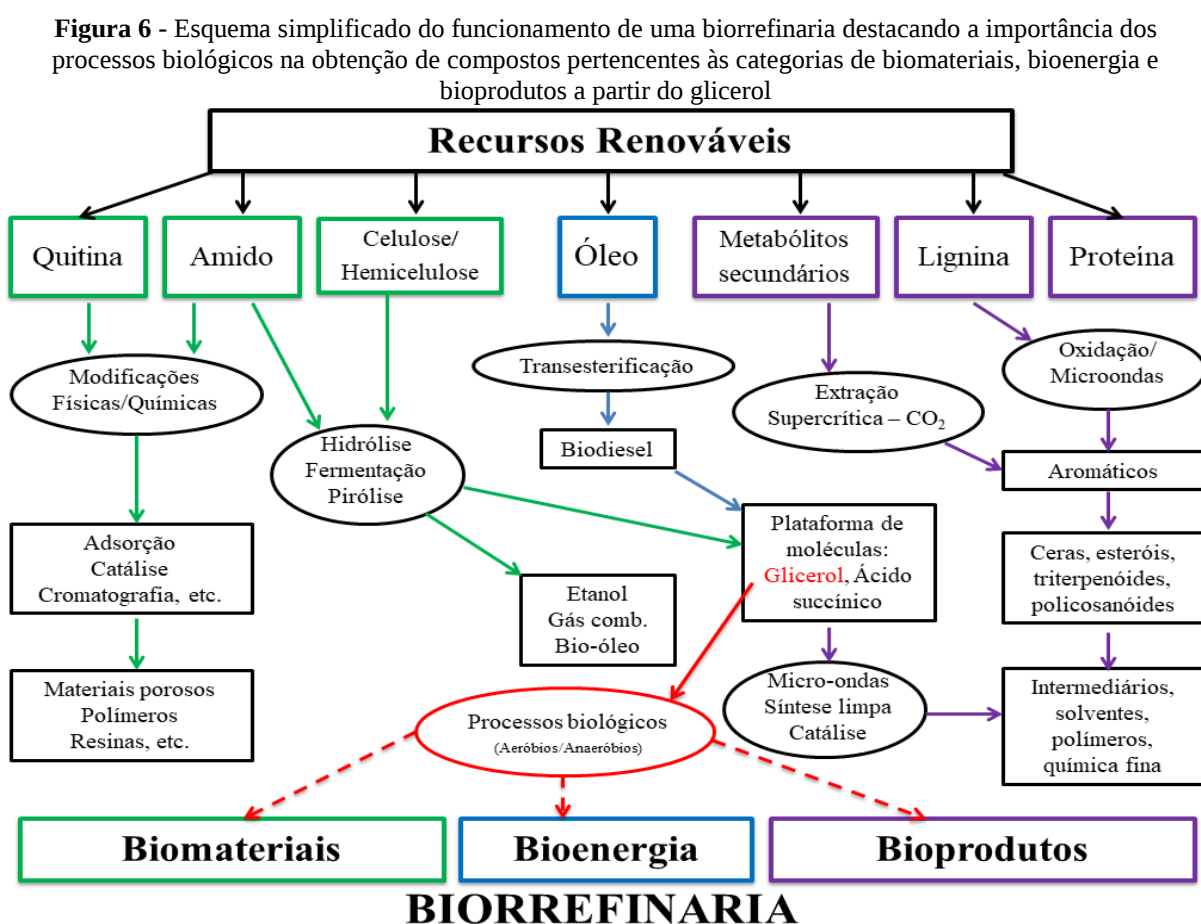
A importância da produção desses ácidos a partir de resíduos orgânicos está diretamente relacionada com a plataforma do carboxilato que integra o conceito de biorrefinaria. Tanto a Seção 3 como as Seções 4 e 5 deste estudo, abordam a produção de compostos interessantes comercialmente, como o ácido valérico (ou valerato, quando está na forma iônica) e o 1,3-propanodiol a partir do glicerol, resíduo orgânico que já vem sendo explorado dentro do conceito de biorrefinaria (CHANG *et al.*, 2010). Os detalhes sobre as rotas metabólicas para obtenção destes compostos bem como alguns micro-organismos envolvidos, estão descritos nas seções seguintes.

O conceito de biorrefinaria inclui a conversão de resíduos orgânicos em produtos que possam ser utilizados como matéria-prima em outros processos. Então, assim como em uma refinaria de petróleo, onde várias correntes são tratadas de forma a maximizar a produção de uma determinada fração ou compostos específicos a partir do petróleo, em uma biorrefinaria tem como objetivo maximizar a obtenção de compostos a partir de resíduos orgânicos, criando uma oportunidade para gerenciar a elevada quantidade que tem sido gerada (AGLER *et al.*, 2011).

Em geral, os produtos formados nas biorrefinarias são separados em três categorias: bioenergia, biomateriais e bioprodutos. Na primeira categoria podem ser empregados vários processos para formar produtos como gás combustível e bio-óleo. Assim como em uma

refinaria de petróleo, eles são reprocessados e normalmente destinados à obtenção de biogás (CH_4), biodiesel e uma variedade de compostos químicos a partir da fração líquida (bio-óleo). O resíduo sólido gerado nessa etapa, também é reaproveitado e geralmente é reintroduzido em processos que necessitam de geração de calor (ex. aquecimento de forno e caldeiras).

Já a segunda categoria é responsável pela conversão de insumos por meio de modificações físico-químicas em materiais (ex. materiais porosos e resinas). A última categoria, por sua vez, envolve a produção de vários compostos, alguns provenientes das categorias anteriores, que são empregados como matéria-prima renovável em indústrias ou na própria biorrefinaria (FRAGMAQ, 2012; CHANG *et al.*, 2010). A Figura 6 mostra alguns insumos e processos empregados para obter produtos classificados nas três categorias citadas.



Fonte: Adaptado de Chang *et al.* (2010).

Salienta-se ainda que o conceito de biorrefinaria envolve duas plataformas bastante conhecidas: a do açúcar e a termoquímica. De acordo com Agler *et al.* (2011) e Angenent e Kleerebezem (2011) a primeira plataforma envolve o uso de enzimas para promover a conversão da biomassa em açúcares de 5 a 6 átomos de carbono (pentoses e hexoses), que em

seguida, são destinados à produção de combustíveis líquidos, principalmente etanol. Já a segunda, aplica sistemas termodinâmicos para converter a biomassa em gás de síntese ($H_2 + CO$), que pode ser utilizado como combustível ou introduzido em outras etapas do processamento a fim de obter outros produtos.

Além destes autores, outros como Chang *et al.* (2010), reportaram que uma terceira importante plataforma, que é a do carboxilato, deveria ser integrada ao conceito de biorrefinaria. Atualmente, e já em prática, o biorrefino utilizando esta plataforma consiste em utilizar resíduos orgânicos industriais ou agrícolas na obtenção de ácidos carboxílicos, principalmente os de cadeia curta e média. Para Lonkar, Fu e Holtzaple (2016), essa plataforma tem se mostrado bastante atraente, visto que é possível obter elevados rendimentos de produtos com menores custos. E, nesse caso, o uso do glicerol como fonte de carbono para micro-organismos em processos biológicos se encaixa perfeitamente nessa plataforma (rota em vermelho, Figura 6).

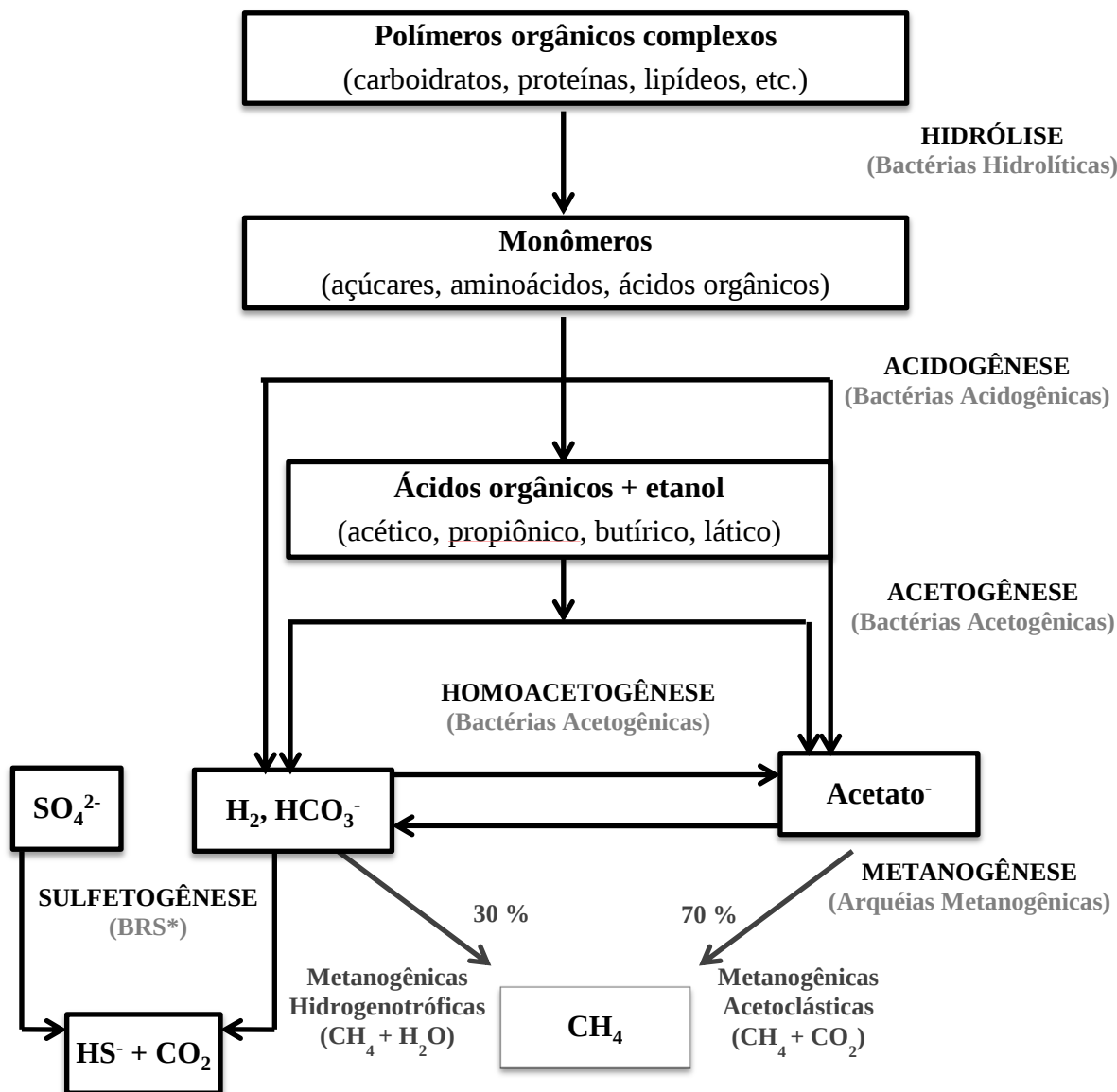
2.3 BIOQUÍMICA DA DEGRADAÇÃO ANAERÓBIA DO GLICEROL

A degradação anaeróbia de materiais orgânicos consiste basicamente em 4 etapas: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese, como mostra a Figura 7. Durante a hidrólise, uma comunidade de micro-organismos atua em conjunto promovendo a quebra de substâncias complexas em compostos mais simples. Essa conversão de polímeros orgânicos complexos em monômeros ocorre pela ação de enzimas extracelulares (ex. amilases, lipases, celulasas, proteases) produzidas por bactérias anaeróbias estritas (AIYUK *et al.*, 2006; GUJER; ZEHNDER, 1983; TYAGI; LO, 2013).

Na segunda fase (acidogênese), os monômeros orgânicos formados durante a hidrólise são utilizados como substratos pelos micro-organismos (aeróbios, anaeróbios e facultativos), resultando na formação de ácidos (acético, propiônico, láctico e butírico), álcool (etanol), hidrogênio (H_2) e dióxido de carbono (CO_2). A acetogênese envolve a conversão por meio da oxidação dos produtos reduzidos formados na etapa anterior em acetato, H_2 e CO_2 pela ação de bactérias acetogênicas. Depois disso, *archaeas* metanogênicas utilizam o acetato, H_2 e CO_2 formados na etapa anterior como substrato e o resultado disto, é a formação de metano (CH_4) (metanogênese). Essa produção de metano pode ocorrer de duas formas: (i) utilizando H_2 e CO_2 (metanogênese hidrogenotrófica) e (ii) utilizando o acetato (metanogênese acetoclástica).

A primeira tem sido reportada como responsável pela produção de 30 % de CH_4 , enquanto que a segunda, por 70 %.

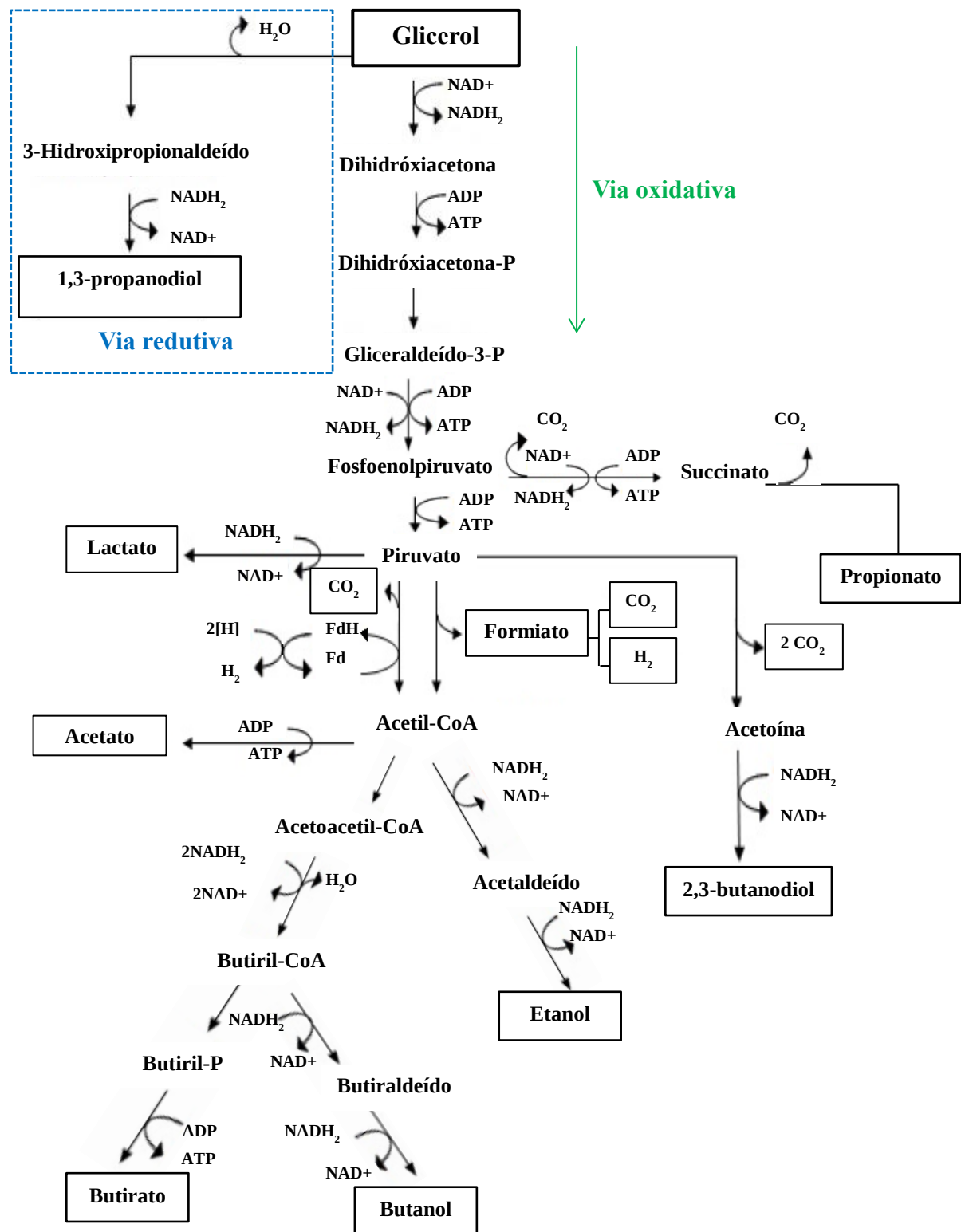
Figura 7 - Esquema simplificado das etapas de degradação anaeróbia da matéria orgânica



*Sendo: BRS = Bactérias Redutoras de Sulfato. **Fonte:** Adaptado de Aiyuk *et al.* (2006) e Foresti (1994).

Similarmente, o glicerol, que por sua vez é um resíduo orgânico, também é utilizado por diversos grupos de micro-organismos e convertido em vários compostos. Várias rotas metabólicas já são conhecidas, podendo acontecer por via redutiva ou oxidativa (SILVA; MACK; CONTIERO, 2009; DROZDZYŃSKA *et al.*, 2014) (Figura 8). Na Tabela 2, estão reunidos os valores de ΔG° para algumas reações da via oxidativa de degradação do glicerol.

Figura 8 - Produtos formados durante a fermentação do glicerol pela ação de diferentes grupos de micro-organismos



Fonte: Adaptado de Silva, Mack e Contiero (2009) e Drozdzyńska *et al.* (2014).

Tabela 2 - Energia livre de Gibbs padrão (ΔG°_r) para alguns caminhos envolvidos na via oxidativa da degradação anaeróbia do glicerol

No.	Reação	$\Delta G^\circ_r(\text{kJ.mol}^{-1})$	Referências
1	$\text{Glicerol} + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{acetato}^- + \text{HCO}_3^- + 2 \text{H}^+ + 3 \text{H}_2$	- 73,2	Thauer <i>et al.</i> (1977)
2	$\text{Glicerol} + \text{CO}_2 \rightarrow \text{succinato}^- + \text{H}_2\text{O} + 2 \text{H}_2$	- 44,5	Spirito <i>et al.</i> (2014)
3	$\text{Glicerol} \rightarrow \text{piruvato}^- + \text{H}^+ + 2 \text{H}_2$	- 25,9	Thauer <i>et al.</i> (1977)
4	$\text{Gliceraldeído} + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{acetato}^- + \text{HCO}_3^- + 2 \text{H}^+ + 2 \text{H}_2$	- 123,6	Thauer <i>et al.</i> (1977)
5	$\text{Gliceraldeído} \rightarrow \text{piruvato}^- + \text{H}^+ + \text{H}_2$	- 76,4	Thauer <i>et al.</i> (1977)
6	$\text{Gliceraldeído} + 6 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 3 \text{HCO}_3^- + 3 \text{H}^+ + 6 \text{H}_2$	- 19,7	Thauer <i>et al.</i> (1977)
7	$2 \text{Piruvato}^- + \text{H}_2\text{O} + 2 \text{H}_2 \rightarrow \text{butanol} + 2 \text{HCO}_3^-$	- 159,0	Thauer <i>et al.</i> (1977)
8	$\text{Piruvato}^- + 2 \text{H}_2 \rightarrow \text{propionato}^- + \text{H}_2\text{O}$	- 123,0	Thauer <i>et al.</i> (1977)
9	$\text{Piruvato}^- + \text{acetato}^- + 2 \text{H}_2 \rightarrow \text{butirato}^- + \text{HCO}_3^-$	- 95,4	Thauer <i>et al.</i> (1977)
10	$2 \text{Piruvato}^- + \text{H}_2\text{O} + 2 \text{H}_2 \rightarrow 2,3\text{-butanodiol} + \text{HCO}_3^- + \text{formiato}^-$	- 85,4	Thauer <i>et al.</i> (1977)
11	$2 \text{Piruvato}^- + 2 \text{H}_2\text{O} + \text{H}_2 \rightarrow 2,3\text{-butanodiol} + 2 \text{HCO}_3^-$	- 84,5	Thauer <i>et al.</i> (1977)
12	$\text{Piruvato}^- + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{acetato}^- + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ + \text{H}_2$	- 47,3	Thauer <i>et al.</i> (1977)
13	$\text{Piruvato}^- + \text{H}_2\text{O} + \text{H}_2 \rightarrow \text{etanol} + \text{HCO}_3^-$	- 56,9	Thauer <i>et al.</i> (1977)
14	$\text{Piruvato}^- + \text{H}_2 \rightarrow \text{lactato}^-$	- 43,1	Thauer <i>et al.</i> (1977)
15	$\text{Piruvato}^- + \text{CoA} \leftrightarrow \text{acetil CoA} + \text{formiato}^-$	- 16,3	Thauer <i>et al.</i> (1977)
16	$\text{Piruvato}^- + 6 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 3 \text{HCO}_3^- + 2 \text{H}^+ + 5 \text{H}_2$	+ 57,3	Thauer <i>et al.</i> (1977)
17	$\text{Lactato}^- + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{acetato}^- + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ + 2 \text{H}_2$	- 4,2	Thauer <i>et al.</i> (1977)
18	$\text{Acetil CoA} + \text{P}_i \leftrightarrow \text{acetil-P} + \text{CoA}$	+ 9,0	Thauer <i>et al.</i> (1977)
19	$\text{Acetil-P} + \text{ADP} \leftrightarrow \text{acetato}^- + \text{ATP}$	- 13,0	Thauer <i>et al.</i> (1977)
20	$\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} + \text{P}_i$	- 31,8	Thauer <i>et al.</i> (1977)
21	$\text{Acetoacetil CoA} + \text{CoA} \leftrightarrow 2 \text{acetil CoA}$	- 25,1	Thauer <i>et al.</i> (1977)
22	$\text{Acetaldeído} + \text{CoA} + \text{NAD}^+ \leftrightarrow \text{acetil CoA} + \text{NADH} + \text{H}^+$	- 17,5	Thauer <i>et al.</i> (1977)
23	$\text{Etanol} + \text{CoA} \leftrightarrow \text{acetil CoA} + 2 \text{H}_2$	+ 45,6	Thauer <i>et al.</i> (1977)
24	$2 \text{acetato}^- + \text{H}^+ + 3 \text{H}_2 \rightarrow 2,3\text{-butanodiol} + 2 \text{H}_2\text{O}$	+ 16,7	Thauer <i>et al.</i> (1977)
25	$2 \text{acetato}^- + \text{H}^+ + 2 \text{H}_2 \rightarrow \text{acetoína} + 2 \text{H}_2\text{O}$	+ 52,3	Thauer <i>et al.</i> (1977)
26	$\text{Acetato} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$	- 31,0	Zinder (1993)
27	$\text{Butirato}^- + \text{H}^+ + 2 \text{H}_2 \rightarrow \text{butanol} + \text{H}_2\text{O}$	- 16,3	Thauer <i>et al.</i> (1977)
28	$\text{Propionato}^- + \text{H}^+ + 2 \text{H}_2 \rightarrow \text{propanol} + \text{H}_2\text{O}$	- 12,1	Thauer <i>et al.</i> (1977)
29	$4 \text{H}_2 + 2 \text{CO}_2 \rightarrow \text{acetato}^- + \text{H}^+ + 2 \text{H}_2\text{O}$	- 95,0	Spirito <i>et al.</i> (2014), Arslan <i>et al.</i> (2016)
30	$\text{CO}_2 + 4 \text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2 \text{H}_2\text{O}$	-131,0	Thauer <i>et al.</i> (1977)

Nota: ΔG°_r para 25 °C, 1 molar, 1 bar e pH = 7. **Fonte:** A autora (2019).

De acordo com Foresti (1994), é difícil avaliar as trocas de energias dentro de sistemas anaeróbios. Essa complexidade depende das concentrações dos diversos metabólitos intermediários. Em vista disso, normalmente são feitas considerações termodinâmicas a partir da variação de energia livre padrão (ΔG° a 1 molar, 1 atm, 25 °C e pH = 7) das principais reações. A análise da variação de energia livre informa a viabilidade das reações, bem como quais delas são mais favoráveis em determinadas condições. Deste modo, entre duas reações (nas mesmas condições), prevalecerá a que apresentar menor valor de ΔG° . Para exemplificar:

entre as reações 1 e 2 (Tabela 2) nas condições padrões, a reação 1 é mais favorável (mais espontânea) porque tem um valor de ΔG° mais negativo. No entanto, se é um produto consumido, como o succinato, a reação 2 pode vir a ser mais favorável. Isso acontece porque os micro-organismos preferem as reações que resultam em um maior ganho global de energia. Uma consequência disto é a relação direta entre a taxa de crescimento microbiano e o consumo de energia.

Mediante o exposto, o controle de alguns parâmetro como pH, concentração de componentes (H_2 , determinados carboxilatos, sulfatos, etc.), temperatura e tempo de retenção hidráulico (TDH), permite direcionar as reações no sentido de formação dos produtos desejados. No entanto, essa tarefa não tem sido fácil, principalmente em sistemas com culturas mistas, onde vários grupos de micro-organismos atuam de forma conjunta (FORESTI, 1994; JANKOWSKA *et al.*, 2018).

Apesar dessa dificuldade, entre as principais vantagens de utilizar o glicerol em processos biológicos, principalmente os fermentativos, estão: maior simplicidade do processo, menores custos operacionais e a possibilidade de utilizar resíduos, agregando vantagens ambientais (ANGENENT *et al.*, 2016; HARON *et al.*, 2018). As sínteses químicas utilizadas para obtenção de novos compostos a partir do glicerol (seção 2.2.1.1) geralmente exigem elevadas temperaturas e pressões, uso de catalisadores e, frequentemente envolvem a produção de intermediários tóxicos. Em virtude disso, estão associados a elevados custos e também, desvantagens do ponto de vista ambiental (JIANG *et al.*, 2016; NAKAZAWA *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2014).

2.3.1 Via redutiva: Produção de 1,3-PDO e micro-organismos envolvidos

O principal produto obtido pela via redutiva da fermentação do glicerol é o 1,3-propanodiol (1,3-PDO) (SILVA; MACK; CONTIERO, 2009). De acordo com Vivek, Pandey e Binod (2016a), o glicerol é considerado um dos melhores substratos para produção de 1,3-PDO. Isso acontece porque os três carbonos ligados a grupos hidroxila, concedem uma natureza redutora.

Como apresentado na Figura 8 (seção anterior), primeiro o glicerol é desidratado formando o 3-hidroxiopropionaldeído. Em seguida, a partir de reação de hidrogenação e ação de transportadores de elétrons ($NADH, H^+ \rightarrow NAD^+$), o 3-hidróxiopropionaldeído, mediado pela vitamina B_{12} , é reduzido e convertido em 1,3-PDO. No entanto, como a bioconversão do

glicerol pode seguir por dois caminhos (via redutiva e oxidativa), enquanto uma parte é convertida em 1,3-PDO, outra pode ser convertida em dihidroxiacetona, seguido de gliceraldeído-3-fosfato e piruvato. E, por último, a partir do piruvato, é possível seguir por diversos caminhos dentro da rota oxidativa e obter produtos como acetato, propionato, butirato, etanol, H₂, butanodiol, etc.; dependendo dos micro-organismos envolvidos (DROZDZYŃSKA *et al.*, 2014; SAXENA *et al.*, 2009; VIVEK; PANDEY; BINOD, 2016b).

O 1,3-PDO é o produto mais antigo de fermentação do glicerol. Ele foi obtido pela primeira vez em 1881, pelo químico austríaco August Freund a partir de glicerol e uma cultura mista, contendo *Clostridium pasteurianum* (WERKMAN; GILLEN, 1932). Apesar de sua descoberta ser antiga, o interesse em produzi-lo em larga escala é relativamente mais recente (SILVA *et al.*, 2014). A partir da década de 90, a produção industrial ganhou destaque após a Shell anunciar a comercialização de um novo polímero obtido a partir da policondensação do ácido tereftálico e 1,3-PDO (DIETZ; ZENG, 2013). O trimetileno politereftalato (PTT) que também é conhecido como polipropileno tereftalato (PPT), apresenta propriedades com vantagens e preços competitivos comparados ao polietileno tereftalato (PET) e butileno politereftalato (PBT) (KURIAN, 2005; VIVEK; PANDEY; BINOD, 2016b; ZENG; BIEBL, 2002; ZENG; SABRA, 2011). O PET e o PBT são comercializados há mais de 50 anos (SILVA *et al.*, 2014).

Entre as empresas que lideram a produção de 1,3-PDO estão a DuPont Tate & Lyle Bioproducts (EUA), Metabolic Explorer S.A. (França), Zhangjiagang Glory Biomaterial Co. Ltd e Zouping Mingxing Chemical (China) (SAXENA *et al.*, 2009; VIVEK; PANDEY; BINOD, 2016a, 2016b). As companhias Shell e DuPont possuem também algumas patentes relacionadas a novos polímeros desenvolvidos a partir do PTT, como Corterra[®] (pela Shell) e Sorona[®] e Hytrel[®] (pela DuPont) (SILVA; MACK; CONTIERO, 2009; KURIAN, 2005). Mais de 100.000 toneladas de 1,3-PDO são produzidas anualmente (JIANG *et al.*, 2016) com valor de mercado igual a € 1,8/kg, quase R\$ 9/kg (BURNIOL-FIGOLS *et al.*, 2018), sendo estimado um aumento em torno de 10 % até 2021.

Diversas espécies ou linhagens do gênero *Clostridium* (CHATZIFRAGKOU *et al.*, 2011; FORSBERG, 1987; LUERS *et al.*, 1997; MENDES *et al.*, 2011), *Lactobacillus* (RICCI *et al.*, 2015; VIVEK; PANDEY; BINOD, 2016a), *Klebsiella* (LEE; JUNG; OH, 2018; YANG *et al.*, 2017; ZHAO; CHEN; YAO, 2006), *Citrobacter* (SILVA; MACK; CONTIERO, 2009; SAXENA *et al.*, 2009), *Hafnia* (DROZDZYŃSKA *et al.*, 2014) e *Enterobacter* (SILVA *et al.*, 2014; YANG *et al.*, 2017) são conhecidos por converter glicerol em 1,3-PDO. Entre estes,

cepas de *Klebsiella pneumoniae* e *Clostridium butyricum* estão entre as mais citadas na literatura devido à elevada produtividade de 1,3-PDO (VIVEK; PANDEY; BINOD, 2016a; YANG *et al.*, 2017). Além das enterobactérias mencionadas (*Klebsiella*, *Citrobacter* e *Enterobacter*), é importante citar que *Escherichia coli* modificada geneticamente já vem sendo utilizada pela DuPont para produzir 1,3-PDO (Susterra[®]), a partir da fermentação da glicose de milho (resíduo agrícola) e, com este, produzir o polímero PTT, denominado comercialmente de Sorona[®] (SILVA *et al.*, 2014).

Esses micro-organismos têm sido estudados utilizando glicerol puro e bruto em diferentes condições, entre elas: aeróbica, microaerofílica e anaeróbia (SAXENA *et al.*, 2009). Além disso, os maiores rendimentos já obtidos são reportados com culturas puras e com co-fermentação entre glicerol e glicose, alguns envolvendo processos com 2 estágios: (i) para formação de glicerol a partir de glicose e (ii) formação de 1,3-PDO do glicerol produzido na etapa 1 (RICCI *et al.*, 2015; TANG *et al.*, 2009; VIVEK; PANDEY; BINOD, 2016a).

Em termos operacionais, muitos estudos foram feitos com temperatura entre 30 e 37 °C e pH entre 5 e 9, sendo a maioria apresentada com pH na faixa de 7. Moscoviz, Trably e Bernet (2016), usando glicerol puro e cultura mista, analisaram o efeito do pH entre 5 e 9, encontrando maiores rendimentos em termos de mol de 1,3-PDO produzido por mol de glicerol consumido, entre 7 e 8 (0,52 e 0,64 mol/mol). Em geral, tem sido apresentados rendimentos entre 0,5 e 0,7 mol de 1,3-PDO por mol de glicerol consumido, principalmente para cepas de *K. pneumoniae* e *C. butyricum* em batelada ou batelada alimentada (DROZDZYŃSKA *et al.*, 2014; SAXENA *et al.*, 2009; YANG *et al.*, 2017; ZENG; SABRA, 2011). Os dados para sistemas contínuos, até então têm se apresentado geralmente entre 0,4 e 0,5 mol/mol, valendo também para o uso de culturas mistas (GALLARDO *et al.*, 2014; MOSCOVIZ; TRABLY; BERNET, 2016; VARRONE *et al.*, 2017).

A conversão teórica de 0,72 mol de 1,3-PDO por mol de glicerol consumido foi reportada por Zeng (1996), desconsiderando a produção de H₂ e butirato. Em virtude disso, para tentar aumentar o rendimento, algumas pesquisas foram feitas envolvendo a co-fermentação de glicerol e açúcares. Vivek, Pandey e Binod (2016a) avaliaram a produção de 1,3-PDO por uma cultura pura de *Lactobacillus brevis* com co-fermentação e obtiveram um rendimento máximo (1,04 mol/mol) usando 2,5 % de glicose em pH 8,5 e temperatura de 37 °C. Além disso, obtiveram valores entre 0,69 e 0,86 mol/mol usando frutose, maltose e manitol. Tang *et al.* (2009), também obtiveram rendimentos acima dos valores reportados pela literatura (1,09 mol/mol) usando cultura pura de *E. coli* com genes modificados. Os

experimentos foram em batelada e com fermentação em 2 etapas (aeróbica e anaeróbia), em pH em torno de 7 e com temperatura variando de 30 a 42 °C. No entanto, alguns autores apresentam rendimentos com glicerol e produção de 1,3-PDO (sem co-fermentação com outros substratos) um pouco acima de 0,72 mol/mol (Ver Tabela 3).

Um problema com o uso em larga escala de cultivos puros está associado a várias exigências operacionais como, por exemplo: (i) meios nutricionais específicos; (ii) novas fontes de substrato como acontece na co-fermentação; (iii) manter o meio livre de outros micro-organismos, o que é bastante complicado visto que o glicerol bruto não é um substrato estéril e (iv) muitas cepas são patogênicas e de difícil acesso. Como consequência disso, têm-se vários desafios. Para Nakazawa *et al.* (2017), esses desafios podem tornar o processo economicamente inviável, além de envolverem maiores custos.

Em virtude disso, estudos vêm sendo desenvolvidos envolvendo culturas mistas e têm destacados alguns pontos importantes como: (i) maior facilidade de controle operacional; (ii) permitem elevada produção de metabólitos; (iii) envolvem elevada diversidade microbiana capaz de degradar substratos brutos (não estéreis) e (iv) menores custos (CAVALCANTE *et al.*, 2017). No entanto, ainda há um número menor de trabalhos, principalmente envolvendo sistemas contínuos.

Nakazawa *et al.* (2017), utilizando glicerol puro e culturas mistas em reator UASB em escala de bancada, obtiveram um rendimento médio em torno de 0,43 mol de 1,3-PDO/ mol de glicerol com pH efluente 5 e temperatura de 30 °C. Gallardo *et al.* (2014), utilizando três reatores anaeróbios de leito granular expandido (EGSB) em paralelo e glicerol puro, também com cultura mista, obtiveram um rendimento médio de 0,52 mol de 1,3-PDO/mol de glicerol com temperatura de 37 °C e pH efluente entre 5 e 6. A Tabela 3 reúne alguns trabalhos referenciados relacionados com a produção de 1,3-PDO com culturas puras e mistas a partir de glicerol (puro ou bruto).

Mediante o exposto, é interessante desenvolver novas pesquisas envolvendo cultivos mistos, principalmente a partir de glicerol bruto, visando contribuir com materiais e conhecimento necessário para implantação de processos de produção mais simples, com menores custos e ambientalmente viáveis. O efeito de alguns parâmetros operacionais sobre a produção de 1,3-PDO, bem como os produtos da via oxidativa (carboxilatos) será descrito mais adiante.

Tabela 3 - Alguns dados reportados sobre o rendimento de 1,3-propanodiol obtido a partir de diferentes técnicas de fermentação e utilizando glicerol como substrato sob diferentes condições de temperatura e pH.

Tipo de fermentação	Micro-organismo	Glicerol (Puro/bruto)	pH	T (°C)	Rendimento (mol.mol ⁻¹)	Referência
Batelada (2 estágios)	<i>Lactobacillus reuteri</i> (DSM 20016)	Bruto ^a	5,5	37	0,42	Ricci <i>et al.</i> (2015)
Batelada (2 estágios)	<i>Lactobacillus reuteri</i> (DSM 20016)	Bruto ^b	5,5	37	0,39	Ricci <i>et al.</i> (2015)
Batelada	<i>Lactobacillus brevis</i> (N1E9.3.3)	Bruto ^c	5,0 - 9,0	37	0,69 - 0,86	Vivek, Pandey e Binod (2016a)
Batelada	<i>Citrobacter freundii</i> (AD 119)	Puro ^d	4,7 - 6,2	30 - 37	0,58 - 0,72	Drozdzyńska <i>et al.</i> (2014)
Batelada	<i>Hafnia alvei</i> (AD 27)	Puro ^d	5,0 - 6,2	30 - 37	0,22 - 0,32	Drozdzyńska <i>et al.</i> (2014)
Batelada	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (JP 217)	Puro ^d	4,7 - 6,5	30 - 37	0,43 - 0,53	Drozdzyńska <i>et al.</i> (2014)
Batelada	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 8724 e ZJU 5205)	Puro	7,0 - 7,5	37	0,63 e 0,65	Yang <i>et al.</i> (2017), Zhao <i>et al.</i> (2006)
Batelada	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 8724)	Bruto	7,0 - 7,5	37	0,65	Yang <i>et al.</i> (2017)
Batelada	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 8724)	Puro ^e	7,0 - 7,5	37	0,77	Yang <i>et al.</i> (2017)
Batelada + CE	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 8724)	Puro	7,5	37	0,64	Yang <i>et al.</i> (2017)
Reator de leito fixo + CE	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ZJU 5205)	Puro	7,0	37	0,43	Zhao <i>et al.</i> (2006)
Batelada alimentada	<i>Clostridium butyricum</i> (VPI 1718)	Bruto	6,8	30	0,63	Chatzifragkou <i>et al.</i> (2011)
Batelada	<i>Escherichia coli</i> modificada	Puro	7,0	37	0,40	Przystałowska <i>et al.</i> (2015)
Batelada	Cultura mista	Puro	5,0 - 9,0	37	0,52 - 0,64	Moscoviz <i>et al.</i> (2016)
Reator UASB	Cultura mista	Puro	5,0	30	0,43	Nakazawa <i>et al.</i> (2017)
Reator EGSB	Cultura mista	Puro	5,0 - 6,0	37	0,52	Gallardo <i>et al.</i> (2014)
Batelada	Cultura mista*	Bruto	7,0	37	0,52 - 0,76	Dietz e Zeng (2013)
Reator CSTR	Cultura mista	Bruto	5,5	37	0,46 - 0,52	Varrone <i>et al.</i> (2017)

Fonte: A autora (2019). Onde CE – células imobilizadas.

*Os autores apresentaram resultados usando dois tipos de cultura mista.

^a Co-fermentação entre glicerol bruto e glicose.

^b Co-fermentação entre glicerol bruto e glicose derivada de material lignocelulósico hidrolisado.

^c Co-fermentação usando glicerol bruto e açúcares como frutose, manitol, maltose e glicose.

^d Glicerol puro com diferentes meios nutricionais.

^e Glicerol puro com adição de sais em relação a outros resultados reportados pelos mesmos autores.

2.3.2 Via oxidativa: Produção de carboxilatos e reações de alongamento de cadeia

Conforme exposto na Figura 8, a rota de oxidação biológica do glicerol permite a obtenção de vários produtos, incluindo ácidos e álcoois. No entanto, em culturas mistas, esses compostos podem servir de substrato e formar novos produtos, também com interesse comercial. Um exemplo disso são os ácidos carboxílicos de cadeia média (ACCM) formados a partir de reações de alongamento de cadeia envolvendo ácidos carboxílicos de cadeia curta (ACCC) (ex. acético, propiônico) e doadores de elétrons (CAVALCANTE *et al.*, 2017). Entre os doadores de elétrons mencionados estão o etanol (GROOTSCHOLTEN *et al.*, 2013b), lactato (KUCEK; NGUYEN; ANGENENT, 2016), metanol (CHEN *et al.*, 2016) e propanol (WEIMER; STEVENSON, 2012) sendo os dois primeiros mais citados pela literatura.

Os ACCM têm recebido destaque pelas diversas possibilidades de aplicações, como mencionado na Seção 2.2.1.2. Alguns autores como Jeon *et al.* (2016) consideram ácidos de cadeia média compostos com 5 a 8 átomos de carbono (C5 – C8): valérico (ou pentanóico), caproico (hexanóico), enântico (heptanóico) e caprílico (octanóico). Por outro lado, autores como Lonkar, Fu e Holtzapple (2016) consideram como ACCM, os compostos com 6 a 8 átomos de carbono (C6 – C8) e como ACCC, compostos com 2 a 5 átomos de carbono (C2 – C5). Em vista dessas divergências, no presente estudo, o ácido valérico (ou valerato, como chamado na forma ionizada) será considerado um ACCM, seguindo o que foi mencionado por autores como Jeon *et al.* (2016).

O alongamento de cadeia responsável pela conversão dos ACCC em ACCM ocorre em ciclos de β -oxidação reversa (KUCEK *et al.*, 2016). Cavalcante *et al.* (2017), em sua revisão, apresentaram um esquema detalhado sobre o funcionamento desses ciclos para o alongamento de cadeias pares, com foco na produção de caproato usando etanol ou lactato como doador de elétrons. Estes autores mencionaram que o alongamento de acetato a caproato envolve basicamente 3 etapas: (i) oxidação do etanol a acetato para geração de energia (ATP, adenosina trifosfato); (ii) conversão do etanol remanescente em acetil-CoA, permitindo o (iii) alongamento de acetato a butirato a partir de ciclos entre a coenzima, NADH,H⁺ e FADH₂. Durante o primeiro ciclo, o acetato se liga a coenzima do butiril-CoA, resultando em butirato. Em seguida, de maneira semelhante, o butirato se liga a coenzima do hexanoil-CoA, formando caproato. Estes ciclos permitem a oxidação do etanol em acetil-CoA por NAD⁺ e a redução endergônica (onde o ΔG dos produtos é maior do que dos reagentes) de ferredoxina por NADH,H⁺. De forma semelhante, o alongamento de cadeias ímpares também

é possível a partir de propionato e doador de elétrons. Neste caso, o propionato atuaria no lugar do acetato, resultando em valerato (no lugar de butirato) e em seguida, heptanoato (ao invés de caproato) (ANGENENT *et al.*, 2016).

Entre os micro-organismos mais discutidos nos processos de alongamento, podem ser mencionados os pertencentes ao gênero *Clostridium* e *Megasphaera*, sendo *C. kluyveri* e *M. elsdenii*, as espécies mais citadas (ANDERSEN *et al.*, 2017; ANGENENT *et al.*, 2016). Este último tem sido destacado como responsável pela produção de vários carboxilatos como: formiato, acetato, propionato, butirato, valerato e caproato a partir de glicose e lactato (JEON *et al.*, 2016). Na Tabela 4, estão reunidas algumas reações envolvidas no alongamento de cadeia usando etanol como doador de elétrons, em complemento às reações apresentadas na Tabela 2 para as rotas de bioconversão do glicerol pela via oxidativa.

Tabela 4 - Energia livre de Gibbs padrão (ΔG°_r) de algumas reações envolvidas no alongamento de cadeia

No.	Reação	ΔG°_r (kJ.mol ⁻¹)	Referências
31	Etanol + H ₂ O → acetato ⁻ + H ⁺ + 2 H ₂	+ 9,7	Thauer <i>et al.</i> (1968), Thauer <i>et al.</i> (1977), Seedorf <i>et al.</i> (2008), Ding <i>et al.</i> (2010)
32	Etanol + acetato ⁻ → butirato ⁻ + H ₂ O	- 38,7	Thauer <i>et al.</i> (1977), Spirito <i>et al.</i> (2014), Seedorf <i>et al.</i> (2008)
33	Etanol + propionato ⁻ → valerato ⁻ + H ₂ O	- 38,7	Ding <i>et al.</i> (2010)
34	2 Etanol + acetato ⁻ → caproato ⁻ + 2 H ₂ O	- 77,5	Thauer <i>et al.</i> (1977), Ding <i>et al.</i> (2010)
35	Etanol + butirato ⁻ → caproato ⁻ + H ₂ O	- 38,7	Seedorf <i>et al.</i> (2008)
36	2 acetato ⁻ + H ⁺ + 2 H ₂ → butirato ⁻ + 2 H ₂ O	- 48,1	Thauer <i>et al.</i> (1977)
37	Acetato ⁻ + propionato ⁻ + H ⁺ + 2 H ₂ → valerato ⁻ + 2 H ₂ O	- 48,1	Thauer <i>et al.</i> (1977)
38	Acetato ⁻ + butirato ⁻ + H ⁺ + 2 H ₂ → caproato ⁻ + 2 H ₂ O	- 48,1	Thauer <i>et al.</i> (1977)
39	3 acetato ⁻ + 2 H ⁺ + 4 H ₂ → caproato ⁻ + 4 H ₂ O	- 177,0	Steinbusch <i>et al.</i> (2011)
40	Lactato ⁻ + acetato ⁻ + H ⁺ → butirato ⁻ + CO ₂ + H ₂ O	- 57,7	Spirito <i>et al.</i> (2014)

Fonte: A autora (2019). Nota: ΔG°_r para 25 °C, 1 molar, 1 bar e pH = 7.

Alguns estudos citam a produção de ACCM por micro-organismos que podem formar produtos de alongamento com cadeias pares ou ímpares (STEINBUSCH *et al.*, 2011; WEIMER; NERDAHL; BRANDL, 2015). De acordo com Bornstein e Barker (1948), os mesmos micro-organismos envolvidos na formação de produtos alongados com cadeias pares (ex. caproato) podem produzir compostos com cadeias ímpares (ex. valerato). E isso é possível porque eles são capazes de se adaptar à disponibilidade de outros substratos. Estes autores apresentaram a formação de valerato unicamente a partir de etanol e propionato usando uma cultura pura de *C. kluyveri*. Depois disso, também mostraram que utilizando somente etanol e acetato com a mesma cultura pura, o ACCM produzido foi caproato.

A partir do glicerol é possível obter tanto propionato (BARBIRATO; CHEDAILLE; BORIES, 1997; DISHISHA *et al.*, 2015) como acetato (SEIFERT *et al.*, 2009; TEMUDO *et al.*, 2008a), em quantidades que podem variar de acordo com algumas condições. Mas, além disso, diferentemente dos substratos puros utilizados por Bornstein e Barker (1948) e dos resíduos orgânicos já contendo etanol (~15 %) em sua constituição, utilizados por Agler *et al.* (2012) e Ge *et al.* (2015), o glicerol bruto não possui inicialmente doadores de elétrons em concentrações significativas.

Por isso, com a adição de doadores de elétrons, o glicerol pode se tornar um forte candidato para a obtenção de produtos de alongamento de cadeia. A necessidade da adição de um doador de elétrons (etanol ou lactato, por exemplo) ocorre porque geralmente a sua produção é pequena durante a fermentação do glicerol. No caso da produção de caproato, por exemplo, em situações onde a proporção estequiométrica entre etanol e acetato é inferior a 2:1 (quantidade necessária para formação de caproato), todo etanol reage com acetato para formar butirato, desfavorecendo a produção de caproato (SPIRITO *et al.*, 2014). Por isso, o emprego de doadores de elétrons é importante para os processos que envolvem alongamento de cadeia.

Diante do exposto, ACCM com cadeias pares ou ímpares podem ser obtidos usando o glicerol se a microbiota existente e as condições operacionais permitirem a produção prévia de ACCC necessários; ou seja, quantidades significativas de acetato para produtos de alongamento com cadeias pares e de propionato para cadeias ímpares. Entretanto, para que isso seja possível, é necessário compreender os efeitos de alguns fatores sobre o processo, como: concentração limite dos metabólitos e de doador de elétrons, para evitar inibição da atividade dos micro-organismos; carga de substrato; pH; tempo de detenção hidráulico; e pressão parcial de H₂.

Entre os ACCM estudados, o caproato (C6) tem sido foco da maioria das pesquisas mais recentes (AGLER *et al.*, 2011, 2014; CAVALCANTE *et al.*, 2017; CHEN *et al.*, 2016; DING; TAN; WANG, 2010; VASUDEVAN; RICHTER; ANGENENT, 2014; WEIMER; NERDAHL; BRANDL, 2015), onde algumas envolvem também o uso de resíduos orgânicos como substratos (AGLER *et al.*, 2012; GE *et al.*, 2015; KUCEK *et al.*, 2016). Esse interesse está diretamente associado às diversas aplicações do ácido caproico, entre elas: agente antimicrobiano em ração animal, aditivo aromatizante (indústria alimentícia), matéria-prima para a indústria química e como precursor de biocombustíveis (ANDERSEN *et al.*, 2017; CAVALCANTE *et al.*, 2017).

A produção de heptanoato (C7) e caprilato (C8) tem sido reportada por um número menor de trabalhos comparado à do caproato. E um dos motivos para isso é a relação inversamente proporcional entre a taxa de produção e o maior número de carbonos do carboxilato (BORNSTEIN; BARKER, 1948), resultando em menores rendimentos usando tecnologias similares. O heptanoato (C7) tem sido obtido principalmente por meio de processos termoquímicos. De maneira semelhante aos demais ACCM, ele possui várias aplicações que incluem o uso como agente antimicrobiano, produção de biodiesel e bioplásticos (GROOTSCHOLTEN *et al.*, 2013a). Com relação ao caprilato, poucos trabalhos têm sido apresentados sobre a sua produção, sendo a maioria publicada juntamente com a produção de caproato (KUCEK *et al.*, 2016; STEINBUSCH *et al.*, 2011).

Já o valerato (C5), foco do presente estudo, até então foi reportado como intermediário para a produção de heptanoato (com substratos puros) (GROOTSCHOLTEN *et al.*, 2013a), ou seu destaque foi dado ao emprego de culturas puras (DHANDE; XIONG; ZHANG, 2012). Além disso, estes últimos autores mencionaram que a produção de valérico e 2-metil butanoico foram reportadas em estudos envolvendo micro-organismos presentes no rúmen (valérico) e parasitas intestinais (2-metil butanoico). No entanto, os valores da quantidade produzida não eram significativos. Eles resolveram investigar a produção desses compostos a partir de uma cultura pura de *E. coli* e glicose, como uma alternativa para o método de produção convencional. Como resultado, em termos de produção total, obtiveram 22,1 % de valérico e 16,6 % de 2-metil butanoico. Já Grootscholten *et al.* (2013a), durante sua investigação para produção de heptanoato a partir de etanol, acetato e propionato, reportaram a produção de 28 % e 39 % de valerato (como intermediário) entre os produtos totais. No entanto, é importante destacar que nenhum estudo explorou a produção biológica de ácido valérico a partir de glicerol e culturas mistas, principalmente em sistemas contínuos, como foi feito no presente estudo.

2.3.3 Ácido valérico: Processos termoquímicos versus processos biológicos

Há mais de 20 anos, o ácido valérico já despertava interesse comercial principalmente por ser um composto-base para novos lubrificantes. Naquele tempo, ele foi usado para síntese de ésteres que eram destinados como substitutos de CFC em sistemas de refrigeração. O método convencional incluía a hidroformilação de olefinas com gás de síntese ($H_2 + CO$) para formação de valeraldeído, seguida de oxidação desse composto para produção do ácido. Para

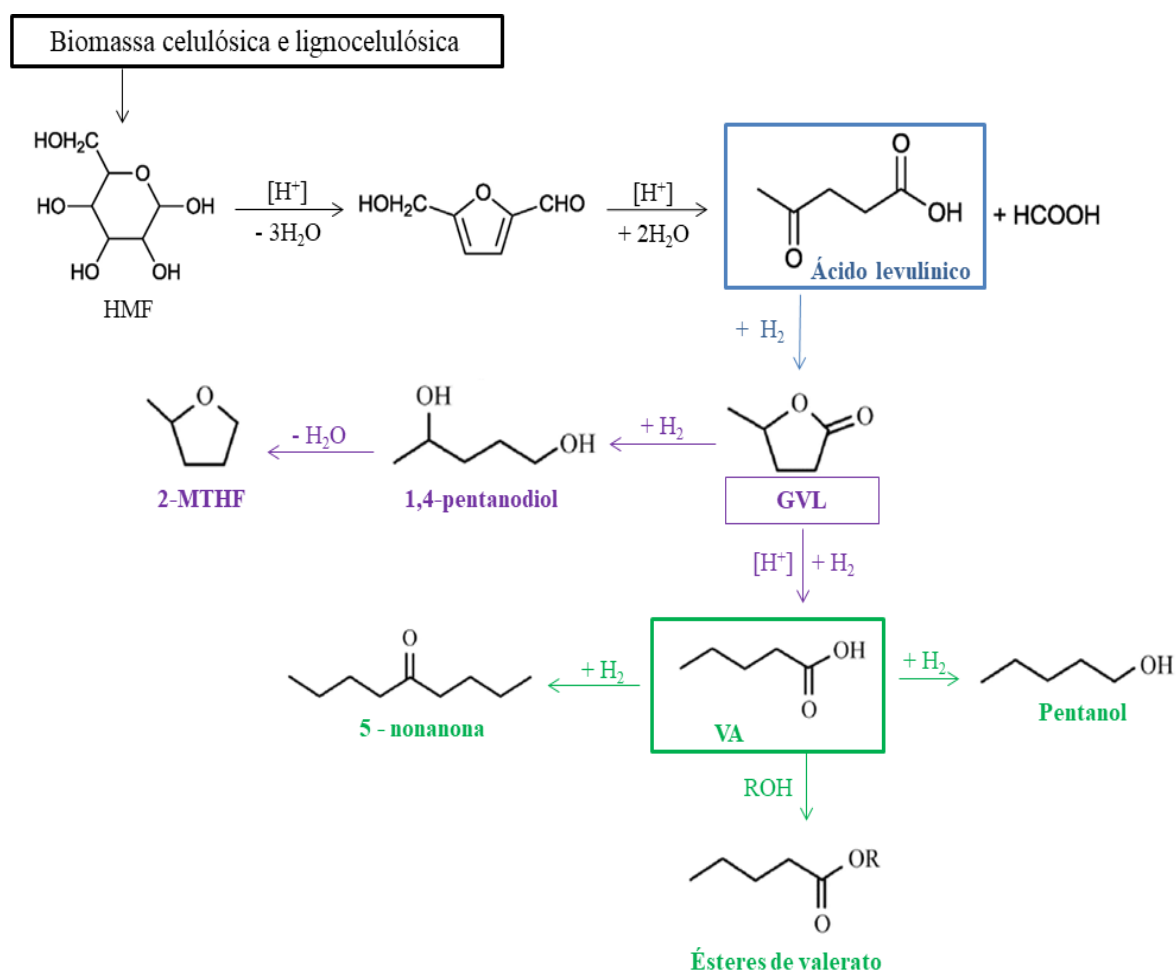
isso, eram empregados processos catalíticos, com cobalto e elevadas pressões ou com ródio e baixas pressões. No entanto, essas duas maneiras envolviam maiores custos e também não eram processos viáveis do ponto de vista ambiental (BAHRMANN *et al.*, 1997).

Com o passar do tempo, o uso de resíduos orgânicos (biomassa) para produção de compostos-base para diversos fins industriais, incluindo biocombustíveis, se tornou bastante atraente e foi responsável pelo desenvolvimento de tecnologias com uso de fonte renováveis em substituição às de origem fóssil (GU *et al.*, 2017). Diante disso, a produção de ácido valérico passou a acontecer principalmente por meio de processos químicos e termoquímicos envolvendo o uso indireto de biomassa e catalisadores (KUMAR *et al.*, 2017; PAES *et al.*, 2017).

Na realidade, o ácido valérico tem sido produzido a partir do ácido levulínico, um intermediário valioso que é obtido a partir do hidroximetilfurfural, resultante da pirólise de biomassa celulósica e lignocelulósica (CORMA *et al.*, 2014). O ácido levulínico é um composto-chave, bastante aplicado na plataforma de moléculas (ver Figura 6, Seção 2.2.1.2), podendo ser convertido em vários compostos (Figura 9), como: γ -valerolactona e ácido valérico. Estes dois, por sua vez, são amplamente empregados para produção de ésteres, 2-metiltetrahidrofurano, 5-nonanona e pentanol (GU *et al.*, 2017). De acordo com Kumar *et al.* (2017), o emprego dos ésteres de valerato como agentes de mistura tanto na gasolina como no diesel tem feito do ácido valérico um candidato em potencial para as indústrias de biocombustíveis.

Conforme esquema contido na Figura 9, a produção convencional envolve várias etapas desde o uso da biomassa até a formação de ácido valérico, incluindo várias reações de hidrogenação. Entre as vantagens estão o elevado rendimento e a seletividade. Gu *et al.* (2017), usando ácido levulínico e catalisador (Pt/HZSM-5), reportaram um rendimento de ácido valérico de 91,4 %. Wu *et al.* (2018) conseguiram converter 99 % de ácido levulínico a GVL (99 % de seletividade) usando Ru/C como catalisador. Estes autores também testaram a produção de 1,3-PDO a partir do glicerol com o mesmo método, obtendo baixa conversão (11 %) e seletividade menor ainda; isso poderia justificar o uso pouco explorado do glicerol para produção de ácido valérico usando estes métodos.

Dessa maneira, com o presente estudo, pretende-se contribuir para uma nova alternativa de produção do ácido valérico, incluindo o uso de glicerol como fonte renovável em processos biológicos, visando reduzir o número de etapas e os custos, permitindo uma produção mais limpa sem uso de catalisadores.

Figura 9 - Rotas para produção de ácido valérico e seus derivados a partir de ácido levulínico

Sendo: HMF = hidroximetilfurfural, 2-MTHF = 2-metiltetrahidrofurano, GVL = γ -valerolactona e VA = ácido valérico. **Fonte:** Adaptado de Gu *et al.* (2017) e Corma *et al.* (2014).

2.4 PARÂMETROS OPERACIONAIS: EFEITOS SOBRE OS PRODUTOS E ATIVIDADE MICROBIANA

De acordo com Arslan *et al.* (2016), o controle dos processos envolvendo culturas mistas é complexo, sendo necessário compreender o efeito de alguns parâmetros sobre a atividade microbiana. Em termos operacionais, a produção de carboxilatos (via oxidativa) e 1,3-PDO (via redutiva) tem sido reportada a partir de vários métodos e em diferentes condições para concentração e tipo de substrato, carga orgânica, TDH, pH, temperatura, composição dos gases e toxicidade dos metabólitos (ARSLAN *et al.*, 2016). Diante da complexidade em torno do uso de culturas mistas e o controle desses parâmetros, alguns estudos têm reunido informações para tentar esclarecer alguns efeitos observados.

2.4.1 Concentração inicial e tipo de substrato

Estudos anteriores mostram que em experimentos em batelada ou com reatores do tipo CSTR (*continuous flow stirred-tank reactor*), os rendimentos obtidos para a produção de carboxilatos ficaram entre 10 % e 60 % (em termos de g de carboxilatos totais por g de substrato consumido). Esse percentual chegou a 70 % usando testes em batelada e substratos à base de resíduos ricos em carboidratos da indústria alimentícia. Já em sistemas contínuos, os rendimentos ficaram entre 30 % e 50 % considerando o uso de glicose, sacarose e resíduos agrícolas (ex. bagaço de cana-de-açúcar) (ARSLAN *et al.*, 2016).

Os inóculos provenientes de diferentes fontes, bem como o tipo de substrato empregado, são responsáveis pela variedade de micro-organismos presentes e pela diversidade de metabólitos, que vão contribuir para o direcionamento das reações de acordo com as necessidades energéticas dos micro-organismos. Ainda segundo Arslan *et al.* (2016), substrato ricos em proteínas tendem a formar mais compostos com cadeias ímpares (ex. propionato, valerato). De forma semelhante, o uso de lodo primário ou lodos ativados contendo proteínas no inóculo podem aumentar a produção de propionato e valerato.

Além do tipo de substrato, é importante avaliar o efeito de sua concentração inicial. A quantidade de NADH/ H^+ está diretamente relacionada à quantidade de substrato no meio, podendo apresentar tendência em formar compostos mais oxidados (ex. acetato, propionato) ou reduzidos (butirato, valerato, caproato, etc.) (ARSLAN *et al.*, 2016; DROZDZYNSKA *et al.*, 2014). Sendo assim, em processos de alongamento, é importante observar o efeito do aumento da concentração de substrato para manter a quantidade de doador de elétrons suficiente para garantir as demais etapas de alongamento.

2.4.2 Carga orgânica e tempo de detenção hidráulico (TDH)

A carga orgânica determina a relação alimento/micro-organismo (A/M) e combina o efeito da concentração inicial do substrato e TDH (ARSLAN *et al.*, 2016). Com base em vários trabalhos envolvendo produção de carboxilatos, estes autores reportaram cargas numa faixa entre 5 e 50 g DQO.L⁻¹.d⁻¹.

Além disso, observaram que o aumento na carga orgânica pode influenciar o processo de duas maneiras: (i) com aumento da concentração de substrato e mesmo TDH, houve uma tendência em formar produtos mais reduzidos (Ex. butirato, valerato, caproato) e (ii)

mantendo a concentração e diminuindo o TDH, a hidrólise dos substratos foi menos efetiva ou uma maior produção de acetato foi observada, devido ao menor tempo de crescimento das bactérias produtoras de acetato; este último efeito também foi observado por Temudo *et al.* (2008b).

Segundo Saxena *et al.* (2009), o maior rendimento de 1,3-PDO é obtido quando somente acetato é produzido como produto da via de oxidação. Dessa maneira, o controle adequado desse parâmetro pode contribuir para o direcionamento das reações no sentido dos produtos da via oxidativa ou redutiva.

Já o TDH é um parâmetro importante para o desenvolvimento dos micro-organismos e seleção dos grupos dominantes. TDH curtos favorecem os produtos formados pelos grupos de micro-organismos com crescimento rápido e desfavorecerem os com crescimento mais lento (ARSLAN *et al.*, 2016). É importante mencionar também que TDH mais longos exigem maiores volumes de reator, mas favorecem a hidrólise completa do substrato (etapa mais lenta da fermentação dos substratos) (JANKOWSKA *et al.*, 2018).

Em geral os trabalhos envolvendo produção de 1,3-PDO a partir de glicerol reportam valores baixos para o TDH (0,5 – 1 dia) quando comparados aos dados para produção de carboxilatos com outros tipos de substratos (0,1 – 15 dias) (ARSLAN *et al.*, 2016; GALLARDO *et al.*, 2014; JANKOWSKA *et al.*, 2018; KUCZMAN *et al.*, 2017; VARRONE *et al.*, 2017). Com relação à produção de ácidos, Arslan *et al.* (2016) também mostraram que quanto maior a cadeia, maior será o tempo necessário para formação do composto. E, nesse caso, quanto maior o TDH, maior será a tendência em formar compostos mais reduzidos (ex. butirato, valerato, caproato).

Apesar do TDH e carga orgânica serem considerados importantes parâmetros operacionais para o controle da estabilidade e produtividade do processo, é importante salientar que a questão sobre como precisamente eles influenciam a produção não está totalmente revelada, devendo sempre levar em consideração o efeito em conjunto com outros parâmetros (JANKOWSKA *et al.*, 2018).

2.4.3 Temperatura, pH e meio nutricional

A atividade microbiana é influenciada também pela composição do meio nutricional, sendo possível elevar os rendimentos de determinados produtos apenas fazendo câmbios de componentes. Deste modo, a fim de reduzir custos, devem ser feitas adaptações dependendo

da composição do substrato. No caso do glicerol bruto, os elementos nutricionais presentes em sua composição variam de acordo com a matéria-prima e processo empregado na produção de biodiesel (HU *et al.*, 2012). Um exemplo disso foi os resultados apresentado por Drozdzyńska *et al.* (2014) e Yang *et al.* (2017) para produção de 1,3-PDO usando glicerol (Tabela 3, Seção 2.3.1).

Com relação à temperatura, a atividade microbiana é favorecida em condições mesofílicas, sendo a temperatura de operação da maioria dos trabalhos, na faixa entre 30 e 37 °C (JANKOWSKA *et al.*, 2018). Podendo ser encontrados valores um pouco maiores para a produção de 1,3-PDO (37 - 42 °C) (GALLARDO *et al.*, 2014; RICCI *et al.*, 2015; TANG *et al.*, 2009; VARRONE *et al.*, 2017).

O pH desempenha um papel importante durante as etapas de hidrólise e acidogênese. A faixa de pH ideal para a hidrólise é entre 5 e 7 (ARSLAN *et al.*, 2016). Em pH próximo a 7, a metanogênese é favorecida (KUCZMAN *et al.*, 2017), portanto, para a produção de carboxilatos o ideal é que esse caminho seja eliminado. Isso pode ser feito, por meio de pré-tratamento no inóculo (ex. choque térmico), uso de reagentes inibidores das metanogênicas, como o ácido 2-bromoetanossulfônico (BES) (AGLER *et al.*, 2011; STEINBUSCH *et al.*, 2011), ou mantendo o pH abaixo de 5,5 (AGLER *et al.*, 2014). A produção de 1,3-PDO, por sua vez, é favorecida em pH entre 7 e 8 (MOSCOVIZ; TRABLY; BERNET, 2016; SAXENA *et al.*, 2009). A produção de valerato e caproato a partir de acetato com inóculo proveniente de reator UASB usado no tratamento de efluente de destilaria apresentou maiores resultados em pH 5 (STEINBUSCH *et al.*, 2011). Para análise econômica, é importante saber que o pH geralmente se estabiliza entre 5,2 e 6,4 sem a necessidade de adicionar reagentes (JANKOWSKA *et al.*, 2018).

Baixos valores de pH estão associados a elevadas eficiências energéticas (em termos de ATP), que estão relacionadas com necessidade do sistema para se manter diante da elevada concentração de ácidos e toxicidade de alguns compostos (TEMUDO *et al.*, 2008b).

2.4.4 Composição dos gases

A composição do biogás formado a partir da degradação de material orgânico consiste basicamente em CH₄, CO₂ e H₂, podendo ser formados também outros gases em menor concentração como H₂S (FORESTI, 1994). A pressão parcial de H₂ e CO₂ afetam diretamente as reações acetogênicas (reações 29 e 30, Tabela 2). A elevada pressão parcial de H₂ favorece

a formação dos compostos mais reduzidos (ARSLAN *et al.*, 2016), no entanto, não é obrigatoriamente necessário que haja grande quantidade de H_2 para que compostos reduzidos (ex. caproato) sejam formados (DING; TAN; WANG, 2010). Misturas entre H_2 e CO_2 também podem ser adicionadas ao processo para aumentar a produção de acetato (homoacetogênese) (ARSLAN *et al.*, 2016).

2.4.5 Toxicidade dos metabólitos

O substrato e os produtos formados também podem ter efeito inibitório para o sistema biológico em determinadas concentrações. E esse efeito varia de acordo com as condições (ex. aerobiose, anaerobiose) e micro-organismos envolvidos. Em culturas de *K. pneumoniae*, foram reportados efeitos inibitórios para substrato (glicerol) em 133 g.L^{-1} em aerobiose e 110 g.L^{-1} em anaerobiose. Em anaerobiose e com culturas de *C. pasteurianum* e *C. butyricum*, foram observados efeitos inibitórios acima de 80 g.L^{-1} de glicerol (SILVA *et al.*, 2014).

Além disso, considerando o glicerol bruto, é possível encontrar componentes tóxicos ou com efeitos inibitórios em determinadas concentrações (ex. metanol, cloretos, ácidos graxos de metil ésteres, catalisadores alcalinos, etc). O grande desafio em utilizar o glicerol bruto é que as concentrações desses componentes variam bastante, de acordo com o processo utilizado na produção de biodiesel, bem como a fonte para produzi-lo (HU *et al.*, 2012).

Para 1,3-PDO em anaerobiose, valores entre 60 e 69 g.L^{-1} foram citados para culturas dos micro-organismos mencionados. No entanto, em algumas cepas, a tolerância encontrada foi diferente. Colin, Bortes e Moulin (2000), utilizando uma cepa de *C. butyricum* (CNCM 1211), encontraram uma tolerância de $83,7\text{ g.L}^{-1}$ de 1,3-PDO.

Em anaerobiose, pH próximo a 7 e culturas puras, foram encontrados valores a partir de 12 g.L^{-1} para acetato, 19 g.L^{-1} para lactato, 26 g.L^{-1} para etanol e 19 g.L^{-1} para butirato (ARSLAN *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2014). Em culturas mistas, esses valores podem variar bastante e favorecer a dominância de determinados grupos de micro-organismos. Para exemplificar, efeitos inibitórios para butirato e propionato, ambos na forma não-dissociada, foram reportados a partir de 4,4 e 2 g.L^{-1} , respectivamente, em pH próximo a 5 (ARSLAN *et al.*, 2016).

A concentração de inibição do etanol como doador de elétrons nas reações de alongamento de cadeia também foi avaliada por Lonkar, Fu e Holtapple (2016). Estes autores

encontraram que valores acima de 40 g.L⁻¹ de etanol para formação de ACCM tinha efeito de inibição sobre atividade dos micro-organismos e nenhum alongamento de cadeia acontecia.

2.5 SEPARAÇÃO DE ÁCIDOS CARBOXÍLICOS DE CADEIA MÉDIA (ACCM) COM MEMBRANAS DE FIBRAS OCAS

Além dos desafios relacionados ao controle do processo microbiológico visando a obtenção de elevados rendimentos dos produtos desejados, outro ponto que precisa ser discutido e definido é a separação dos produtos formados do meio reacional por um processo eficiente e que obviamente, esteja associado a menores custos (AGLER *et al.*, 2011). Em virtude disso, alguns métodos têm sido propostos como: adsorção com troca iônica, precipitação, nanofiltração e osmose reversa, eletrodialise, pervaporação, extração, pertração (LÓPEZ-GARZÓN; STRAATHOF, 2014; WASEWAR, 2012).

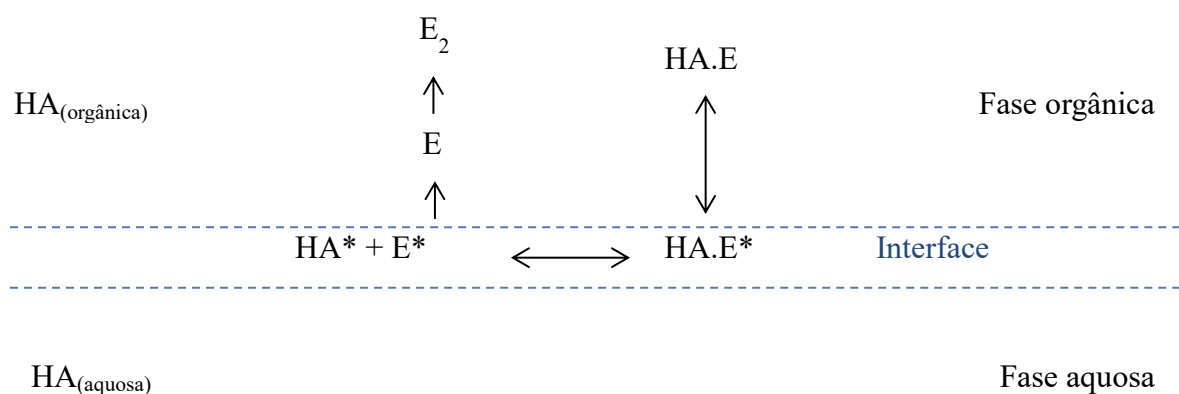
Diante dos vários métodos existentes, nesta seção, será dada atenção à separação de ácidos por pertração. A pertração é um método de separação facilitado por membranas (MORAES *et al.*, 2015), que foi estudada juntamente com a produção de ácido valérico na Seção 3 a partir de um sistema de contato do tipo “*hollow fibers*” (fibras ocas).

De acordo com Gabelman e Hwang (1999) as membranas de contato são dispositivos que envolvem transferência de massa gás-líquido ou líquido-líquido sem dispersão de uma fase dentro da outra. Além disso, eles ainda mencionaram que o uso das membranas de fibras ocas apresenta algumas vantagens importantes em relação aos outros métodos (incluindo as membranas de contato com fase dispersa) como: (i) não há formação de emulsões porque não há dispersão fluido-fluido; (ii) não é necessário que haja diferença de densidade entre os fluidos que passam na parte interna e externa dos filamentos; (iii) o sistema pode ser facilmente adaptado para diferentes demandas de extração, bastando apenas adicionar ou remover as fibras ocas; (iv) é mais fácil utilizá-las quando é desejada a remoção contínua de uma determinada substância, impedindo o acúmulo da mesma no reator e, conseqüentemente, seu efeito inibitório (nesse caso, bem útil em processos fermentativos); (v) tem maior eficiência (medida em HTU “*Height of a Transfer Unit*”) em comparação com as membranas com contato dispersivo e colunas de extração líquido-líquido, por exemplo; e (vi) a retenção de solventes é baixa, sendo uma alternativa bastante atraente quando se trabalha com solventes caros ou contendo alguma substância que possa causar danos à saúde e meio ambiente.

Em contrapartida, esses mesmos autores também indicaram algumas desvantagens como: (i) tempo de vida finito, devendo ser considerado custos adicionais ao processo para troca; (ii) o selamento (geralmente feito com epóxi) feito para fixar o feixe de fibras à coluna pode ser vulnerável ao ataque de determinados solventes orgânicos; (iii) em processos de separação baseados em diferença de pressão (ao invés de concentração), a eficiência pode ser comprometida diante da possibilidade de incrustações e entupimentos dos filamentos; e (iv) a membrana introduz outra resistência à transferência de massa não encontrada nas operações convencionais, que é a resistência da própria membrana. No entanto, medidas podem ser tomadas para minimizá-la.

Esse método de separação envolve o uso de agentes extratores em uma das fases para reagir reversivelmente com o soluto, aumentando a eficiência de extração e seletividade (WASEWAR, 2012), como mostra a Figura 10. Entre os agentes extratores estão os compostos organofosforados e aminas com alto peso molecular. O emprego do primeiro grupo envolve solvatação (combinação de moléculas ou íons de uma substância dissolvida com moléculas do solvente/extrator). O segundo grupo de extratores reagem com o soluto. A escolha do agente extrator deve ser feita levando em consideração sua especificidade, força de interação e reversibilidade nas reações com o soluto (GABELMAN; HWANG, 1999; WASEWAR, 2012).

Figura 10 - Mecanismo de equilíbrio químico entre ácido (HA) e agente extrator (E)

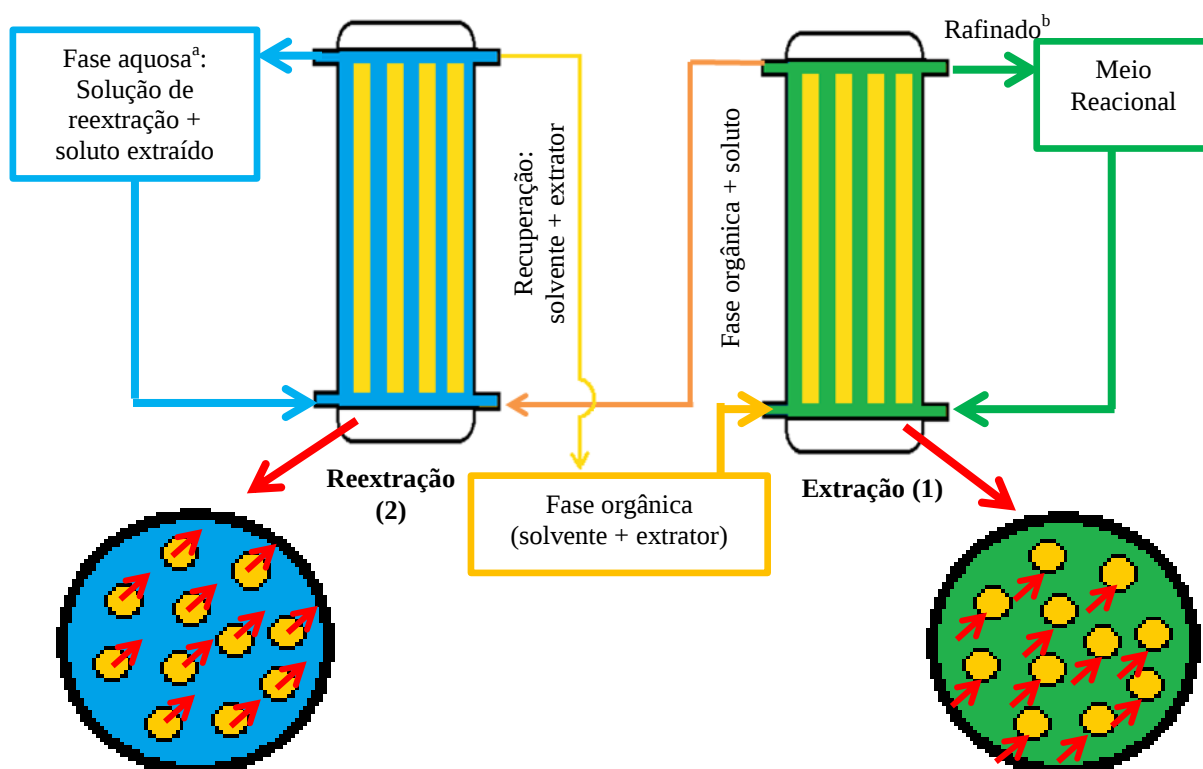


Fonte: Adaptado de Wasewar (2012).

Com relação à configuração e funcionamento, nesta seção, foi dado ênfase ao fluxo ascendente e em paralelo das fases orgânicas e aquosa em função de diminuir a resistência devido à possível formação de gás dentro do sistema. Na Figura 11 é apresentado funcionamento do sistema de membranas de fibras ocas utilizado com recuperação de

solvente e agente extrator, com base no que foi apresentado pela literatura para produção e extração de carboxilatos (AGLER *et al.*, 2012, 2014; GE *et al.*, 2015; KUCEK *et al.*, 2016; KUCEK; NGUYEN; ANGENENT, 2016).

Figura 11 - Fluxograma da pertração com membranas de fibras ocas e regeneração simultânea do solvente



Nota: ^a Fase aquosa: a solução alcalina que acumula solutos extraídos é renovada para que o acúmulo não desfavoreça a remoção dos solutos da fase orgânica. ^b Rafinado: fase pobre em soluto extraído.

Fonte: A autora (2019).

O sistema apresentado na Figura 11 inclui duas etapas para remoção de um ou mais solutos específicos. Na primeira etapa, a fase aquosa contendo todos os metabólitos formados no meio reacional entra na primeira membrana em contato com a parte externa das fibras; ao mesmo tempo, pela parte interna das mesmas, há um fluxo na mesma direção e sentido da solução orgânica (solvente + agente extrator). Durante essa etapa os compostos-alvo saem da fase aquosa e passam para a fase orgânica. O efluente livre dos solutos pode ser enviado de volta para o meio reacional (recirculação). Já o fluxo (solvente + complexo soluto-extrator), que sai da primeira membrana, entra na segunda pela parte interna das fibras. Pela parte externa da segunda membrana (etapa de reextração), passa uma solução aquosa (geralmente uma solução alcalina contendo NaOH, detalhada adiante) com características capazes de favorecer a transferência do soluto da fase orgânica para a aquosa. Após essa difusão do soluto da parte interna dos filamentos para a parte externa (acontecendo pelos pequenos poros

do material, geralmente polipropileno), a fase orgânica (agora livre de soluto) é recuperada podendo ser recirculada para a primeira membrana. Já o soluto reextraído na segunda membrana se acumula na solução alcalina na forma de sais.

Para a separação de carboxilatos, a solução de reextração tem sido uma solução alcalina (pH = 9) (KUCEK; NGUYEN; ANGENENT, 2016). O gradiente de pH entre o meio reacional (5,0 – 5,5) e a solução alcalina confere força necessária para a extração dos carboxilatos por difusão através dos filamentos da membrana (AGLER *et al.*, 2012). Ainda de acordo com estes autores, a fase orgânica para separação de carboxilatos é composta por óleo mineral e 3 % de óxido de tri-*n*-octilfosfina como agente extrator. Esse óxido tem afinidade com moléculas hidrofóbicas, permitindo eficiências de extração entre 83 % e 93 % para ACCM e 5 % a 31 % para ACCC.

Além do esquema apresentado na Figura 11, outras configurações podem ser utilizadas incluindo outros tipos de solventes (SCHLOSSER; KERTÉSZ; MARTÁK, 2005). Sendo importante salientar que a escolha deverá ser feita levando em consideração principalmente os produtos desejados e os custos (GABELMAN; HWANG, 1999).

2.6 BIOFILME E CÉLULAS IMOBILIZADAS

Um biofilme é o acúmulo de micro-organismos dentro de uma matriz de exopolissacarídeos em uma superfície sólida (RITTMANN, 2018). Ainda de acordo com este autor, diversas tecnologias incluem o uso de biofilmes. No tratamento de águas residuárias, por exemplo, o uso de biofilmes pode ser feito em filtros anaeróbios, reatores anaeróbios de leito fluidificado, biofiltros de leito fixo e móvel, torres biológicas, ânodos em células bioeletroquímicas, entre outros.

A imobilização de células microbianas oferece várias vantagens como: operação contínua com elevada densidade celular, possibilidade de reuso do biocatalisador e fácil processamento posterior do produto (SOUZA; ROSSI; AYUB, 2014). Entre estas, o maior número de células no meio reacional tem sido responsável por maiores rendimentos comparados aos obtidos com culturas suspensas (CASALI *et al.*, 2012; GUNGORMUSLER; GONEN; AZBAR, 2013); e também, tem favorecido os processos que utilizam micro-organismos com crescimento lento (RITTMANN, 2018). Um exemplo disso é o uso de biofilme em processos de nitrificação e desnitrificação baseados nos processos ANAMMOX

(“*anaerobic ammonium oxidation*”) e DEAMOX (“*denitrifying ammonium oxidation*”) (ZHANG *et al.*, 2018).

No caso do uso de biofilmes na produção de 1,3-PDO, apesar das vantagens mencionadas, a maioria dos trabalhos reportados foi feita em culturas com células suspensas (SOUZA; ROSSI; AYUB, 2014; CASALI *et al.*, 2012), resultando em processos com maiores volumes (GUNGORMUSLER; GONEN; AZBAR, 2013). Entre os poucos trabalhos apresentados, diferentes materiais foram testados como meio de suporte para as culturas fixas, como fios de aço inoxidável, anéis de Raschig de vidro, Vukopor[®] (filtros de espuma cerâmica) (GUNGORMUSLER; GONEN; AZBAR, 2013; KAUR; SRIVASTAVA; CHAND, 2012).

Além dos biofilmes, outra técnica para imobilizar células é a formação de microcápsulas. Para a formação dessas microcápsulas, são utilizados alginato de cálcio ou sódio (SOUZA; ROSSI; AYUB, 2014; YANG *et al.*, 2017), sulfato de celulose sódico e cloreto de polidimetil-dialil-amônio (NaCS/PDMDAAC); e também, polímeros (ex. poliuretano, PolyhipeTM) (KAUR; SRIVASTAVA; CHAND, 2012; ZHAO; CHEN; YAO, 2006). A diferença entre biofilmes e microcápsulas envolve principalmente a estabilidade do sistema. As microcápsulas tendem a se destruir ou liberar as células ao longo do tempo, o que não é tão fácil de acontecer com biofilmes. Conforme Kaur, Srivastava e Chand (2012), o uso de células imobilizadas (microcápsulas) permitiu um ligeiro aumento da concentração limite de glicerol (de 110 g.L⁻¹ para 120 g.L⁻¹), que por sua vez, foi atribuído a resistência à transferência de massa pela membrana das microcápsulas, resultando também em um menor acúmulo de 1,3-PDO no meio reacional (13,1 g.L⁻¹ com células imobilizadas e 17,65 g.L⁻¹ com células suspensas).

Já o uso de biofilmes em sistemas contínuos permitiu maior produtividade em relação aos testes em batelada (ex. 4,49 g.L⁻¹.h⁻¹ versus 2,96 g.L⁻¹.h⁻¹) (ZHAO; CHEN; YAO, 2006). Jun *et al.* (2010) investigaram a produção de 1,3-PDO com cultura pura de *K. pneumoniae* (DSM 4799) usando glicerol puro e bruto com células suspensas e imobilizadas. Com células suspensas, obtiveram maior produção usando glicerol bruto (1,51 g.L⁻¹.h⁻¹) comparado com glicerol puro (0,84 g.L⁻¹.h⁻¹) nas mesmas condições. Em batelada alimentada e células imobilizadas (em poliuretano), eles mencionaram um aumento de 1,06 para 1,61 g.L⁻¹.h⁻¹ na produção ao longo dos quatro ciclos aplicados.

É importante enfatizar que mais estudos precisam ser desenvolvidos para definir as melhores condições a serem aplicadas diante da microbiota e processo de produção

empregado tendo em vista a valorização desta alternativa que pode ser “acoplada” aos métodos existentes para permitir maiores rendimentos do produto.

2.7 CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA: IMPORTÂNCIA E TÉCNICAS APLICADAS

Diferentemente do que foi mencionado para a produção de 1,3-PDO, o uso de culturas mistas tem sido bastante explorado para a produção de carboxilatos. No entanto, para Arslan *et al.* (2016) e Agler *et al.* (2011), o controle do processo para formação dos produtos desejados ainda envolve alguns desafios. Isso acontece porque a fermentação de culturas mistas consiste em mecanismos complexos que incluem competição de micro-organismos, reações sintróficas intermediárias e fontes variáveis de substratos, como detalhado na Seção 2.4. Deste modo, compreender a ecologia microbiana é essencial para definir o papel e função dos diversos grupos de micro-organismos dentro desse ecossistema. Esse conhecimento, associado aos efeitos dos parâmetros operacionais, podem ajudar a diminuir as dificuldades associadas ao emprego de culturas mistas e contribuir para sua aplicação em larga escala.

A Microbiologia é o estudo dos micro-organismos, amplo grupo de organismos microscópicos que existem como células isoladas ou associadas; e inclui também o estudo dos vírus (microscópicos, porém não celulares). A diferença entre os macro e micro-organismos consiste na capacidade destes últimos em realizar seus processos vitais de crescimento, geração de energia e reprodução independentemente de outras células. Na natureza, as células vivem associadas a outras; e esse conjunto é chamado população. O conjunto entre diferentes populações é conhecido como comunidade microbiana. Essas comunidades podem ser formadas por células livres (suspensas) em meios aquosos ou também, formando biofilmes sobre superfícies vivas ou inertes (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2008).

O estudo das relações entre os diversos micro-organismos entre si e com o ecossistema é chamado de Ecologia microbiana. A ecologia dos micro-organismos envolve basicamente duas áreas de estudo: a biodiversidade e a atividade microbiana. O estudo da biodiversidade inclui técnicas de isolamento, identificação e quantificação de micro-organismos. Já os estudos envolvendo atividade microbiana estão associados ao que esses micro-organismos fazem no hábitat em que vivem. Entre as técnicas empregadas nas análises de ecologia molecular microbiana estão a eletroforese em gel de gradiente desnaturante (“*Denaturant Gradient Gel Electrophoresis*”, DGGE), a clonagem molecular e o sequenciamento massivo.

Todas estas envolvem uma etapa prévia com reação em cadeia da polimerase para amplificação de genes específicos (“*Polymerase Chain Reaction*”, PCR); antes de promover o sequenciamento e análise dos dados (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2008; NAKAZAWA, 2015). O banco de dados de genes, cromossomos ou genomas completos contidos no “*National Center for Biotechnology Information*” (NCBI), “*Ribosomal Data Project*” (RDP) ou rRNA SILVA 16S (www.arb-silva.de), auxiliam na análise dos resultados.

A maioria dos genes são entidades que codificam a estrutura de um único polipeptídeo ou proteína. Dessa maneira, os genes armazenam informações (codificam a sequência de aminoácidos da proteína), enquanto que as proteínas são as entidades funcionais. Os genes são compostos do ácido desoxirribonucleico (DNA) e a informação está contida na sequência de bases do DNA. Essa informação guardada no DNA codifica a sequência de uma proteína e isso é feito exclusivamente através de uma molécula intermediária: o ácido ribonucleico (RNA) (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2008; SCHAEFER, 2006).

No estudo da filogenia molecular dos micro-organismos, vários genes são estudados. Os mais utilizados são genes que codificam o RNA ribossomal da subunidade menor (rRNA 16S). Carl Woese e Fox (1977) foram os primeiros a explorar o rRNA 16S e 18S em estudos filogenéticos. A partir disso, Woese propôs a classificação dos micro-organismos em três domínios (grupos primários): dois procarióticos (*Bacteria*, *Archaea*) e um eucariótico (*Eukarya*, ou *Eukaryota*). Para Sanz e Köchling (2007), as técnicas baseadas na análise do RNA ribossomal (16S rRNA para micro-organismos procariotas) ou de seus genes correspondentes, são consideradas um “cronômetro evolucionário”. Devido a isso, o conhecimento sobre diversidade microbiana cresceu bastante desde seu uso pela primeira vez em 1987 por Carl Woese (gene rRNA 16S e 18S) (WOESE, 1987).

A técnica atualmente mais empregada para caracterização microbiológica em estudos recentes envolvendo processos biológicos é o sequenciamento massivo (AGLER *et al.*, 2012; ANDERSEN *et al.*, 2017; PECES *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2014). Após o ano de 2000, o sequenciamento direto de amplicons de PCR tornou-se economicamente viável com o desenvolvimento das tecnologias para o sequenciamento massivo. Em 2006, o método de pirosequenciamento 454 GS 20 (Roche Applied Science, Alemanha) foi a primeira tecnologia de sequenciamento de alto rendimento aplicada com sucesso no estudo de biodiversidade em larga escala. Com o desenvolvimento contínuo dessa tecnologia, a produtividade e a resolução do sequenciamento do 16S rDNA melhoraram.

A partir disso, tecnologias adicionais para sequenciamento com alto rendimento passaram a ser comercializadas. Um exemplo é o sequenciamento massivo utilizando a plataforma MiSeq (Illumina, EUA). O interesse na metodologia com illumina consiste nos custos reduzidos por base e alta profundidade de sequenciamento, mesmo com curtos comprimentos de leitura (KLINDWORTH *et al.*, 2013). Estes mesmo autores mencionaram que a existência de novas tecnologias também agrega certa complexidade ao estudo e o passo mais crítico para a amplificação exata para a análise do rDNA ainda é a escolha dos *primers*. O uso de pares de *primers* pode levar a sub-representação ou seleção contra espécies únicas ou até mesmo, grupos inteiros. Além disso, a escolha e uso inadequado de *primers* levam a resultados questionáveis.

O tratamento de dados do sequenciamento massivo inclui análise e softwares de bioinformática. O processamento sequencial geralmente é realizado com o pacote Mothur v.1.36.0 (SCHLOSS *et al.*, 2009) e outros para tratamento de quimeras como o Greengenes (DESANTIS *et al.*, 2006) e ChimeraUquime (SANZ *et al.*, 2017). Para a classificação taxonômica geralmente utilizam-se os bancos de dados do gene SILVA 16S rRNA ou NCBI, enquanto que as análises estatísticas e gráficas adicionais podem ser feitas com softwares como o pacote Vegan (OKASANEN *et al.* 2010). No entanto, outros softwares podem ser utilizados para os mesmos fins (ANDERSEN *et al.*, 2017; PECES *et al.*, 2018).

Dessa maneira, o sequenciamento massivo (por pirosequenciamento ou Illumina) tem sido amplamente aplicada para caracterizar as populações taxonômica ou filogeneticamente e também, para conhecer os diversos grupos de micro-organismos envolvidos bem como associar seu metabolismo ao funcionamento do sistema. Zhang *et al.* (2014), utilizaram dados sobre o sequenciamento massivo de 78 amostras de digestores anaeróbios provenientes de 28 estudos a fim de comparar a variação da diversidade existentes nos digestores de acordo com tipo de substrato. Agler *et al.* (2012) fizeram uso dessa técnica para caracterizar os micro-organismos envolvidos na produção ACCM, com foco em ácido caproico. Da mesma forma, Gallardo *et al.* (2014) a utilizaram para avaliar as alterações sofridas pela microbiota ao longo da operação dos reatores EGSB.

Além das técnicas de biologia molecular mencionadas, a microscopia eletrônica de varredura (MEV), tem sido outro tipo de ferramenta frequentemente aplicada para a caracterização microbiológica (SÁ *et al.*, 2013; NAKAZAWA *et al.*, 2017). Ela é amplamente utilizada nas pesquisas com caracterização de biofilmes e lodo granular por permitir visualização da organização espacial e morfologia microbiana (ALPHENAAR;

GROENEVELD, 1994). Aliada a outras técnicas como espectroscopia de infravermelho (FTIR) e infravermelho próximo (FTNIR), microscopia eletrônica de força atômica (MFA), espectroscopia fotoeletrônica de raios X (XPS) e espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono-13 (RMN-1H/RMN-13C), a MEV também tem sido bastante empregada na caracterização de materiais (MONTEIRO; SILVA, 2009).

3 PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DE ÁCIDO VALÉRICO COM MEMBRANAS DE FIBRAS OCAS A PARTIR DE GLICEROL RESÍDUAL EM FILTRO ANAERÓBIO

Nesta seção estão descritos os experimentos realizados na Embrapa Agroindústria Tropical com foco na produção e extração de ácidos. E, parte dela, encontra-se em processo de submissão ao periódico *International Journal of Environmental Science and Technology*, com título: *Anaerobic production of valeric acid from crude glycerol via chain elongation*, sob autoria de Shyrlane T.S. Veras, Willame de A. Cavalcante, Tito A. Gehring, Alexandre R. Ribeiro, Tasso J.T.Ferreira, Mario T. Kato, Patricia R. Ojeda, José Luis Sanz, Renato C. Leitão. Nas duas seções seguintes (Seções 4 e 5), estão descritos os experimentos realizados na *Universidad Autónoma de Madrid* (UAM) com foco na produção de 1,3-PDO e biofilmes. Como a tese foi realizada em regime de co-tutela, um resumo em espanhol contendo todos os estudos realizados está apresentado no APÊNDICE A.

3.1 INTRODUÇÃO

Conforme discutido anteriormente, o glicerol bruto é um resíduo orgânico resultante da reação de transesterificação para a produção de biodiesel e sua produção corresponde a 10 % da quantidade de biodiesel produzida (CHEN *et al.*, 2018). No Brasil, após o programa nacional B10 ter entrado em vigor em 2018, espera-se uma produção anual superior a 5 milhões de m³ (APROBIO, 2018). Em 2017, a União Europeia produziu 21,1 milhões de m³ de biodiesel, representando praticamente duas vezes a produção referente ao ano anterior (EBB, 2018). Considerando o cenário de produção global, estima-se que até 2025 esse valor supere 42 milhões de m³ (OECD/FAO, 2017). Em virtude dessa crescente demanda por biodiesel, o glicerol gerado pode não ser absorvido pelas indústrias. Por isso, é essencial ampliar as alternativas para utilização desse resíduo e viabilizar essa crescente demanda de biodiesel (MONTEIRO *et al.*, 2018).

A conversão de glicerol bruto usando processos biotecnológicos tem sido considerada uma alternativa promissora para obter compostos de valor agregado. Processos anaeróbios geralmente têm custos mais baixos e, além disso, vários produtos industrialmente interessantes podem ser obtidos a partir do glicerol, como o hidrogênio (FABER; FERREIRA-LEITÃO, 2016; HARON *et al.*, 2018; SARMA *et al.*, 2013), metano (VIANA *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2015), ômega 3 e carotenóides com aplicações farmacêuticas (GUPTA *et al.*, 2013; LEE CHANG *et al.*, 2015), álcoois como o etanol (LEE *et al.*, 2017;

VIKROMVARASIRI *et al.*, 2014), 1,3-propanodiol (NAKAZAWA *et al.*, 2017; VIVEK; PANDEY; BINOD, 2016a; YANG *et al.*, 2017) e butanol (YADAV *et al.*, 2014); polihidroxicanoatos (BURNIOL-FIGOLS *et al.*, 2018), polióis que são comumente aplicados nas indústrias química, cosmética, alimentícia e farmacêutica (TOMASZEWSKA; RYWIŃSKA; RYMOWICZ, 2014; UPRETY *et al.*, 2017) e ácidos carboxílicos como succínico (SADHUKHAN; VILLA; SARKAR, 2016), acético (ZHANG *et al.*, 2015), propiônico (DISHISHA *et al.*, 2015), *n*-butírico (VARRONE *et al.*, 2017) e ácido *n*-capróico (LENG *et al.*, 2017, 2019).

A produção de carboxilatos tem sido o foco de muitos estudos recentes envolvendo novos conceitos de biorrefinaria. Isso inclui a utilização de resíduos orgânicos para produção de ácidos carboxílicos com uma ampla faixa de aplicações industriais (AGLER *et al.*, 2011; AMORIM *et al.*, 2018; BERMÚDEZ-PENABAD; KENNES; VEIGA, 2017; SPIRITO *et al.*, 2014). Diante disso, os ácidos carboxílicos de cadeia média (ACCM) têm se mostrado como compostos valiosos, já que podem ser usados para produzir combustíveis líquidos, aditivos, entre outras aplicações (AGLER *et al.*, 2011; XU *et al.*, 2017).

Os ACCM podem ser formados a partir de reações de alongamento da cadeia entre ácidos primários e um doador de elétrons. Entre os doadores de elétrons mencionados, estão o etanol (GROOTSCHOLTEN *et al.*, 2013b), lactato (KUCEK; NGUYEN; ANGENENT, 2016), metanol (CHEN *et al.*, 2016). A produção de ácido *n*-capróico (C6) e ácido *n*-butírico (C4), incluindo os mecanismos envolvidos, tem sido relatada com diferentes substratos, configurações de reatores e operação (ANGENENT *et al.*, 2016; CAVALCANTE *et al.*, 2017; GE *et al.*, 2015; GROOTSCHOLTEN *et al.*, 2013b; KUCEK *et al.*, 2016; KUCEK; NGUYEN; ANGENENT, 2016).

No entanto, ácidos com cadeia ímpar, como o valérico (C5) e o enântico (C7) geralmente têm sido obtidos a partir da pirólise da biomassa celulósica (CORMA *et al.*, 2014) e óleo de mamona (BOTTON *et al.*, 2016), respectivamente. Normalmente, esses processos termoquímicos envolvem a conversão da biomassa celulósica em ácido levulínico; e além disso, várias etapas envolvendo reações químicas são usadas para reduzir o levulinico via γ -valerolactona em ácido valérico, que pode ser usado como matéria-prima e tem ampla aplicação comercial (CORMA *et al.*, 2014; GU *et al.*, 2017; KUMAR *et al.*, 2017).

Alternativamente, poucos estudos relataram uma produção de valerato e heptanoato usando processos biológicos. Grootcholten *et al.* (2013b) relataram produção de valerato entre 13,2 e 15,3 g DQO.L⁻¹.d⁻¹ durante a produção de heptanoato a partir de propionato e

etanol em filtro anaeróbio de fluxo ascendente com cultura mista. Porém, a produção de valerato foi abordada apenas como um intermediário para a produção de heptanoato, sem ser dada muita importância. Em outro estudo, o ácido valérico juntamente com o ácido 2-metilbutírico foram obtidos de uma cultura de *Escherichia coli* usando glicose (DHANDE; XIONG; ZHANG, 2012b).

Por outro lado, micro-organismos pertencentes aos gêneros *Clostridium* e *Megasphaera* foram mencionados em estudos envolvendo reações de alongamento de cadeias pares e ímpares, permitindo a formação de produtos como valerato (C5) e caproato (C6) (ANGENENT *et al.*, 2016; KENEALY; CAO; WEIMER, 1995; KUCEK *et al.*, 2016; KUCEK; SPIRITO; ANGENENT, 2016; SEEDORF *et al.*, 2008; SPIRITO *et al.*, 2014; WEIMER; NERDAHL; BRANDL, 2015; WEIMER; STEVENSON, 2012).

Alguns estudos recentes também destacaram as vantagens de combinar a produção com métodos de separação em linha desses compostos, sendo o aumento na produção de carboxilatos a principal delas (AGLER *et al.*, 2011, 2012; WASEWAR, 2012). No entanto, até agora o valerato foi relatado principalmente como um intermediário em reações de alongamento, mas sem destacar seus usos potenciais como produto final.

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 Geral

O objetivo deste estudo foi determinar o potencial do glicerol residual para produção biológica de ácido valérico e avaliar sua extração utilizando um sistema de pertração em linha com membranas de fibras ocas.

3.2.2 Específicos

- Avaliar a viabilidade e efeitos associados à mistura entre dois tipos de inóculos sobre a produção de ACCM utilizando etanol como doador de elétrons;
- Avaliar a produção de ACCC e ACCM (com foco em ácido valérico) em filtro anaeróbio com e sem sistema de pertração em linha para separação de ácido valérico;
- Estudar, mediante técnicas de biologia molecular, a microbiota envolvida nos experimentos.

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.1 Glicerol bruto

O glicerol bruto utilizado foi proveniente da produção de biodiesel a partir de óleo de soja (77 %) e sebo bovino (23 %). Esse material foi cedido pela Planta Industrial de Produção de Biodiesel da Petrobras S.A, localizada no município de Quixadá – CE. A Figura 12 mostra o aspecto do glicerol empregado nos experimentos. A metodologia e resultados da caracterização do glicerol residual também foram fornecidos pela UBQ (Usina de Biodiesel de Quixadá) e estão contidos na Tabela 5.

Figura 12 - Glicerol bruto utilizado nos experimentos



Fonte: A autora (2019).

Tabela 5 - Características do glicerol bruto utilizado nos experimentos

Parâmetros	Valor	Metodologia
Teor de glicerol (%)	79,10	BIO 1002
pH	5,50	BIO 1012
Densidade absoluta a 20 °C (kg.m ⁻³)	1250,90	ASTM D4052
Metanol (% massa)	0,36	NBR 15343
NaCl (% m/m)	5,70	BIO 1001
Umidade (% m/m)	13,58	ASTM-E 203
DQO (g DQO.g ⁻¹)*	1038,81	Método 5220 D – colorimétrico**
Matéria orgânica não-glicerídea (%)	2,00	BIO 1014
Cinzas (% m/m)	5,33	BIO 1000

* Valor calculado em termos de DQO (g O₂.L⁻¹) por grama de glicerol bruto. ** APHA (2012).

3.3.2 Experimento 1: Testes em batelada para avaliar a produção de metabólitos por dois tipos de inóculo

Os experimentos em batelada assim como a operação do filtro anaeróbio (descrita na seção seguinte), foram desenvolvidos no Laboratório em Tecnologia da Biomassa (LTB) da Embrapa Agroindústria Tropical (Fortaleza – CE).

Três testes foram feitos utilizando o mesmo substrato (glicerol + etanol) e dois tipos de inóculos. Para o primeiro teste (T1), foi utilizado um lodo adaptado para formação de produtos de alongamento de cadeia, utilizado em pesquisas com produção de ácido caproico com fermentado de caldo de cana como substrato (CAVALCANTE, 2016). No segundo teste (T2), um lodo adaptado para consumo de glicerol e produção de ácidos primários foi utilizado. Esse inóculo também foi proveniente de um filtro anaeróbio (mesmas configurações e dimensões) e vinha sendo utilizado em pesquisas com conversão de glicerol e obtenção de produtos (H_2 , CH_4 e ACCM) (VIANA, 2016). Por último, uma mistura 1:1 entre os inóculos foi testada (T3).

Os experimentos em batelada foram feitos em frascos Schott de 100 mL, com volume útil de 60 mL e em triplicata. Eles foram mantidos sob agitação contínua (120 rpm) e a 30 ± 2 °C. Cada frasco recebeu um volume de substrato contendo glicerol residual e etanol (10 % da DQO referente ao glicerol), sendo o valor da DQO total igual a 16 g DQO.L⁻¹. Uma quantidade de bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$) equivalente 1 g/g DQO foi utilizada nos testes para manter o pH entre 7,0 e 7,5. Tomando como base experimentos realizados previamente pelo grupo de pesquisa (VIANA *et al.*, 2014; VIANA, 2016), a relação alimento micro-organismo foi utilizada foi 2:1. Para inibir a metanogênese, adicionou-se clorofórmio (0,05 % v/v) (VIANA *et al.*, 2014). A solução utilizada contendo macro e micronutrientes está contida na Tabela 6.

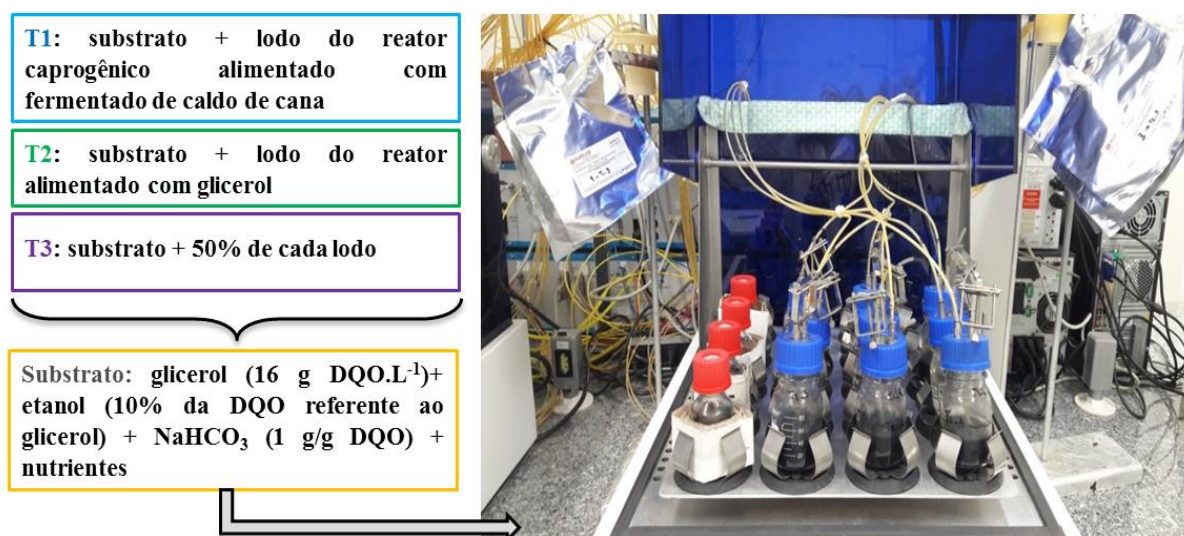
Os testes controles foram feitos em frascos Schott de 30 mL nas mesmas condições, mas sem substrato. Em todos os frascos, a purga de oxigênio foi feita com injeção de N_2 (100 %) durante 2 minutos. Depois disso, foram conectados a bolsas (“gas bags”) com volume de 1L para armazenamento e coleta dos gases produzidos. A Figura 13 mostra o esquema experimental utilizado bem como uma descrição das três condições aplicadas. A coleta das amostras foi realizada diariamente durante 10 dias e um volume entre 1,0 e 1,5 mL era retirado de cada garrafa para monitoramento de metabólitos e pH.

Tabela 6 - Concentração de macro e micronutrientes utilizada nos experimentos

Macronutrientes	
Reagente	Concentração (mg.L ⁻¹)
NH ₄ H ₂ PO ₄	1.120,0
MgCl ₂ .6H ₂ O	102,8
MgSO ₄ .7 H ₂ O	62,0
CaCl ₂ .2 H ₂ O	62,0
FeCl ₂ .4 H ₂ O	4,6
KCl	311,6
Extrato de levedura	1.038,8
Micronutrientes	
ZnSO ₄ .7 H ₂ O	0,311
NiCl ₂ .6 H ₂ O	0,062
CoCl ₂ .6 H ₂ O	0,062
NaMo ₄ .2 H ₂ O	0,093
MnCl ₂ .4 H ₂ O	0,093
CuCl ₂ . H ₂ O	0,031
H ₃ BO ₃	0,935
Na ₂ SeO ₃ .5H ₂ O	0,031

Fonte: Adaptado de Steinbusch *et al.* (2011), Grootcholten *et al.* (2013a) e Grootcholten *et al.* (2013b).

A determinação dos metabólitos bem como a quantificação dos gases foi feita por cromatografia, conforme apresentado na seção 3.3.4 que descreve os métodos analíticos aplicados em todos os experimentos contidos na presente seção.

Figura 13 - Condições e esquema experimental dos testes em batelada

Fonte: A autora (2019).

3.3.3 Experimento 2: Filtro anaeróbio + Sistema de pertração

O filtro anaeróbio de fluxo ascendente feito em borossilicato com 10 cm de diâmetro, 135 cm de altura e 13,1 L de volume útil; foi operado em condições mesofílicas (30 ± 2 °C) por 114 dias. O meio de suporte consistiu em pedaços de PVC (conduítes corrugados) com tamanho, diâmetro e área específica iguais a 10 mm, 16 mm e $907 \text{ m}^2 \cdot \text{m}^{-3}$, respectivamente. O biorreator já vinha sendo operado por pelo menos três anos como um reator acidogênico para produção principalmente de hidrogênio a partir de glicerol (VIANA *et al.*, 2014; VIANA, 2016). Depois disso, o sistema ficou parado por aproximadamente 20 dias antes de dar início às novas atividades apresentadas na presente Seção.

A Figura 14 mostra o acúmulo da biomassa em torno do meio de suporte durante o início da operação. O biorreator foi revestido com papel alumínio para evitar fotodegradação do substrato e/ou crescimento de algas, visto que em alguns momentos durante o dia, o mesmo recebia incidência de raios solares.

Figura 14 - Meio de suporte e biomassa ao longo da coluna do reator



Fonte: A autora (2019).

O pH de operação ficou entre 5,0 e 5,3 para inibir a atividade metanogênica. O controle foi feito usando um pHmetro automático (HI1006-3205, Hanna Instruments, EUA) conectado a uma bomba dosadora (P133-398TI, LMI Milton Roy, França) de NaOH (0,1 %

v/v). O substrato foi preparado usando glicerol bruto (cerca de 46 g DQO.L⁻¹) e etanol (~ 7 g DQO L⁻¹; 15 % da DQO referente ao glicerol) como doador de elétrons para as reações de alongamento da cadeia (AGLER *et al.*, 2012). Essa solução era mantida sob agitação e refrigeração; e a cada 2 dias era substituída por outra nova. A solução de macro e micronutrientes foi a mesma utilizada nos testes em batelada (Tabela 6).

A operação consistiu em três fases operacionais (Tabela 7). A primeira fase operacional (F1, dia 0 a 59) consistiu basicamente em sua reativação e adaptação; a COV foi de $4,7 \pm 0,5$ g DQO.L⁻¹.d⁻¹ e o TDH foi de 15 dias. Na segunda fase operacional (F2, dia 60 a 92), o reator foi bioaumentado com 4,2 L de lodo de um reator caprogênico (25 g SSV.L⁻¹) para melhorar o alongamento da cadeia. Tanto a coleta desse lodo como sua adição no biorreator, foi feita em condições anaeróbias. Para isso, foi utilizado um frasco Schott de 1 L acoplado a um selo hídrico e uma bolsa (“gas bags”) contendo N₂ (100%).

Dessa maneira, o volume de N₂ contido inicialmente no frasco seria substituído pelo volume de lodo adicionado ao frasco. Depois disso, para adição do lodo no biorreator, também foi utilizado um esquema semelhante, porém uma bomba peristáltica foi utilizada para enviar a biomassa para a base do mesmo (entrada). A COV e o TDH foram de $5,0 \pm 0,5$ g DQO.L⁻¹.d⁻¹ e 14 dias, respectivamente. Na fase 3 (F3, dia 93 a 114), o biorreator foi acoplado a um sistema de membrana de fibra ocas para extração dos ácidos. A COV e o TDH foram $6,4 \pm 0,5$ g DQO.L⁻¹.d⁻¹ e 9 dias, respectivamente.

Tabela 7 - Fases e condições operacionais aplicadas

Fase – descrição	Período (d)	COV (g DQO.L ⁻¹ .d ⁻¹)	TDH (d)
F1 – Reativação/ Adaptação	0 – 59	4,7	15,0
F2 – Adição de lodo caprogênico	60 – 92	5,0	14,0
F3 – Operação com sistema de membranas	93 – 114	6,4	9,0

Fonte: A autora (2019).

3.3.3.1 Sistema de pertração: Extração com membranas de fibras ocas em linha

O sistema de pertração (extração líquido-líquido com membranas) foi composto por duas membranas de fibra oca de polipropileno (LIQUI-CEL[®] 2.5 x 8 G420; Charlotte, EUA), cada uma com volume externo e interno de 0,4 e 0,15 L, diâmetro interno de 66,5 mm, espessura de 5,45 mm e área de contato de 1,4 m². Além disso, ele foi operado em duas etapas: (i) extração de ACCM (membrana 1) da solução aquosa (efluente) para uma solução

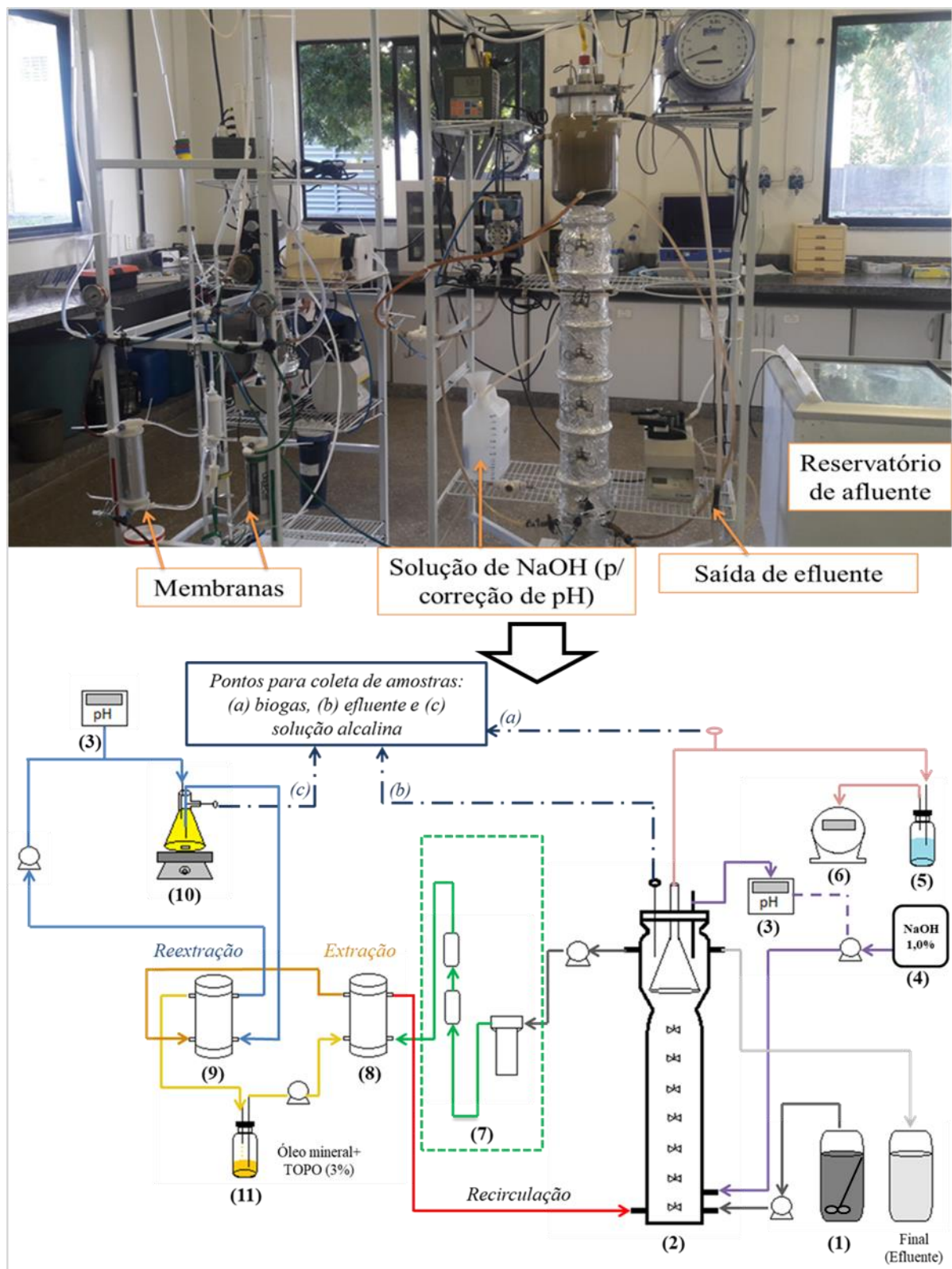
extratora (0,4 L de volume) contendo óleo mineral e óxido de tri-*n*-octilfosfina a 3 % (TOPO) (ver detalhes de funcionamento na Seção 2.5), e (ii) reextração de ACCM (membrana 2) da solução extratora para uma solução alcalina (2 L de volume) contendo 0,5 M de H_3BO_3 e NaOH (50 %) em quantidades suficientes para manter o pH sempre em torno de 9 (KUCEK *et al.*, 2016). A solução alcalina foi trocada por uma nova a cada semana.

A operação das etapas de extração e reextração foi a mesma descrita por Kucek *et al.* (2016). O óleo mineral, a solução alcalina e o efluente do reator foram continuamente reciclados com vazões de 6,7, 14,4 e 116,3 L.d⁻¹, respectivamente. Os valores escolhidos para as vazões, assim como pH (solução alcalina e efluente) foram os mesmos já aplicados em trabalhos anteriores (também realizados na EMBRAPA) com o mesmo sistema de membranas (COLARES *et al.*, 2016; GEHRING *et al.*, 2015, 2016). A Figura 15 mostra um esquema com a fotografia e fluxograma de funcionamento do sistema biorreator-membranas.

No esquema contido na Figura 15, a solução de alimentação (glicerol + etanol) foi armazenada em um reservatório (1) com temperatura entre 5 e 8 °C e bombeada para o reator de filtro anaeróbico de fluxo ascendente (2), que estava conectado a um sistema para medir e controlar pH. Esse sistema era composto por um pHmetro (3) e uma bomba dosadora de NaOH (4). O biogás produzido passou por um selo hídrico (5) e, em seguida, o volume foi quantificado pelo medidor de gás (6). No ponto mais alto do biorreator, o efluente foi bombeado para um sistema de filtros (7), em direção à primeira membrana (8) onde o estágio 1 (extração) ocorreu.

A principal função do sistema de filtros na saída do biorreator e antes da primeira membrana foi remover biomassa suspensa remanescente no efluente e prevenir problemas devido ao acúmulo de biomassa. A solução hidrofóbica (óleo mineral + TOPO) contendo os ácidos extraídos seguiu para a segunda membrana (9) onde aconteceu o estágio 2 (reextração). Nesta etapa, os ácidos foram transferidos da solução hidrofóbica para a solução alcalina (10) e esta solução orgânica (óleo mineral + TOPO) retornou ao reservatório (11), de onde seguiu novamente para a primeira membrana de extração (8) iniciando um novo ciclo de extração. Os pontos de coleta para biogás, efluente e ácidos extraídos, estão representados na Figura 15 por (a), (b) e (c), respectivamente. O monitoramento do sistema foi feito a partir da análise dos parâmetros operacionais conforme metodologia e frequência apresentada na Tabela 8.

Figura 15 - Fotografia e esquema do filtro anaeróbico acoplado a um sistema de pertração compostos por duas membranas de fibras ocas utilizado na produção e extração de ácidos



Onde: (1) reservatório de alimentação (com temperatura entre 5 e 8 °C), (2) filtro anaeróbico, (3) medidor e controlador automático de pH, (4) bomba dosadora de NaOH, (5) selo hídrico, (6) gasômetro, (7) filtros, (8) primeira membrana (extração), (9) segunda membrana (reextração), (10) reservatório de solução alcalina e (11) reservatório do solvente orgânico e agente extrator. **Fonte:** A autora (2019).

Tabela 8 - Parâmetros, metodologia e frequência de monitoramento da operação do biorreator

Parâmetros	Metodologia	Frequência de monitoramento
pH	Eletrométrico (4500H ⁺ B) ^b e <i>Online</i>	Diária
Vazão (Q)	Relação volume/tempo	Diária
Volume de biogás produzido	Gasometria	Diária
Metabólitos (AGVs, alcoóis, glicerol, etc.) ^a	Cromatográfico (HPLC)	3x/semana
Composição do biogás produzido	Cromatográfico (GC)	3x/semana

^a Valores determinados em g.L⁻¹ e convertidos em g DQO.L⁻¹ para cada metabólito.

^b Determinado conforme descrito pela APHA (2012). **Fonte:** A autora (2019).

3.3.4 Métodos analíticos

A concentração dos gases produzidos (CH₄, H₂ e CO₂) foi determinada por cromatografia gasosa, com cromatógrafo (micro-GC/C2V-200, Thermo Fisher Scientific, Holanda) equipado com detector de condutividade térmica e coluna capilar de aço inoxidável (10,0 m x 0,5 mm). Argônio foi utilizado como gás de arraste. As temperaturas do injetor, detector e forno foram 120 °C, 120 °C e 60 °C, respectivamente. As amostras de biogás eram coletadas em bolsas para armazenamento de gases. Antes de cada coleta, as mesmas eram conectadas a uma bomba a vácuo para remover todo gás contido na parte interior. Eram coletados em torno de 180 mL de gases, parte deste volume era utilizado pelo Micro-GC para purga do sistema e outra para análise da amostra. O tempo total de análise eram 5 min, sendo 4 min para purga e 1 min para determinação da composição dos gases.

Já a quantificação da concentração de ácidos carboxílicos (ACCC e ACCM), glicerol, etanol, butanol e 1,3-propanodiol foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em cromatógrafo da Shimadzu com detector de índice de refração (RID-10A, Shimadzu, Japão) e coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad, EUA) a 65 °C, com fluxo de fase móvel (H₂SO₄, 5 mM) igual a 0,6 mL.min⁻¹. Aproximadamente 2 mL de amostras eram colocadas em eppendorfs e, em seguidas eram centrifugadas a 13.000 rpm por 2,5 min. Depois disso, eram filtradas com filtro para seringas (0,45 µm). O fator de diluição empregado para as amostras de alimentação e efluente do reator era 10 e 4, respectivamente.

Todas as concentrações de metabólitos foram convertidas e usadas em termos de DQO. A taxa de produção volumétrica (g DQO.L⁻¹.d⁻¹) dos bioprodutos foi calculada multiplicando a concentração de metabólitos (g DQO.L⁻¹) pela vazão (L.d⁻¹), que corresponde à taxa de produção (g DQO.d⁻¹); e, em seguida, dividindo pelo volume útil do biorreator (L),

como mostra a equação 1. Durante a fase F3, para as produtividades totais, foram consideradas as somas entre a quantidade de metabólitos no biorreator (efluente) e a quantidade de metabólitos extraídos (na solução alcalina), conforme apresentado na equação 2. Nessas equações, C_M representa a concentração do metabólito, Q a vazão, V_R o volume útil do reator, A_M a área da membrana e RCi a taxa de extração de cada carboxilato, onde Ci indica o número de átomos de carbono.

- Sem sistema de extração em linha (F1 e F2):

$$\text{Taxa de produção volumétrica (g COD. L}^{-1}. \text{d}^{-1}) = \frac{[C_M (\text{g DQO. L}^{-1}) \times Q (\text{L. d}^{-1})]}{V_R (\text{L})} = \frac{[\text{Taxa de produção (g DQO. d}^{-1})]}{V_R (\text{L})} \quad \text{Eq. 1}$$

- Com sistema de extração em linha (F3):

$$\text{Taxa de produção volumétrica (g COD. L}^{-1}. \text{d}^{-1}) = \frac{[C_M (\text{g DQO. L}^{-1}) \times Q (\text{L. d}^{-1})] + [RCi (\text{g DQO. m}^{-2}. \text{d}^{-1}) \times A_M (\text{m}^2)]}{V_R (\text{L})} \quad \text{Eq. 2}$$

Para determinar o valor da taxa de extração dos carboxilatos (RCi), as equações 3 e 4 foram aplicadas. Nestas equações, V_{SA} representa o volume da solução alcalina, lembrando que o volume inicial é 2 L; enquanto que o Δt é o intervalo de tempo entre as coletas de amostras.

$$V_{SA}(\text{L}) = V_{\text{do dia anterior}} (\text{L}) - V_{\text{retirado para amostra}} (\text{L}) + V_{\text{de NaOH adicionado para correção de pH}} (\text{L}) \quad \text{Eq. 3}$$

$$RCi (\text{g DQO. m}^{-2}. \text{d}^{-1}) = \frac{[(C_{i\text{concentração atual}} - C_{i\text{concentração do dia anterior}}) \times V_{SA}(\text{L})]}{\Delta t (\text{d}) \times A_M (\text{m}^2)} \quad \text{Eq. 4}$$

Por último, durante a F3, a taxa total de carboxilatos extraídos R ($\text{g DQO. m}^{-2}. \text{d}^{-1}$), foi calculada pela soma das taxas de extração de cada carboxilato (RCi).

3.3.5 Análises microbiológicas

3.3.5.1 Extração de DNA e sequenciamento massivo por Illumina

Amostras de lodo foram coletadas e armazenadas a -20°C durante todo o período operacional: (1) do inóculo inicialmente contido no biorreator (amostra S1, coletada no dia 29, F1); (2) do lodo caprogênico antes de ser adicionado ao biorreator usado apenas com glicerol bruto como substrato (amostra S2, adicionada no dia 60, F2); (3) amostra coletada 32 dias após a mistura do lodo e antes da ativação do sistema de membranas (amostra S3, coletada no dia 92, F2); e (4) durante o funcionamento das membranas (amostra S4, coletada no dia 107, F3).

Foram utilizados cerca de 500 mg de cada amostra para extração de DNA com o kit FastDNATM SPIN para o solo e o instrumento FastPrep[®] (MP Biomedicals, EUA). A concentração de DNA foi determinada usando o kit Qubit[®] dsDNA BR e um Fluorômetro Qubit[®] 2.0 (Life Technologies, EUA). O sequenciamento foi feito utilizando os *primers* 341F/806R do total de amostras de DNA e analisadas pela plataforma MySeq V3 (2 X 300 pb) (Illumina, EUA).

3.3.5.2 Análise filogenética

Todo o processamento de dados das sequências foi realizado com o pacote Mothur v.1.36.0 (www.mothur.org; SCHLOSS *et al.*, 2009). Para o tratamento dos dados contendo mais de uma base ambígua (“N”), foram removidas sequências menores do que 150 pares de base e sequências com baixa qualidade (Phred < 25).

As sequências foram alinhadas com o *Release 123* do banco de dados de alinhamento de rRNA SILVA 16S (www.arb-silva.de). Já os ruídos foram removidos pela ferramenta Pre.cluster do pacote Mothur, enquanto que as quimeras introduzidas no processo de PCR foram detectadas e removidas usando ChimeraUquime. Depois disso, as sequências qualificadas foram agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (OTUs) definidas por um nível de distância de 3 % com base na matriz de distância e em uma malha de *boot* maior que 60 %.

A classificação taxonômica foi realizada com o banco de dados do gene SILVA 16S rRNA (usando um consenso de “k” vizinhos mais próximos e abordagem de Wang). Valores de confiança inferiores a 80 % (em nível de filo) foram considerados “não classificados” de acordo com Wang *et al.* (2007). As análises estatísticas e gráficas foram realizadas com o pacote Vegan (OKASANEN *et al.*, 2010) para o programa R (<http://www.R-project.org/>).

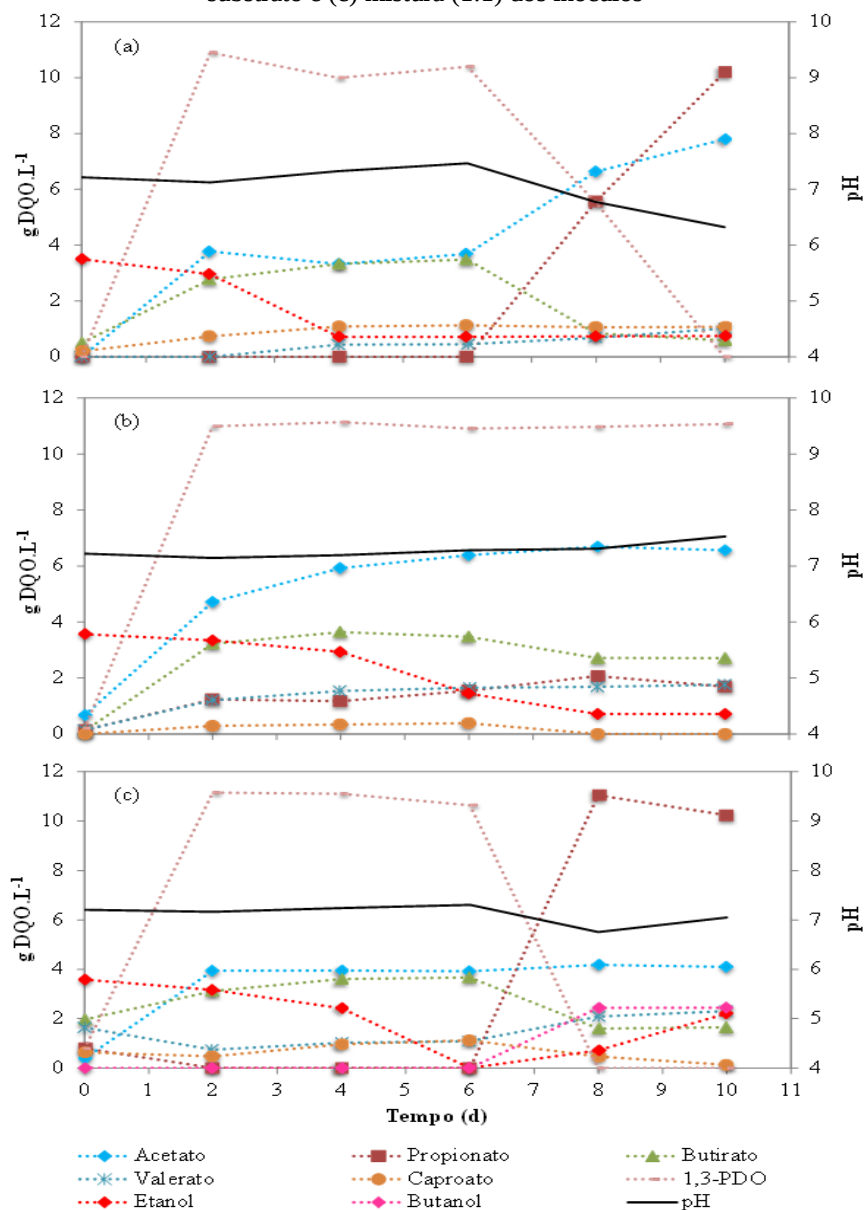
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 Experimento 1: Efeito dos inóculos sobre os produtos (em batelada)

Estes testes em batelada foram realizados para avaliar a viabilidade de adicionar uma parte do lodo proveniente de um reator caprogênico ao reator adaptado para consumo de glicerol bruto a fim de aumentar a produção de ACCM usando etanol como doador de

elétrons nas reações de alongamento de cadeia a partir de glicerol bruto. Além disso, como a produção de metabólitos utilizando glicerol (substrato) pelo lodo caprogênico ainda era desconhecida, inicialmente optou-se por experimentos em pH neutro. Os resultados obtidos para os três testes (T1, T2 e T3) estão apresentados na Figura 16.

Figura 16 - Concentração dos produtos usando (a) inóculo do reator caprogênico (T1), (b) inóculo do reator adaptado para uso de glicerol como substrato e (c) mistura (1:1) dos inóculos



Fonte: Autora (2019).

Com glicerol bruto como substrato (T1), o lodo do reator adaptado para produção caproato, alimentado por muito tempo com fermentado de caldo de cana (substrato rico em etanol e, portanto, fonte de doador de elétrons) (CAVALCANTE, 2016), produziu

principalmente 1,3-PDO como produto da via reductiva (concentração máxima de 11 g DQO.L⁻¹); e propionato e acetato (ACCC) como produtos da via oxidativa, em concentrações máximas próximas a 10 e 8 g DQO.L⁻¹, respectivamente (Figura 16a).

O teste T2 (Figura 16b), usando inóculo adaptado para glicerol, apresentou maior concentração de 1,3-PDO e acetato (concentrações máximas de 11 e 7 g DQO.L⁻¹, respectivamente), ambos sendo mantidos praticamente constantes ao longo dos experimentos. Isso, provavelmente está associado ao pH utilizado (~ 7), como mostram estudos com foco na produção desse produto da via reductiva a partir de glicerol e pH entre 7 e 8 (MOSCOVIZ; TRABLY; BERNET, 2016; SAXENA *et al.*, 2009).

Para os três testes, a concentração de 1,3-PDO atingiu valor máximo (próximo a 11 g DQO.L⁻¹) durante o 2º dia. No entanto, para os testes T1 e T3 (mistura entre os inóculos, Figura 16c), a partir do 6º dia houve uma diminuição da concentração de 1,3-PDO. Dessa maneira, em pH neutro, a mistura entre os inóculos assumiu um comportamento semelhante ao observado com inóculo caprogênico, principalmente em relação à concentração de 1,3-PDO e propionato.

Além da diminuição da concentração de 1,3-PDO (mesmo em pH favorável), o teste T3 também apresentou outros pontos interessantes como maior concentração de valerato (2,3 g DQO.L⁻¹) (como principal ACCM) comparado aos testes T1 (1,0 g DQO.L⁻¹) e T2 (1,8 g DQO.L⁻¹), produção de butanol; e também, etanol. Ou seja, o etanol que havia sido adicionado juntamente com glicerol foi totalmente consumido até o 6º dia e, depois disso, passou a ser produzido. E isso poderia ser mais bem explorado durante a operação com o biorreator. Diante disso, foi decidido adicionar parte do lodo caprogênico ao reator que já vinha sendo utilizado em pesquisas com glicerol como substrato (VIANA *et al.*, 2014; VIANA, 2016). Essa adição de lodo foi feita durante a fase F2 de operação do filtro anaeróbio (descrito nas seções seguintes).

A produção de butanol pela microbiota apenas durante o teste T3 (Figura 16c) pode estar relacionada à diminuição da produção de ácido butírico, como mostra a reação 27 (Tabela 2, Seção 2). Já a produção e concentração de gases (H₂ e CO₂) em geral foram baixas (Tabela 9), no entanto, a menor concentração de H₂ para T3 comparado ao teste T1, pode reforçar o que foi mencionado sobre a produção de butanol, visto que a reação a partir do butirato consome hidrogênio. Em contrapartida, a maior concentração de caproato (1,1 g DQO.L⁻¹) para o teste T1, também pode estar relacionada com a maior disponibilidade de H₂, conforme mencionado por Arslan *et al.* (2016). Estes autores mencionaram que uma maior

pressão parcial de H₂ favorece a formação desses compostos (ex. valerato, caproato) apesar de não ser obrigatoriamente necessário que haja grande disponibilidade de H₂ para que compostos reduzidos sejam produzidos.

Tabela 9 - Concentração média em mol.L⁻¹ de H₂ e CO₂ produzidos

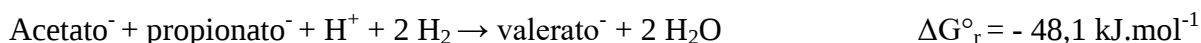
Teste	H ₂ (mol.L ⁻¹)	CO ₂ (mol.L ⁻¹)
1	0,86	1,07
2	0,10	1,07
3	0,41	1,29

Fonte: A autora (2019).

3.4.2 Experimento 2: Filtro anaeróbio + sistemas de membranas em linha

3.4.2.1 Consumo de etanol e formação dos produtos ao longo das fases de operação

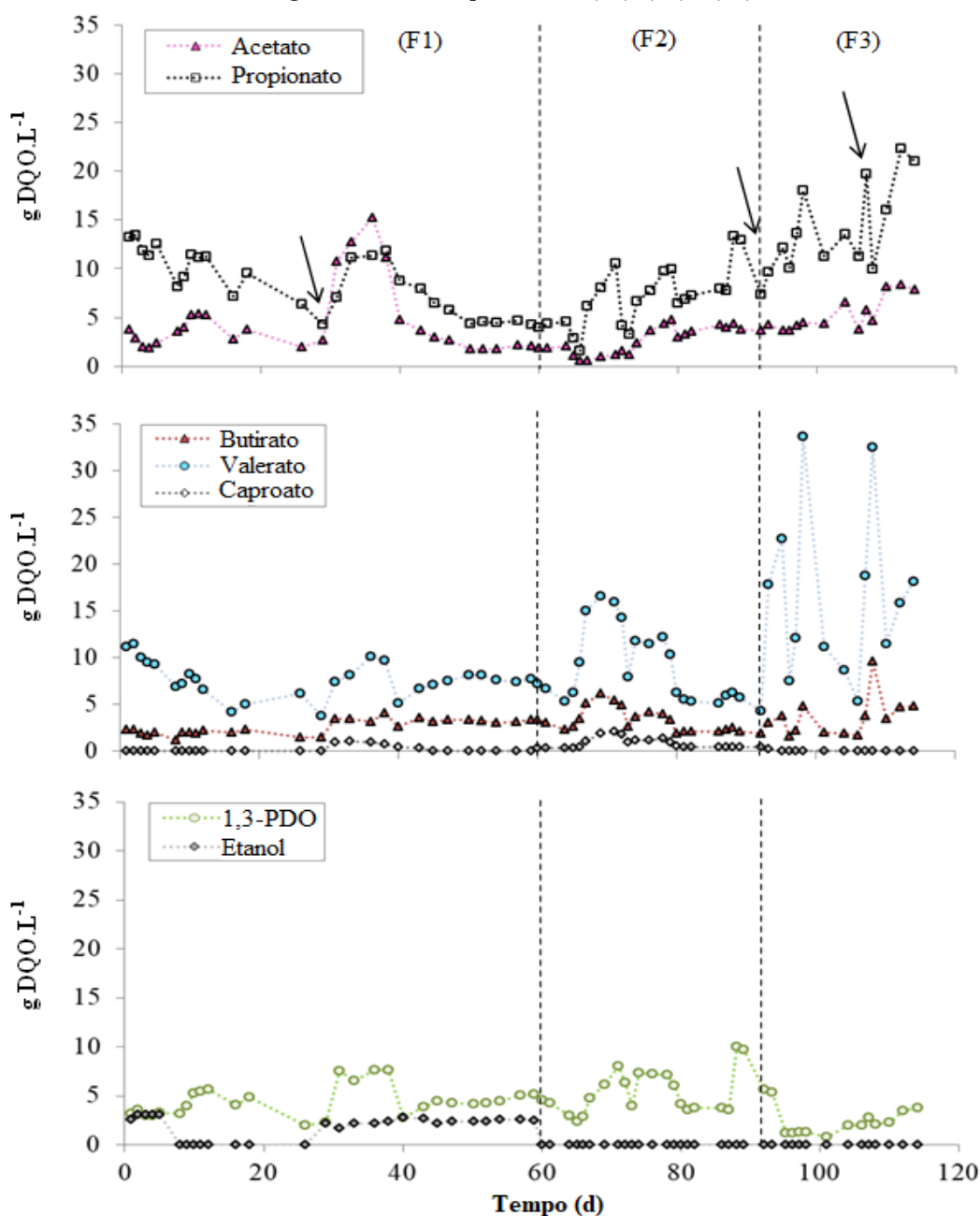
A Figura 17 mostra a concentração dos produtos ao longo das três fases de operação do biorreator: reativação/adaptação do biorreator (F1), adição do lodo caprogênico (F2) e operação com sistema de membranas (F3). Durante a F1 (dia 0 a 59, COV de 4,7 g COD.L⁻¹.d⁻¹) foi observada uma elevada produção de propionato como principal ACCC e valerato como ACCM. As concentrações médias desses dois compostos ao longo da F1 foram 8,6 e 7,7 g DQO.L⁻¹, respectivamente. Estes resultados indicam que a microbiota, que produz mais propionato (taxa de produção volumétrica de 1,12 g DQO.L⁻¹.d⁻¹) do que o acetato (0,41 g DQO.L⁻¹.d⁻¹), impulsiona o alongamento da cadeia para a formação de produtos com cadeias ímpares, como valerato (C5) ou heptanoato (C7). Com isso, diante da microbiota e condições aplicadas, provavelmente as reações 33 e 37 (Tabela 4, Seção 2) foram as reações energeticamente mais favoráveis:



Neste caso, os micro-organismos envolvidos nas reações de alongamento estariam usando os substratos com maior disponibilidade como o propionato, mais problemático em termos de toxicidade do que acetato e butirato (ARSLAN *et al.*, 2016) para suprir suas necessidades metabólicas e manter o sistema em funcionamento. Segundo Bornstein e Barker

(1948), esta adaptação a diferentes substratos pelos micro-organismos para alongamento em cadeias pares ou ímpares é possível. Eles relataram a formação de valerato apenas a partir de etanol e propionato usando uma cultura pura de *Clostridium kluyveri*, amplamente utilizada em estudos envolvendo alongamento de cadeia. Depois, também apresentaram que usando apenas etanol e acetato com a mesma cultura, o ACCM obtido foi caproato.

Figura 17 - Distribuição geral das concentrações de carboxilatos, etanol e 1,3-PDO ao longo das três fases operacionais (F1), (F2) e (F3)



Nota: Na fase F3 as concentrações de carboxilatos são a soma entre a quantidade contida no reator e a quantidade extraída. As três setas indicam os dias em que amostras de lodo foram coletadas para análises de biologia molecular. **Fonte:** A autora (2019).

Diferentemente do que foi apresentado no presente estudo, Leng *et al.* (2017), relataram que nenhuma quantidade de propionato foi produzida usando glicerol com etanol ou acetato e cultura mista com *Clostridium* como grupo dominante. Mas, por outro lado, o caproato e o 1,3-PDO foram produzidos em maior quantidade, o que pode reforçar que o glicerol também poder ser um substrato valioso para obter produtos com cadeias pares. A Tabela 4 (Seção 2) também mostra algumas reações para a formação de compostos com cadeias pares (reações 32, 34 a 36, 38 a 40).

Desta forma, compostos de cadeias pares ou ímpares podem ser obtidos usando glicerol se: (i) a microbiota existente e as condições operacionais permitirem a produção de compostos de cadeia curta necessários (acetato para compostos com cadeias pares e propionato para ímpares) e (ii) houver presença de um doador de elétrons. Diferentemente dos substratos puros utilizados por Bornstein e Barker (1948) e dos resíduos orgânicos utilizados por Agler *et al.* (2012) e Ge *et al.* (2015), o glicerol bruto não possui inicialmente doadores de elétrons em concentrações significativas. Com relação à via oxidativa, o glicerol é convertido em ácidos de cadeia curta (incluindo ácido láctico) e etanol (ver Figura 8), mas ambos em quantidades menores em comparação com outros produtos. Por outro lado, a quantidade de ácidos produzidos durante a fermentação primária torna o glicerol um forte candidato para obter produtos de alongamento de cadeia na presença de um doador de elétrons.

Por causa disso, no presente estudo a quantidade de etanol adicionada à solução de alimentação junto com glicerol bruto e nutriente foi mantida conforme definido durante pesquisas anteriores usando o mesmo biorreator. Em princípio, adicionando-se etanol em torno de 10 % da COV de glicerol, ficou comprovado a diminuição da concentração de 1,3-PDO e aumento na produção de carboxilatos, principalmente valerato como principal ACCM (de 13 para 44 % em termos de g DQO por g DQO total) (VIANA, 2016).

Além do emprego do etanol como doador de elétrons e ainda com o objetivo de melhorar a produção desses ácidos (ACCM), durante a F2 (dia 60 a 92, COV de 5,0 g DQO.L⁻¹.d⁻¹) foram adicionados 25 g SSV.L⁻¹ de lodo caprogênico ao filtro anaeróbio em operação. Depois disso, o etanol foi totalmente consumido, permanecendo assim até o final da operação (Figura 17). As concentrações médias de acetato e propionato diminuíram de 4,5 para 2,6 g DQO.L⁻¹ e 8,6 para 7,0 g DQO.L⁻¹, respectivamente, enquanto que as de butirato, valerato e caproato aumentaram de 2,6, 7,7 e 0,2 g DQO.L⁻¹ a 3,2, 8,9 e 0,8 g DQO.L⁻¹, respectivamente, em comparação com a fase F1.

Em termos de taxa de produção volumétrica, a adição do lodo caprogênico no sistema permitiu um aumento na produção de butirato, caproato e 1,3-PDO. É importante mencionar que o procedimento para adição do lodo no biorreator ocorreu em condições anaeróbias para evitar possíveis alterações nas populações microbianas. As taxas médias de produção volumétrica para todas as fases operacionais são mostradas na Tabela 10. A taxa de produção volumétrica de 1,3-PDO aumentou de 0,43 g DQO.L⁻¹.d⁻¹ (F1) para 0,52 g DQO.L⁻¹.d⁻¹. Este aumento de 1,3-PDO durante a fase F2 provavelmente está relacionado à adição de alguns grupos de micro-organismos (ex. *Clostridium*) provenientes do lodo caprogênico, que de acordo com a literatura, podem promover tanto o alongamento de cadeia e formação de ACCM como a produção de 1,3-PDO (SILVA *et al.*, 2009; LENG *et al.*, 2017).

Tabela 10 - Taxa de produção volumétrica média obtida ao longo das fases de operação (F1, F2 e F3)

Produtos	Taxa de produção volumétrica(g DQO.L ⁻¹ .d ⁻¹)		
	F1	F2	F3
Acetato	0,41	0,24	0,66
Propionato	1,12	0,63	1,75
Butirato	0,26	0,31	0,42
Valerato	0,94	0,86	1,81
Caproato	0,01	0,08	0,02
1,3-PDO	0,43	0,52	0,29

Fonte: A autora (2019).

Esses resultados mostraram que o inóculo manteve sua função de alongamento da cadeia (com aumento de C4 e C6) e se adaptou ao glicerol, uma vez que o valerato ainda continuou sendo o principal ACCM produzido. Isto sugere que, provavelmente, aqueles que determinam o tipo de produto de alongamento são as condições operacionais aplicadas e os micro-organismos dominantes.

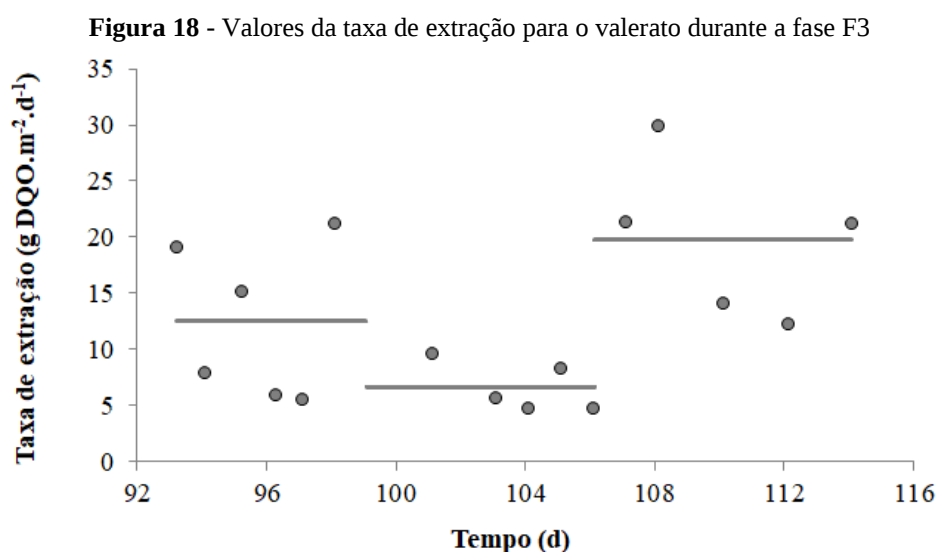
Uma baixa produção de CH₄ foi observada ao longo das três fases, sendo estes valores 30,4, 41,0 e 40,7 mmol.d⁻¹. Por outro lado, H₂ foi medido em quantidades ainda menores do que o metano: 7,1, 11,4 e 7,8 mmol.d⁻¹, estando estes valores abaixo dos dados reportados pela literatura com glicerol bruto e culturas mistas com foco em sua produção (SITTIJUNDA; REUNGSANG, 2012; VARRONE *et al.*, 2012). A baixa produção de metano foi associada ao baixo pH operacional (5,0 - 5,3) (BERMÚDEZ-PENABAD; KENNES; VEIGA, 2017), enquanto a baixa COV aplicada pode ser mencionada como um dos fatores responsáveis pela baixa produção de hidrogênio (ARSLAN *et al.*, 2016; SEIFERT *et al.*, 2009).

3.4.2.2 Extração em linha e seu efeito sobre os bioproductos

Utilizando o sistema de membranas (F3, dia 93 a 114, COV de 6,4 g DQO.L⁻¹.d⁻¹), foi observado um aumento da produtividade de todos os carboxilatos, exceto o caproato. As taxas de produção volumétrica aumentaram entre duas e três vezes para acetato, propionato e valerato (F3) em comparação com as da fase F2 (ver Tabela 10). Apesar da elevada quantidade de propionato ao longo das três fases (principalmente F3), esses valores não excederam os valores inibitórios relatados por Arslan *et al.* (2016).

Esses autores mencionaram estudos usando cultura mista em que o efeito inibitório foi observado quando o propionato representou 45 a 50 % dos ácidos totais. Durante a F3, a produção de propionato atingiu 39,5 % do total de ácidos em termos de DQO (como detalhado mais adiante). Por outro lado, utilizando a extração em linha, a taxa de produção volumétrica de 1,3-PDO diminuiu de 0,52 para 0,29 g DQO.L⁻¹.d⁻¹, sendo menor que a observada na F1. Isto sugere que a extração contínua de carboxilatos pode deslocar o sentido das reações, favorecendo a formação de mais ácidos (via oxidativa) e desfavorecendo a produção de 1,3-PDO (via redutiva).

A produtividade média de valerato durante a F3 foi 1,81 g DQO.L⁻¹.d⁻¹ (Tabela 10), sendo maior do que as das outras duas fases (F1 e F2), porém menor que alguns valores reportados pela literatura utilizando substratos puros como apresentado por Grootcholten *et al.* (2013b). Em geral, as taxas de extração de valerato apresentaram valores entre 5 e 20 g DQO.m⁻².d⁻¹ (Figura 18), com valor máximo de 30 g DQO. m⁻².d⁻¹.



Nota: A linha representa os valores médios em cada mudança de solução de extração alcalina (três trocas no total). **Fonte:** A autora (2019).

Esse valor máximo foi maior do que muitos reportados sobre a produção e extração de caproato usando o mesmo sistema de pertração. Na literatura são encontrados taxas de extração entre 1 e 20 g DQO. $\text{m}^{-2}.\text{d}^{-1}$ com relações Área de membrana/Volume reacional (A/V) entre 311 e 2000, maiores do que o utilizado no presente estudo (A/V = 109) (GE *et al.*, 2015; KUCEK *et al.*, 2016; KUCEK; NGUYEN; ANGEMENT, 2016; KUCEK; SPIRITO; ANGEMENT, 2016). Essa comparação entre os dados de extração para valerato (presente estudo) e caproato (literatura) foi feita diante da falta de dados para a extração de valerato e também, porque até agora o caproato tem sido o ACCM mais estudado.

Além do valerato (62 %), acetato, propionato e butirato também foram extraídos, mas em concentrações menores, representando em média 6 %, 21 % e 10 % (na base de DQO) dos carboxilatos totais extraídos, respectivamente (RC_i/R , Tabela 11). Para a produção de valerato (C5), vale ressaltar que o intermediário (propionato, C3) é o ACCC produzido e extraído em maior quantidade, como acontece com o butirato como intermediário caproato.

Tabela 11 - Visão geral dos produtos obtidos com e sem sistema de pertração

Produtos	Visão geral da operação com o sistema de pertração		
	RC_i/R	$\text{RC}_{i(\text{máx})}$ (g DQO. $\text{m}^{-2}.\text{d}^{-1}$)	$\text{RC}_{i(\text{médio})}$ (g DQO. $\text{m}^{-2}.\text{d}^{-1}$)
Acetato	0,06	5,3	1,3
Propionato	0,21	13,2	4,4
Butirato	0,10	8,5	2,2
Valerato	0,62	30,0	12,9
Caproato	0,01	N.A.	N.A.
1,3-PDO	N.A.	N.A.	N.A.
Total extraído = 20,8			

Onde: R representa a taxa de extração total, RC_i a taxa de extração do metabólito com “i” átomos de carbono e N.A. significa não aplicável (já que a produção de caproato foi praticamente muito baixa e o 1,3-PDO não foi extraído). **Fonte:** A autora (2019).

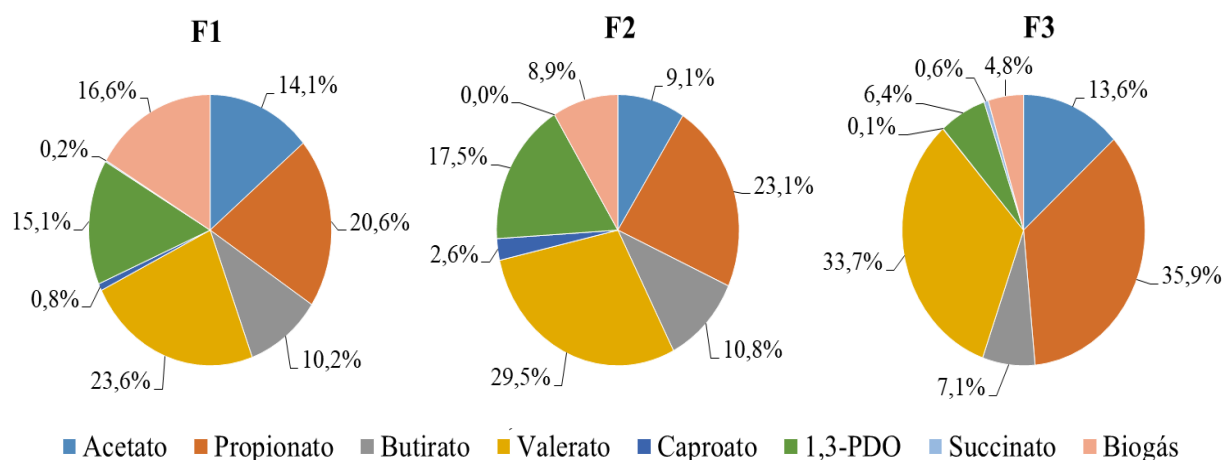
Durante toda a F3, foram obtidas taxas médias de extração de 12,9 g DQO. $\text{m}^{-2}.\text{d}^{-1}$ e 20,8 g DQO. $\text{m}^{-2}.\text{d}^{-1}$ para o total de valerato e carboxilatos extraídos, respectivamente (Tabela 11), sendo o valerato produto principal de extração. Comparando-se essa taxa de extração de valerato com a relatada para o caproato (próximo a 70%, Kucek *et al.* 2016), a eficiência média de extração (quantidade de valerato extraído por valerato produzido) durante a F3 não foi alta (53,6 %).

É importante destacar também que o entupimento do sistema de filtros (Figura 15) e o acúmulo de gás nas tubulações também podem ter desfavorecido o processo de extração e

resultado nas oscilações observadas para a taxa de extração (Figura 18). Por causa disso, mesmo por curtos intervalos de tempo, frequentemente o funcionamento do sistema de pertração teve que ser interrompido para manutenção. Outro ponto que precisa melhor explorado em trabalhos futuros é a afinidade entre o TOPO e o valerato. Esse agente extrator tem sido utilizado em processos de extração envolvendo compostos com cadeias maiores (maior cadeia, maior afinidade entre eles, ver Seção 2.5). Então a extração do valerato, por ter menor cadeia em comparação ao caproato e caprilato, por exemplo; também pode ter sido afetada.

Além desses fatores, o pH da solução alcalina abaixo de 9 também pode ter contribuído para as oscilações nas taxas de extração. A literatura cita que o ideal é usar valores próximos a 9 para o pH da solução alcalina e menciona que além do gradiente de concentração, o gradiente de pH reator-solução alcalina também é importante (GE *et al.*, 2015; KUCEK *et al.*, 2016; KUCEK; NGUYEN; ANGEMENT, 2016; KUCEK; SPIRITO; ANGEMENT, 2016). Os estudos com produção de extração de caproato e caprilato com o mesmo sistema de membranas definiram o pH ótimo para a alcalina nessa faixa e, por isso, foi decidido seguir com o pH próximo a 9. No entanto, alguns estudos como os de Kertész e Schlosser (2005), apresentaram modelos matemáticos para simulação das condições para operação de membranas de fibras ocas. Sendo assim, outros parâmetros podem ser considerados a fim de diminuir os problemas durante a operação (sugestão para trabalhos futuros).

No que diz respeito à distribuição dos produtos (em termos de g DQO do produto por g DQO total), a Figura 19 foi elaborada para facilitar a percepção das principais modificações ao longo das fases de operação. A partir da Figura 19, foi possível observar o aumento dos carboxilatos produzidos ao longo do tempo. Durante a F1, os ácidos totais representaram 64 % dos produtos totais. Já durante as fases F2 e F3 esses valores aumentaram ainda mais para 75 % e 91 %, respectivamente. Este aumento na produção de ácidos foi acompanhado por uma produção significativa de propionato, representando 29,6 %, 30,8 % e 39,5 % do total da carboxilatos produzidos durante as três fases, respectivamente. Tendo em vista a grande disponibilidade de propionato, talvez a produção e extração de valerato pudessem ser melhoradas com maior adição de doador de elétrons. O erro < 3 % na soma dos produtos pode estar relacionado ao funcionamento do sistema de extração.

Figura 19 - Distribuição dos produtos nas três fases operacionais (F1, F2 e F3)

Nota: biogás refere-se a soma entre H₂ e CH₄. **Fonte:** A autora (2019).

3.4.3 Comunidade microbiana

Com a plataforma MiSeq Illumina foram produzidos um total de leituras de 64.318, 81.296, 66.045 e 55.908, para as amostras S1, S2, S3 e S4, respectivamente. Depois de remover as sequências de baixa qualidade, ruídos e quimeras, foram consideradas para análises posteriores um total de leituras de 56.323 (S1), 69.843 (S2), 56.103 (S3) e 47.896 (S4). Os comprimentos médios foram de 451 pb (pares de base). Os estimadores de cobertura, riqueza e uniformidade foram calculados e estão resumidos na Tabela 12. O índice de riqueza específico (S_{obs}) calcula o número de espécies dentro de amostras. S_{obs} e Chao1 (um estimador de cobertura baseado no S_{obs}), bem como o número de *single* e *doubletons* detectados, evidenciaram uma riqueza (diversidade) similar para as quatro amostras.

Os valores do índice de Simpson próximos de zero indicam uma diversidade muito alta em todas as quatro amostras. Embora de acordo com este índice, a diversidade microbiana foi maior em S2 (lodo caprogênico adicionado ao biorreator durante a F2) do que nas outras três. Os dois índices de Shannon ($H > 3$, $E_H > 0.3$) revelaram uma alta uniformidade. O índice de Gini, que considera a riqueza e a uniformidade, fornece uma medida para a desigualdade em uma população. Valores semelhantes e altos (alta diversidade) foram observados em relação às quatro amostras. De acordo com o estimador de cobertura de Good, foi alcançado um censo quase total.

Tabela 12 - Índices de cobertura, diversidade e uniformidade

Amostra (dia da coleta, fase de operação)	S1 (dia 29, F1)	S2 (dia 60*, F2)	S3 (dia 92, F2)	S4 (dia 107, F3)
Total de leituras (sequências)	64318	81296	66045	55908
Leituras de alta qualidade	56323	69843	56103	47896
Comprimento médio	455	440	454	456
S _{obs}	1281	1386	1341	942
Chao1	3190±407	2884±314	2542±305	2117±292
Simpson	0,11±0	0,06±0	0,12±0,01	0,13±0,01
Shannon (H)	3,31±0,02	3,97±0,01	3,39±0,02	3,11±0,02
Shannon even (E _H)	0,46	0,55	0,47	0,45
Gini	0,9676	0,9451	0,9634	0,9671
Cobertura de Good	99 %	99 %	99 %	99 %

*Lodo caprogênico adicionado ao filtro anaeróbio no dia 60. **Fonte:** A autora (2019).

As atribuições das sequências foram realizadas em vários níveis taxonômicos para melhor compreensão dos deslocamentos populacionais bacterianos durante a operação do biorreator. No nível de filos, pequenas diferenças foram observadas. Todas as amostras apresentaram dominância dos filos *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* e *Actinobacteria* (Figura 20a). Os micro-organismos pertencentes ao filo *Firmicutes* apresentaram predominância em todo o experimento (com 50 % a 85 % de todas as sequências confiáveis), como encontrado de forma semelhante por Jankowska *et al.* (2018) em seu estudo com conversão de resíduos orgânicos e produção de ácidos. Filos menores, como *Synergistetes*, *Spirochaetes*, *Caldiserica*, também estavam presentes, mas com cobertura inferior a 1 % das sequências.

O cenário observado em nível de família foi mais diversificado para as amostras (Figura 20b). Dentro do inóculo (amostra S1), apenas três famílias representavam 73 % das sequências classificadas nesse nível: *Veillonellaceae*, *Ruminococcaceae* (ambas dentro da Ordem *Clostridiales*, Filo *Firmicutes*) e *Enterobacteriaceae* (Filo *Proteobacteria*). O lodo caprogênico (amostra S2), adicionado como novo inóculo no 60º dia de operação do biorreator (fase F2), apresentou uma grande biodiversidade. Para essa amostra, houve predominância da família *Clostridiaceae*, seguida por outras com valores entre 3 e 9 % das sequências confiáveis, como: *Lachnospiraceae*, *Planococcaceae*, *Ruminococcaceae*, *Peptostreptococcaceae* (dentro da ordem *Clostridiales*, *Firmicutes*), *Bacilli* (ordem *Bacillales*, *Firmicutes*), *Porphyromonadaceae* (*Bacteroidetes*) e *Propionibacteriaceae* (*Actinobacteria*).

Após um mês de operação, o lodo apresentou um padrão diferente (amostra S3). A maioria das famílias presentes no lodo caprogênico (S2), *Lachnospiraceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Planococcaceae*, *Porphyromonadaceae*, *Ruminococcaceae* e, em menor extensão, *Clostridiaceae*, podem não ter se adaptado bem às condições operacionais, não resistindo ou permanecendo inativos. Dessa maneira, o padrão da comunidade bacteriana após a mistura dos inóculos (S1 e S2), se assemelhou à composição do inóculo S1, embora com diferentes contribuições de cada família para a população.

A comunidade bacteriana mudou pouco após a introdução do sistema de pertração (amostra S4). A mudança mais significativa foi o desaparecimento de membros da família *Rikenellaceae* e o notável aumento dos pertencentes à *Peptostreptococcaceae*. Os micro-organismos dessas famílias são anaeróbios estritos, com metabolismo fermentativo. Considerando a fermentação de açúcares, os membros da família *Rikenellaceae* produzem succinato e, dependendo do gênero em questão, podem produzir propionato; podendo estar associados à produção deste último nas fases F1 e F2. Já os membros da família *Peptostreptococcaceae* produzem caproato como produto final da fermentação (MARCHANDIN; JUVONEN; HAIKARA, 2009).

Com relação aos gêneros (Figura 20c), a primeira coisa que chamou atenção foi o baixo número de sequências identificadas nesse nível taxonômico para o inóculo (S1). Apenas OTUs pertencentes aos gêneros *Clostridium*, *Megasphaera* e *Mitsuokella* (25 % das leituras), podem ser atribuídos com uma cobertura superior a 2 % das leituras taxonômicas confiáveis atribuídas. Todos esses gêneros estão contidos na ordem *Clostridiales* (incluindo uma OTU *Incertae Sedis*). A maioria das sequências era ligada às famílias *Enterobacteriaceae* e *Ruminococcaceae* e não podiam ser atribuídas a um gênero específico.

Algo semelhante, embora em menor extensão, aconteceu para as outras três amostras. O inóculo do reator caprogênico (S2) apresentou maior diversidade, como mostra o índice de Simpson. No entanto, vários gêneros, como *Anaerobacter*, *Bacillus*, *Dysgonomonas*, *Lysinibacillus*, *Parabacteroides* e *Propionibacterium* não foram capazes de se manter nas condições do biorreator alimentado com glicerol.

Após três meses de operação (amostra S3), o gênero mais perceptível foi *Mitsuokella* (30,6 % das leituras) dentro da família *Veillonellaceae*. Os membros desse gênero são obrigatoriamente anaeróbios, com metabolismo fermentativo, e são capazes de utilizar uma variedade de carboidratos. Com glicose, eles são capazes de produzir lactato, acetato e

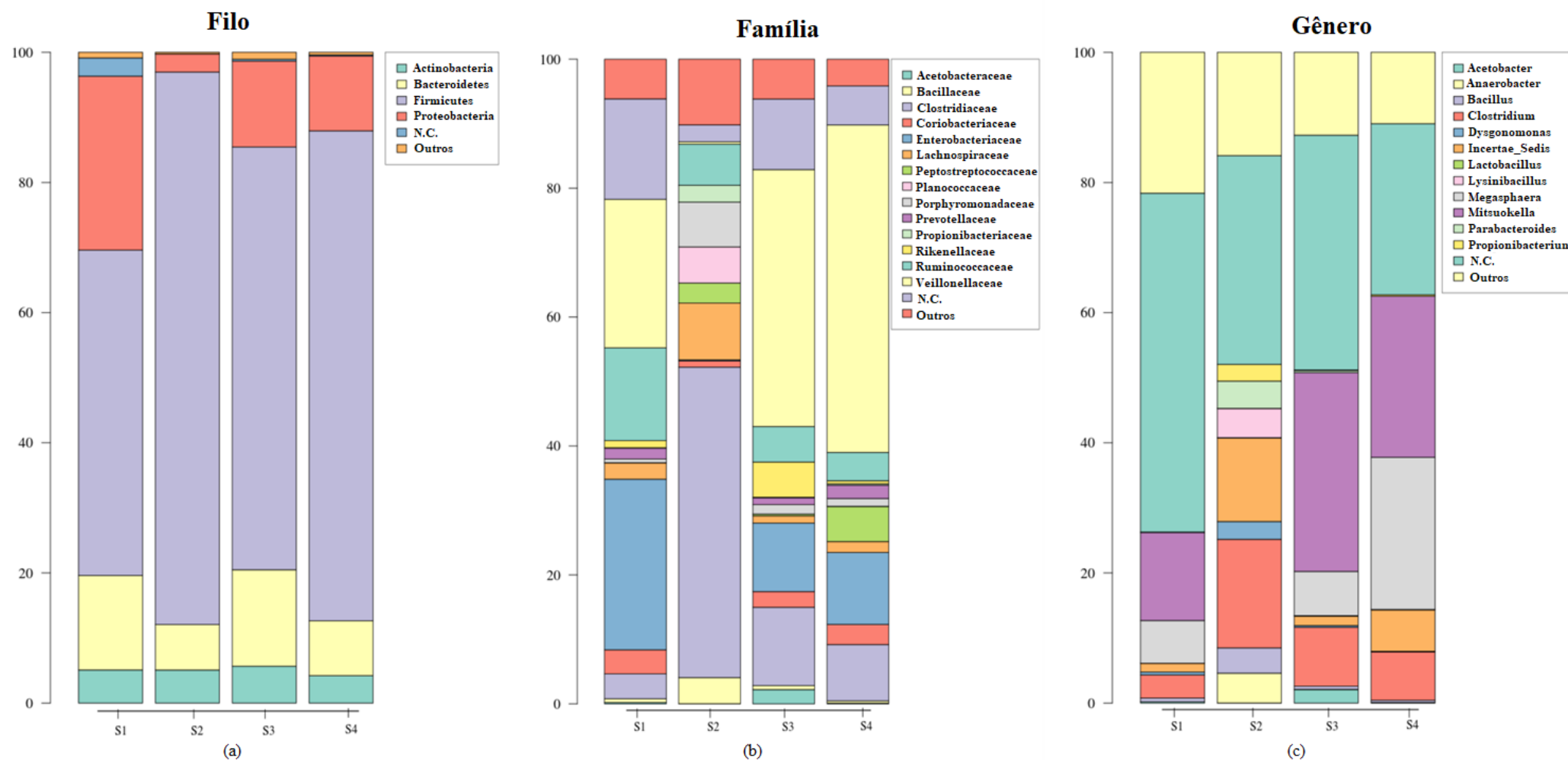
succinato como produtos finais da fermentação. Esses micro-organismos podem estar relacionados ao aumento da concentração de ácido acético observado nas fases F2 e F3 (Figura 17).

O acoplamento do sistema de pertração para a extração seletiva de ácidos causou mudanças na população bacteriana (amostra S4). A mudança mais clara foi o notável aumento (até 23,4 % do total de sequências) do gênero *Megasphaera*, pertencente à família *Veillonellaceae*. Dependendo da espécie considerada, os principais produtos de fermentação desses micro-organismos são acetato, propionato, butirato, valerato e caproato. Para micro-organismos da espécie *M. elsdenii* e *M. cerevisiae*, o principal produto da fermentação é o caproato. Já para a espécie *M. paucivorans*, *i*-valerato é o principal produto. Além destes, a espécie *M. sueciensis* também foi citada como produtora de valerato (*n*- e *i*-valerato) (MARCHANDIN; JUVONEN; HAIKARA, 2009).

A sequência de consenso da OTU 5, afiliada à *Megasphaera* sp., possui 99 % de identidade com *M. elsdenii* (cepa DSM 20460 ATCC 25940, ref. NCBI CP027570). *M. elsdenii* realiza fermentação de lactato com produção de butirato e caproato como produtos principais, e de valerato, acetato e propionato em menor quantidade. O alto número de OTU 5 poderia explicar a falta de lactato, principal subproduto da fermentação de *Mitsuokella*, no biorreator. Além disso, também foi relatado que algumas cepas de *M. elsdenii* produziram valerato em quantidades mais elevadas do que o caproato a partir de glicose (MAROUNEK; FLIEGROVA; BARTOS, 1989).

Outros pesquisadores como Angenent *et al.* (2016) também mencionaram que é possível obter valerato desses micro-organismos. Segundo eles, a formação de acetato, propionato, butirato, valerato, caproato, hidrogênio e dióxido de carbono; é possível e as quantidades produzidas dependem das cepas bacterianas e do substrato aplicado. O crescente número de *Megasphaera* aconteceu em paralelo com o aumento da produção de valerato. Por isso, neste trabalho, *M. elsdenii* parece ter sido o micro-organismo chave para a produção de valerato. De maneira similar ao reportado por Bornstein e Barker (1948) com *C. kluyveri* (discutido anteriormente), eles podem ser utilizado para formação dos produtos de alongamento tanto de compostos com cadeias pares como ímpares.

Figura 20 - Perfis taxonômicos no nível de filo (a), família (b) e gênero (c) do biorreator



Nota: *Taxas* com cobertura inferior a 1 % (filo) ou 2 % (família e gênero) foram agrupadas como “outras” e membros não classificados estão representados por N.C. **Fonte:** A autora (2019).

3.5 CONCLUSÕES

- Os resultados mostraram que o glicerol residual é um substrato muito promissor para a bioprodução de valerato através do alongamento da cadeia.
- Os testes em batelada com a mistura entre os lodos do reator adaptado para consumo de glicerol e caprogênico, mostraram um aumento na produção de ACCM. A elevada concentração de 1,3-PDO ($\sim 11 \text{ g DQO.L}^{-1}$) observada foi associada ao pH neutro aplicado nos experimentos.
- Propionato foi o ACCC produzido em maior quantidade durante as três fases operacionais (1,12, 0,63 e 1,75 g DQO.L⁻¹.d⁻¹, para F1 a F3, respectivamente), enquanto que o ACCM foi o valerato (0,94, 0,86, 1,81 g DQO.L⁻¹.d⁻¹, para F1 a F3, respectivamente). A mistura entre os lodos (F2) favoreceu a produção de butirato e caproato, em conformidade com os resultados obtidos em batelada. No entanto, o valerato continuou apresentando maior produtividade em relação aos demais produtos de alongamento, sendo ainda maior durante a F3 (com sistema de pertração em linha).
- Até o momento, as maiores taxas de extração (valores médio e máximo iguais a 12,9 e 30,0 g DQO.m⁻².d⁻¹, respectivamente) foram obtidas para valerato com baixa adição de etanol (10 – 15 % da DQO referente ao glicerol). Além disso, o sistema de extração em linha provavelmente favoreceu a produção de ácidos carboxílicos (via oxidativa) e desfavoreceu a produção de 1,3-PDO (via redutiva).
- A eficiência de extração do valerato foi satisfatória (em torno de 54 %), mas pode ter sido influenciada por fatores como: (i) acúmulo de biomassa nos filtros; (ii) pH da solução alcalina abaixo de 9 devido a problemas na dosagem de NaOH, e (iii) baixa afinidade entre TOPO (agente extrator) e valerato; portanto, trabalhos futuros podem se concentrar em estratégias para otimização do processo de extração.
- Em geral, uma elevada diversidade microbiana foi encontrada em todas as amostras de lodo, sendo o filo *Firmicutes* predominante ao longo do experimento. Uma vez que o lactato não foi detectado no efluente, a dominância do gênero *Mitsuokella* (final da F2 e durante a F3), que são produtores de lactato; e o aumento de *Megasphaera* (na F3), que são consumidores de lactato e produtores de ACCM, pode indicar que estes foram fundamentais para a produção de valerato.

4 PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL EM REATORES UASB A PARTIR DE GLICEROL POR CULTURAS MICROBIANAS MISTAS FIXAS EM SUPORTES DE POLIURETANO

Parte desta seção será publicada em um periódico (a definir), com título: *Production of 1,3-propanediol from glycerol in an anaerobic reactor with polyurethane foam*, sob autoria de Shyrlane T.S. Veras, Patricia R. Ojeda, Lourdinha Florencio, Mário T. Kato e Jose L. Sanz

4.1 INTRODUÇÃO

A produção de 1,3-propanodiol (1,3-PDO) a partir de glicerol usando processos biológicos tem sido amplamente estudada (SAXENA *et al.*, 2009; SUN *et al.*, 2018). Várias metodologias têm sido avaliadas principalmente diante do emprego de culturas puras. Entre estas, culturas de *Klebsiella pneumoniae* e *Clostridium butyricum* têm recebido maior ênfase (DIETZ; ZENG, 2013). Por outro lado, espécies pertencentes aos gêneros *Lactobacillus*, *Citrobacter*, *Escherichia* e *Hafnia* também são capazes de formar esse composto (DROZDZYŃSKA *et al.*, 2014; PRZYSTAŁOWSKA *et al.*, 2015; VIVEK; PANDEY; BINOD., 2016a).

Apesar do maior número de trabalhos envolvendo culturas microbianas puras, alguns desafios podem inviabilizar economicamente a produção em larga escala, principalmente se considerar o uso de um substrato não-estéril, como o glicerol bruto (NAKAZAWA *et al.*, 2017). Muitas são as exigências operacionais para um bom funcionamento com cultivos puros como: (i) meios nutricionais específicos; (ii) novas fontes de substrato (co-fermentação); (iii) manter o meio livre de outros micro-organismos e (iv) patogenicidade e difícil acesso de muitas cepas.

Em virtude disso, estudos envolvendo culturas mistas têm destacado alguns pontos importantes como: (i) maior facilidade de controle operacional; (ii) permitem elevada produção de metabólitos; (iii) envolvem elevada diversidade microbiana capaz de degradar substratos brutos (não estéreis) e (iv) menores custos (CAVALCANTE *et al.*, 2017; NAKAZAWA *et al.*, 2017). No entanto, ainda há um número menor de trabalhos, principalmente envolvendo sistemas contínuos.

Com sistemas contínuos e culturas mistas, em geral os melhores rendimentos reportados ficaram entre 0,5 e 0,7 mol de 1,3-PDO por mol de glicerol consumido

(GALLARDO *et al.*, 2014; MOSCOVIZ; TRABLY; BERNET, 2016; VARRONE *et al.*, 2017; YANG *et al.*, 2017). Diante do exposto, há um interesse em aperfeiçoar o emprego de culturas mistas a fim de melhorar o rendimento de 1,3-PDO.

Neste contexto, algumas pesquisas têm apostado no uso de células imobilizadas microbianas, que oferece várias vantagens como: (i) operação contínua com elevada densidade celular; (ii) possibilidade de reuso do biocatalisador e (iii) fácil processamento posterior do produto (SOUZA; ROSSI; AYUB, 2014). Entre estas, o maior número de células no meio reacional tem sido responsável por maiores rendimentos comparados aos obtidos com culturas suspensas (CASALI *et al.*, 2012; GUNGORMUSLER; GONEN; AZBAR, 2013); e também, tem favorecido os processos que utilizam micro-organismos com crescimento lento (RITTMANN, 2018).

Apesar das vantagens mencionadas, a maioria dos trabalhos reportados foi feita em culturas com células suspensas (SOUZA; ROSSI; AYUB, 2014; CASALI *et al.*, 2012), resultando em processos com maiores volumes (GUNGORMUSLER; GONEN; AZBAR, 2013). Entre os poucos trabalhos com uso de biofilmes, diferentes materiais foram testados como meio de suporte para as culturas fixas, como fios de aço inoxidável, anéis de Raschig de vidro, Vukopor[®] (filtros de espuma cerâmica) e poliuretano.

4.2 OBJETIVOS

4.2.1 Geral

Avaliar a produção de 1,3-PDO a partir de glicerol utilizando dois tipos de culturas mistas fixas em espumas de poliuretano bem como determinar as melhores condições operacionais em reatores UASB contendo esses biofilmes.

4.2.2 Específicos

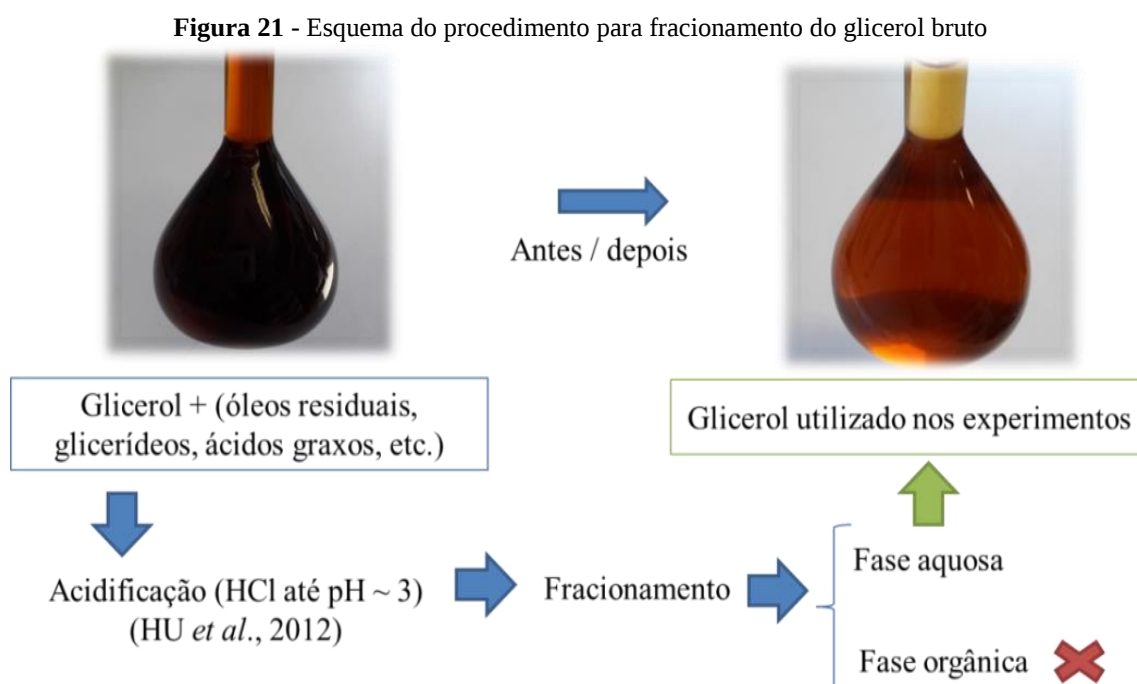
- Analisar a produção de 1,3-PDO a partir de glicerol puro e bruto por duas culturas mistas;
- Avaliar a formação de biofilme por essas duas culturas mistas em espumas de poliuretano (meio de suporte);

- Avaliar o rendimento de 1,3-PDO e determinar as condições que resultaram em melhor desempenho utilizando dois reatores UASB em escala de bancada, cada um com biofilme formado por uma das culturas mistas;
- Caracterizar a microbiota do sistema reator-biofilme com melhores resultados, por meio de técnicas de biologia molecular e microscopia.

4.3 MATERIAIS E MÉTODOS

4.3.1 Glicerol bruto

O glicerol bruto utilizado nos experimentos foi cedido pela planta de biodiesel de Elda (Alicante, Espanha) do grupo *Beta Renewable*. A produção de biodiesel era feita a partir do reuso de azeites. Diante da elevada quantidade de óleos residuais, foi necessário promover um fracionamento das fases (aquosa e oleosa). Esse procedimento foi feito conforme descrito por Hu *et al.* (2012), onde primeiramente foi feita uma acidificação com HCl concentrado e, em seguida, foi feita uma separação das fases com funil de separação. Nessa etapa, a fase orgânica foi removida e a fase aquosa, contendo glicerol, foi armazenada em frascos de 1L. A Figura 21 mostra um esquema resumindo o procedimento descrito.



Fonte: A autora (2019).

O teor de glicerol (% m/m), pH e densidade da fase aquosa extraída, foram determinados conforme metodologia apresentada por Hu *et al.* (2012). Para determinação do pH, cerca de $1,0 \pm 0,1$ g de glicerol bruto foi dissolvido em 50 mL de água milli-Q em temperatura ambiente. Em seguida, o pH da solução foi medido com um pHmetro. A densidade, por sua vez, foi determinada pela relação massa/volume de glicerol bruto em temperatura ambiente. E, por último, o teor de glicerol foi determinado por HPLC.

4.3.2 Experimento 1: Inóculos e produção de 1,3-PDO (batelada)

Os testes em batelada envolveram duas culturas mistas adaptadas para consumo de glicerol. Um dos inóculos (C1), foi procedente de um reator UASB utilizado em pesquisa com glicerol no Departamento de Biologia Molecular, Universidade Autónoma de Madrid, na Espanha. Antes mesmo de iniciar os experimentos, este consórcio microbiano já vinha sendo mantido ativo por meio de transferências (passes) consecutivas a cada quatro dias, onde 1 % v/v de inóculo era transferido usando uma seringa estéril hipodérmica para um meio fresco e autoclavado (120 °C por 20 min) contendo glicerol bruto ($\sim 15 \text{ g.L}^{-1}$) e nutrientes (Tabela 13).

Tabela 13 - Composição da solução de nutrientes

Macronutrientes ^a	Concentração (g.L^{-1})	Micronutrientes ^b	Concentração (mg.L^{-1})
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	3,400	$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2,000
KH_2PO_4	1,300	ZnCl_2	0,050
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,000	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,500
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,200	$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,142
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,020	H_3BO_3	0,050
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,005	$\text{CuCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,038
		$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2,000
		$\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,090
		$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,050
		EDTA	1,000
		Resazurina	0,200

Fonte: ^aVarrone *et al.* (2013) e ^bFlorêncio *et al.* (1993).

Como inóculo (C2), foi utilizado o lodo obtido de testes em batelada (pH ~ 7) para produção de 1,3-PDO, proveniente inicialmente de um filtro anaeróbio (suportes de PVC, conduítes corrugados) alimentado também com glicerol bruto (com teor de glicerol de 79 %).

Além desses dois inóculos (C1 e C2) contendo culturas microbianas mistas, um terceiro teste (C3) foi feito com uma mistura 1:1 de cada inóculo a fim de verificar alguma modificação significativa na produção de 1,3-PDO.

Para os testes em batelada, foram utilizados frascos de soro (120 mL) com volume útil de 50 mL. O meio nutricional foi inicialmente composto por glicerol puro (97 %, VWR Chemicals BDH Pro Lab[®], Bélgica) (15 g.L⁻¹) e a mesma solução de nutrientes que já vinha sendo utilizada para manter o C1 ativo (Tabela 13). 1 g de NaHCO₃ por g DQO de glicerol foi adicionado para proporcionar alcalinidade suficiente. Os frascos contendo o substrato e nutrientes foram fechados com rolhas de borracha butílica e selados com tampas de alumínio. Para manter a atmosfera inerte, a purga de oxigênio no *headspace* foi feita com uma mistura de N₂ e CO₂ (80:20) durante 3 min.

Além disso, 1 mL de sulfeto de sódio (Na₂S.9H₂O, 100 g.L⁻¹) por litro de solução de alimentação foi adicionado para remover o oxigênio dissolvido. Todos os frascos utilizados foram autoclavados antes de receber o inóculo (1 % v/v). O pH inicial apresentava-se entre 7 e 7,5, sem o uso de reagentes para correção. Subsequentemente após a inoculação, as garrafas foram mantidas sob agitação (120 rpm) e condições mesofílicas (30 ± 2 °C) em sala climatizada. Cada teste foi feito em triplicata e tiveram a duração de 3 a 4 dias com coletas no início e fim para determinação de metabólitos. Por último, os testes foram repetidos nas mesmas condições, porém utilizando glicerol bruto.

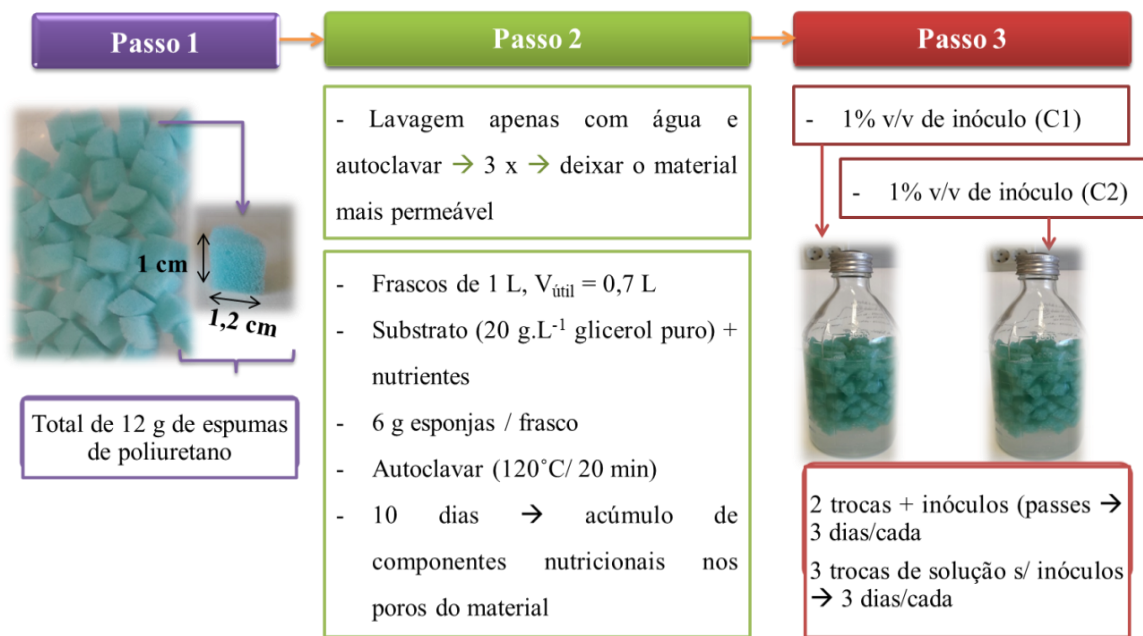
4.3.3 Experimento 2: Formação de biofilme nos suportes de poliuretano

O procedimento para a formação do biofilme nos suportes de poliuretano envolveu basicamente três passos, como mostra a Figura 22. O primeiro passo consistiu em cortar as espumas em pequenos pedaços (aproximadamente 1 cm de altura). Em seguida, durante o segundo passo, eles foram lavados com água e autoclavados (120 °C por 20 min). Esse procedimento foi feito três vezes para deixar o material mais permeável. Ainda durante essa etapa, em torno de 12 g do material foi dividido igualmente e colocado em dois frascos de borossilicato de 1 L com volume útil igual a 0,7 L.

Cada frasco continha um meio nutricional composto por glicerol puro (20 g.L⁻¹), NaHCO₃ (1g.g DQO⁻¹) e a mesma solução de nutrientes descrita anteriormente (Tabela 13). Os frascos foram fechados com rolhas de borracha butílica, selados com tampas de alumínio e mantidos em atmosfera inerte (N₂ e CO₂, 80:20, por 5 min). Depois disso, foram novamente

autoclavados, sendo mantidos em temperatura ambiente por 10 dias antes de adicionar os inóculos para favorecer o acúmulo/deposição dos componentes nutricionais nas fibras do material.

Figura 22 - Esquema do procedimento adotado para a formação de biofilme em espuma de poliuretano



Fonte: A autora (2019).

Por último, durante o terceiro passo, um dos frascos foi inoculado com C1 e outro com C2, todos com a mesma proporção (1 % v/v). A cada três dias, por duas vezes consecutivas, eles foram esvaziados e receberam uma solução nova (autoclavada) contendo a mesma composição, incluindo os inóculos (C1 e C2 em cada frasco). Essas trocas ocorriam rapidamente para evitar contato prolongado com oxigênio.

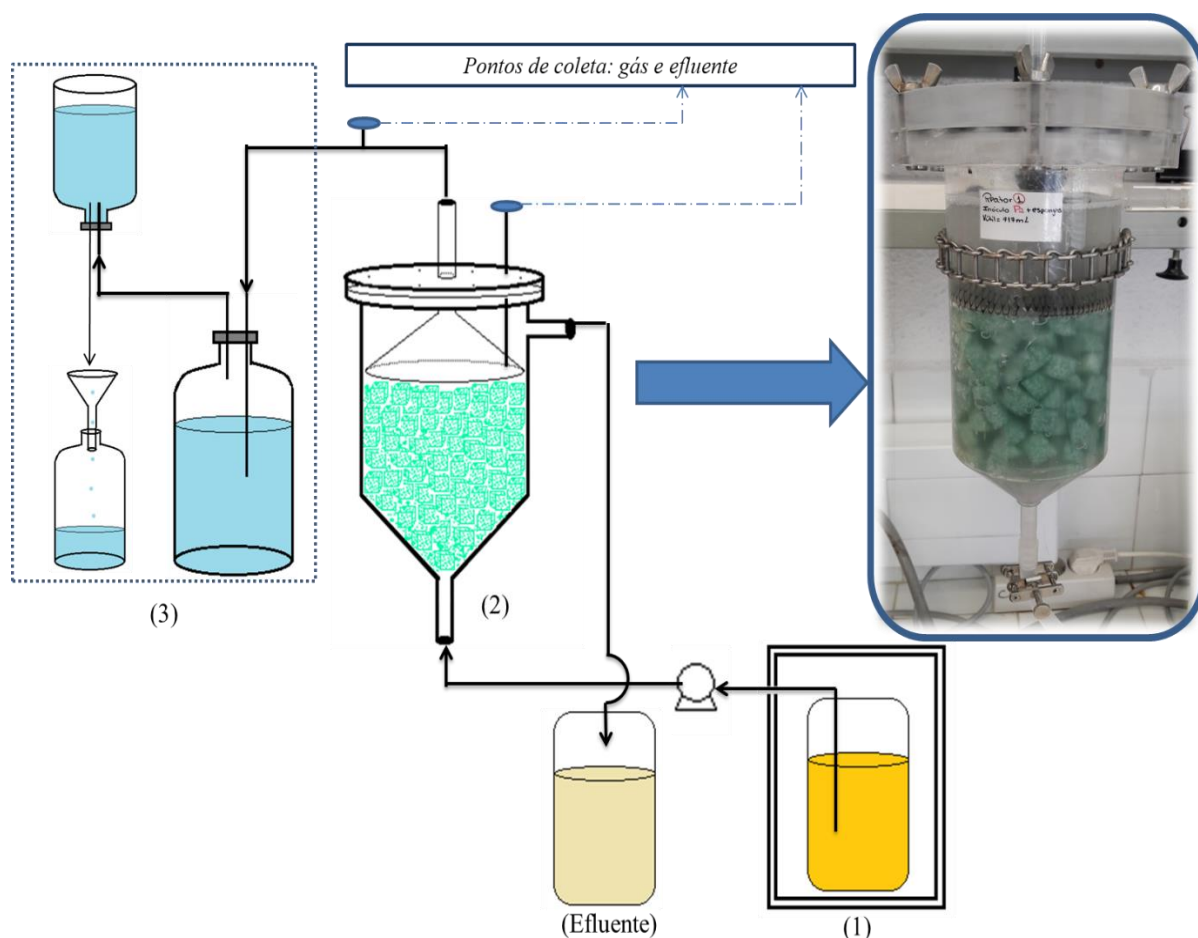
Depois disso, por mais três vezes, os frascos foram esvaziados e receberam apenas uma solução nova (mesma composição), mas sem inóculo; para comprovar por meio do consumo de glicerol e da concentração dos produtos de degradação que os micro-organismos estavam fixados no suporte. As coletas foram feitas no início e final de cada troca de solução para determinar a concentração de metabólitos.

4.3.4 Experimento 3: Reatores UASB + biomassa fixa

Um reator UASB (denominado R1) recebeu espumas de poliuretano contendo biofilme formado com o inóculo C1, enquanto que o outro (denominado R2), os suportes

contendo biofilme formado a partir do inóculo C2. O volume útil de cada reator + suportes foi 717 mL. Um esquema sobre a montagem experimental de R1 e R2 está apresentado na Figura 23. A solução de alimentação foi armazenada em um reservatório (1), que foi mantido sob refrigeração (5 e 8 °C); e bombeada para o reator (2). O biogás produzido passou por um selo de água, onde o volume foi quantificado por deslocamento (3). O separador trifásico de cada reator foi revestido com uma rede/tela plástica para garantir que todos os suportes fossem mantidos submersos.

Figura 23 - Fluxograma de funcionamento dos reatores R1 e R2



Nota: (1) Reservatório da solução de alimentação, (2) reator + suporte contendo biofilme e (3) sistema para quantificar a produção de biogás (por deslocamento). **Fonte:** A autora (2019).

O reator R1 funcionou durante 95 dias e foi alimentado apenas com glicerol puro e nutrientes, em uma única fase (F1). Para esse reator, os valores iniciais para TDH, COV, pH afluente e efluente foram $3,0 \pm 0,4$ dias, $6,5 \pm 0,8$ g gli.L⁻¹.d⁻¹, 7,5 e $6,8 \pm 0,1$, respectivamente; sendo a carga aumentada até $11,5 \pm 0,5$ g gli.L⁻¹.d⁻¹. Em contrapartida, o reator R2 foi operado durante 165 dias. Durante os 102 primeiros dias (fase F1), ele foi

alimentado com glicerol puro e, depois disso, com glicerol bruto (fase F2). Inicialmente, foi operado com TDH, COV, pH afluente e pH efluente de $3,0 \pm 0,1$ dias, $7,2 \pm 0,2$ g gli.L⁻¹.d⁻¹, 7,5 e $6,5 \pm 0,3$, respectivamente.

O monitoramento dos parâmetros operacionais (vazão, TDH, COV) aplicados aos reatores R1 e R2, bem como a concentração de metabólitos e pH efluente, foram feitos diariamente. E, além disso, a montagem e toda a operação dos mesmos foram feitas em uma sala com temperatura controlada a 30 ± 2 °C. A Tabela 14 mostra um resumo das condições operacionais aplicadas. A solução de alimentação dos reatores teve a mesma composição nutricional utilizada nos testes em batelada e para formação dos biofilmes (Tabela 13). Para corrigir o pH dessa solução de alimentação, foi utilizado NaOH (50 %, solução estoque).

Tabela 14 - Fases e condições operacionais aplicadas aos reatores R1 e R2

Reator	Fase / Glicerol	Tempo de operação (d)	pH _{af}	TDH (d)	COV ^a (g gli.L ⁻¹ .d ⁻¹)
R1	F1 – Puro	0 - 95	7,5 - 10,0	3,0 - 2,0	6,0 - 11,5
R2	F1 – Puro	0 - 102	7,5 - 10,0	3,0 - 2,5	7,2 - 15,5
	F2 – Bruto	103 - 165	9,5	2,6	8,3 - 15,0

^aCOV = Carga orgânica volumétrica em termos de gramas de glicerol. **Fonte:** A autora (2019).

4.3.5 Métodos analíticos

A concentração de metabólitos foi determinada por HPLC (1200 Infinity Series, Agilent Technologies, Japão), com cromatógrafo equipado com detector de índice de refração (RID) e coluna MetaCarb 67H 300 x 6,5 mm (Agilent Technologies, Japão). As condições aplicadas para temperatura, fluxo da fase móvel (H₂SO₄, 0,01N) e volume de injeção foram 40 °C (coluna e detector RID), 0,65 mL.min⁻¹ e 20 µL, respectivamente. Aproximadamente 2 mL de amostras eram colocadas em eppendorfs e, em seguida, centrifugadas a 14.000 rpm por 10 min. Um fator de diluição igual a 10 foi empregado para todas as amostras analisadas.

O volume de biogás produzido (medido por deslocamento) foi muito baixo para os reatores. Por isso, a discussão dos resultados foi centrada no consumo de glicerol, produção de metabólitos e pH (Eletrométrico - 4500H⁺ B; APHA, 2012).

Os rendimentos dos produtos foram calculados e analisados em termos de mol de subproduto gerado por mol de glicerol consumido (mol.mol gli⁻¹), como mostrado na Equação 5. As taxas de produção volumétrica (produtividades) foram encontradas como descrito na Equação 6. Nestas equações, o TDH representa o tempo de retenção hidráulica e (Gli_{inicial} -

Gli_{final}), o consumo de glicerol. Durante a discussão, o consumo de glicerol será sempre mencionado como eficiência (em %). Além disso, os rendimentos e produtividades também foram calculados como valores médios para cada período operacional (com glicerol puro e bruto).

$$Rendimento (mol.mol gli^{-1}) = \frac{Taxa de produção do metabólito (mol.d^{-1})}{Gli_{inicial} - Gli_{final} (mol gli.d^{-1})} \quad Eq. 5$$

$$Produtividade (g.L^{-1}.d^{-1}) = \frac{Concentração do metabólito no efluente (g.L^{-1})}{TDH(d)} \quad Eq. 6$$

Já a distribuição dos produtos foi encontrada pela relação entre quantidade produzida de um determinado metabólito (g do subproduto por dia) e a quantidade total produzida (soma entre o total produzido por dia), como mostra a Equação 7.

$$\begin{aligned} Distribuição dos produtos (\%) & \quad Eq. 7 \\ &= \left(\frac{Concentração do metabólito no efluente (g.L^{-1}) \times vazão (L.d^{-1})}{\sum total produzido (g_{Total}.L^{-1}) \times vazão (L.d^{-1})} \right) \\ &\times 100 = \left(\frac{Taxa de produção do metabólito (g.d^{-1})}{Taxa de produção total (g_{Total}.d^{-1})} \right) \times 100 \end{aligned}$$

Para os cálculos do balanço de massa, o rendimento ($mol.mol-gli^{-1}$) de cada metabólito (C_i) foi multiplicado pelo valor da razão entre g DQO e mol de cada C_i , e em seguida, dividido pela mesma razão, porém referente ao glicerol (Equação 8). A subtração entre a quantidade inicial pela final (mol de glicerol_{inicial} – mol de glicerol_{final}) representa o consumo de glicerol (mol de glicerol consumido). No fim, os valores (g DQO produto. g DQO de glicerol consumido⁻¹) foram multiplicados por 100 (distribuição % DQO). A conversão para DQO foi feita conforme van Haandel e van der Lubbe (2011).

$$Distribuição (\% DQO) = \left[\frac{Rendimento \left(\frac{mol C_i}{mol glicerol consumido} \right) \times \left(\frac{g DQO C_i}{mol C_i} \right)}{\left(\frac{g DQO glicerol}{mol glicerol consumido} \right)} \right] \times 100 \quad Eq. 8$$

4.3.6 Ecologia microbiana

4.3.6.1 Extração de DNA, sequenciamento massivo por Illumina e análise filogenética

Apenas amostras do inóculo C2 e reator R2 no final da operação (F2) foram consideradas para caracterização da microbiota. Para R2, foram coletadas apenas amostras da biomassa fixa e em suspensão; armazenadas a -20 °C e nomeadas como mostra a Tabela 15.

Tabela 15 - Nomenclatura, descrição e dia de coleta das amostras para análises de biologia molecular

	Amostras	Descrição	Coleta (dia)
Inóculo	C2	Inóculo utilizado para formação de biofilme em espumas de poliuretano utilizadas no reator R2	--
R2 – Glicerol bruto	S _{F2}	Biomassa em suspensão e depositada obtida no final da F2	165
	A _{F2}	Biomassa aderida nas espumas de poliuretano durante o final da operação (F2)	165

Fonte: A autora (2019).

A extração e sequenciamento de DNA por Illumina assim como o tratamento das sequências e classificação taxonômica, foram feitas considerando os mesmos critérios e utilizando a mesma metodologia descrita durante a Seção 3. O sequenciamento de DNA por Illumina foi feito pelo Serviço de Sequenciamento e Bioinformática da FISABIO, em Valência (Espanha).

4.3.6.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia bem como a integridade estrutural e estimativa do crescimento microbiano ao longo da operação com o reator foi analisada por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para isso, foram escolhidas apenas amostras do inóculo C2 e da biomassa fixa nas espumas de poliuretano no final da operação de R2 (A_{F2}) (ver Tabela 15).

O preparo das amostras consistiu inicialmente em uma etapa de decantação para concentrar a biomassa. Depois disso, para preservar a estrutura celular, as amostras (em torno de 3 mL) foram fixadas com glutaraldeído (25 %, para microscopia) por 4 horas e mantidas em repouso. Após remover o excesso de glutaraldeído, sucessivas desidratações foram feitas com soluções de etanol (30, 70, 100 %), cada uma permanecendo em contato com as amostras

por 20 min (para ajudar a decantação do material sólido e a troca da solução de etanol por uma com maior concentração).

Nessa etapa, foi removido o máximo de volume possível com o auxílio de uma pipeta, evitando arrastar a biomassa. Depois disso, a nova solução de etanol (maior concentração) era adicionada. Esse procedimento se repetiu até utilizar o etanol 100 % (Sigma Aldrich®, especial para microscopia). Para evitar agrupamento ou até mesmo colapso celular, em nenhum momento centrifugação foi utilizada.

Em seguida, uma pequena quantidade de cada amostra foi colocada em suportes com fita de carbono. Após a evaporação total do etanol que nesse caso, foi deixado de um dia para o outro, as amostras foram revestidas com ouro e analisadas em um microscópio Phillips XL30 EDAX SX4i no Serviço de Pesquisa Interdepartamental (SIdI - UAM, Espanha).

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1 Glicerol bruto utilizado ao longo dos experimentos

O glicerol bruto utilizado nos experimentos passou previamente por uma separação das fases aquosa e orgânica, por acidificação. O teor de glicerol resultante foi igual a 66 % (m/m), com pH de 2,6 e densidade $1,088 \text{ g.cm}^{-3}$. As características do glicerol antes e depois da separação das fases estão apresentadas na Tabela 16.

Tabela 16 - Comparação entre o glicerol bruto antes e após separação das fases (acidificação)

	Glicerol bruto antes da acidificação	Glicerol bruto após acidificação
Teor de glicerol (% m/m)	57	66
pH	10,37	2,6
Densidade (g.cm^{-3})	0,998	1,088

Fonte: A autora (2019).

Antes de promover a acidificação e separação das fases, o pH encontrado foi próximo ao valor mencionado na literatura, em torno de 10. Esse pH alcalino está diretamente relacionado ao uso de bases residuais (NaOH, KOH, etc.) resultante da produção de biodiesel. Em alguns casos, o pH pode se apresentar bem abaixo desse valor (entre 6 e 7), mas geralmente isso acontece quando as plantas de biodiesel possuem etapas de pós-tratamento para remoção de alcalinidade (HU *et al.*, 2012). Além desse parâmetro, a densidade e o teor

de glicerol (antes e depois da separação), também se apresentaram dentro da faixa normalmente reportada para amostras de glicerol bruto, sendo entre 1 e 1,2 g.cm⁻³ e 20 – 80 % (em termos de massa), respectivamente (HU *et al.*, 2012; JUN *et al.*, 2010).

A necessidade de promover a separação das fases antes de utilizar o glicerol bruto como substrato se justifica pelas experiências anteriores do grupo de pesquisa da UAM. Por um tempo, utilizaram o glicerol bruto (sem tratamento algum) como substrato para culturas mistas e observaram uma diminuição da atividade microbiana. E isso acontecia em paralelo com a diminuição do consumo de glicerol e produção de metabólitos, principalmente 1,3-PDO.

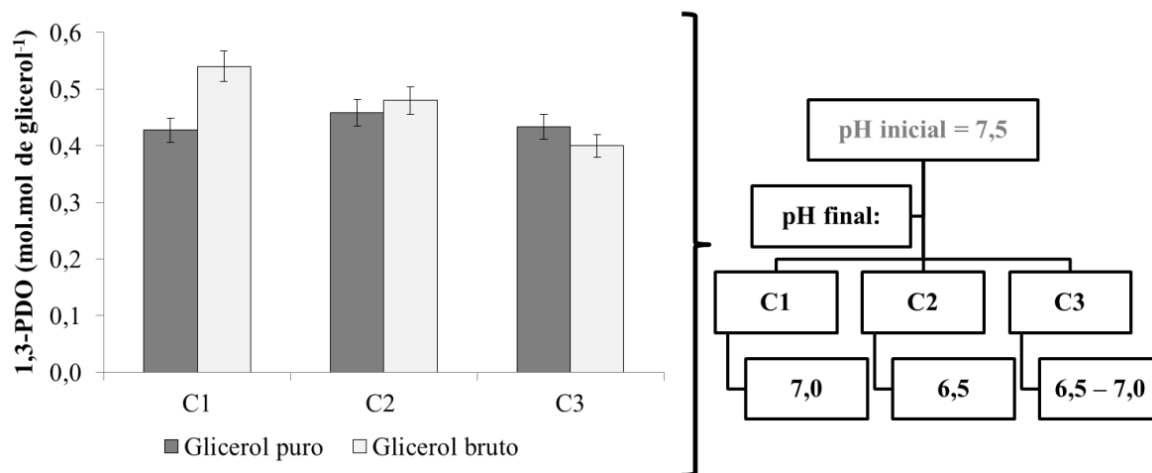
Além disso, foi verificado que parte da fase oleosa flotava, arrastando o lodo até a parte superior do reator, que por sua vez era também responsável por entupimentos frequentes das linhas de alimentação. Por isso, todas as atividades envolvendo o uso de glicerol bruto (descritas na presente seção e, também, na seção seguinte) foram feitas utilizando o glicerol bruto somente após a etapa de separação das fases.

4.4.2 Experimento 1: Desempenho dos inóculos testados em relação à produção de 1,3-PDO

Antes de iniciar os experimentos, o inóculo C1 já vinha sendo mantido ativo por meio de transferências para um meio fresco composto por glicerol bruto e nutrientes. As concentrações de 1,3-PDO produzido apresentavam valores entre 4 e 6 g.L⁻¹ (equivalentes a 6,7 e 10,1 g DQO.L⁻¹). Similarmente, C2 foi escolhido pelo bom desempenho em relação à produção de 1,3-PDO a partir de glicerol bruto. Deste modo, inicialmente a atividade dos inóculos C1, C2 e também, uma mistura entre eles (C3) foram analisadas. Os resultados obtidos em relação aos rendimentos de 1,3-PDO e pH (inicial e final) com os três inóculos usando glicerol puro e bruto estão apresentados na Figura 24.

Com glicerol puro, os resultados apresentaram praticamente o mesmo rendimento de 1,3-PDO, sendo ligeiramente maior para o inóculo C2 ($0,46 \pm 0,03$ mol.mol gli⁻¹). C1 apresentou um rendimento de $0,43 \pm 0,04$ mol.mol gli⁻¹, um pouco abaixo do que já vinha apresentando (próximo a 0,5 mol.mol gli⁻¹). Isto aconteceu provavelmente porque, desde que foi cultivado pela primeira vez, ele foi mantido sempre em solução contendo glicerol bruto. Por isso, devia estar adaptado aos demais componentes (impurezas) desse substrato. Já a mistura (C3), apresentou o mesmo rendimento que C1.

Figura 24 - Rendimento de 1,3-PDO e pH (inicial e final) para os inóculos em batelada usando glicerol puro e bruto



Fonte: A autora (2019).

Em contrapartida, usando glicerol bruto, o inóculo C1 apresentou o maior rendimento para o 1,3-PDO, de $0,54 \pm 0,05 \text{ mol.mol gli}^{-1}$. Isso pode comprovar o que foi mencionado anteriormente, de que C1 estaria adaptado ao consumo do glicerol bruto utilizado juntamente com os demais compostos que fazem parte de sua constituição. O rendimento de 1,3-PDO apresentado por C2 foi praticamente igual ao obtido com glicerol puro ($0,48 \pm 0,02$ em relação a $0,46 \pm 0,03 \text{ mol.mol gli}^{-1}$). A mistura entre eles (C3), apresentou valores mais baixos do que C1 e C2 com glicerol bruto ($0,40 \pm 0,02 \text{ mol.mol gli}^{-1}$).

Considerando o uso de culturas microbianas mistas, valores próximos a $0,5 \text{ mol.mol gli}^{-1}$ para a produção de 1,3-PDO, já podem ser considerados interessantes. Como o rendimento teórico é $0,72 \text{ mol de 1,3-PDO.mol gli}^{-1}$ (ZENG, 1996), a eficiência obtida foi próxima a 70 %. Apesar dos elevados rendimentos reportados usando cultura pura (ver Tabela 3, Seção 2.3.1), em alguns estudos os valores foram inferiores aos obtidos aqui com culturas mistas. Em batelada e glicerol puro, Drozdzyńska *et al.* (2014), com *Hafnia alvei* obtiveram um rendimento entre 0,2 e 0,3 mol.mol gli^{-1} ; já Przystalowska *et al.* (2015), com uma cultura pura de *Escherichia coli* contendo genes modificados de *Citrobacter freundii* (ATCC 8090) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700721), obtiveram um rendimento em torno de 0,4 mol.mol gli^{-1} .

Entre os demais metabólitos produzidos para C1, C2 e C3 estão lactato, formiato, acetato, propionato e butirato, sendo o rendimento total entre 0,2 e 0,3 mol.mol gli^{-1} , com maiores valores para C2. Desses carboxilatos, o acetato foi produzido em maior quantidade, apresentando conformidade com a literatura com foco na produção de 1,3-PDO a partir de

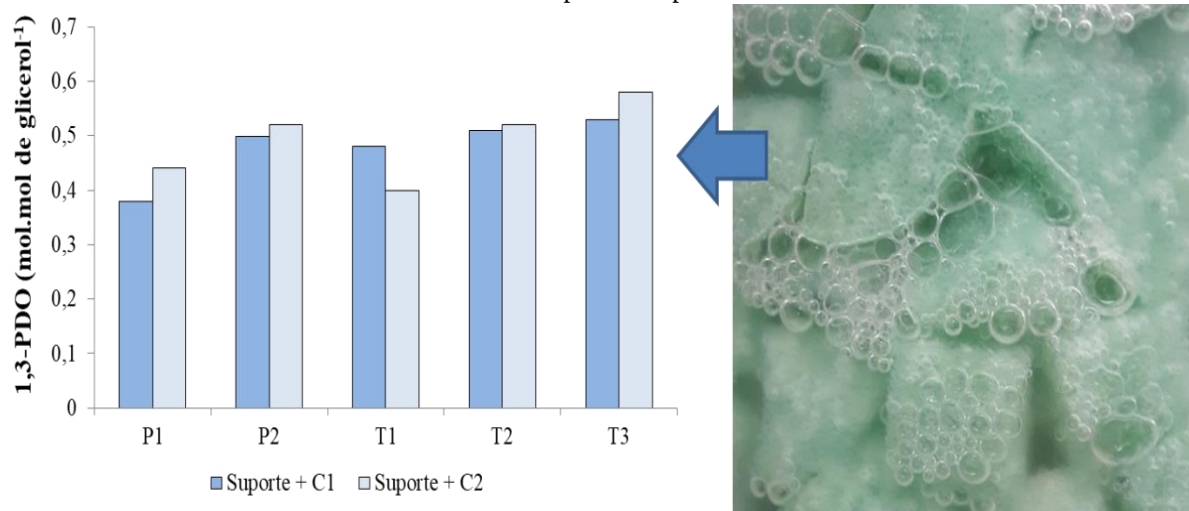
glicerol (SAXENA *et al.*, 2009; ZENG, 1996). Os três cultivos também produziram etanol com rendimentos entre 0,1 e 0,2 mol.mol gli⁻¹, sendo os inóculos C1 e C3 responsáveis pelos maiores rendimentos.

O pH inicial de 7,5 foi praticamente mantido nos testes com C1 e C3. Já para C2, o valor foi ligeiramente menor (6,5), estando associado à maior quantidade de ácidos formados (acético e propiônico). Dessa forma, como C3 não apresentou maiores valores comparados a C1 e C2, os demais experimentos para formação de biofilme foram feitos apenas com estes dois (melhores resultados).

4.4.3 Experimento 2: Formação de biofilme e rendimento de 1,3-propanodiol

Os resultados obtidos para o rendimento de 1,3-PDO durante as duas transferências (troca de solução com adição de C1 e C2) e as três trocas de solução seguintes (sem inóculo) estão apresentados na Figura 25. Durante a segunda transferência (P2, Figura 25), foram obtidos maiores valores para o rendimento de 1,3-PDO, comparados ao primeiro contato suporte-inóculo, ambos próximo a 0,5 mol.mol gli⁻¹.

Figura 25 - Rendimento de 1,3-PDO durante as etapas para formação e comprovação de biofilme pelos inóculos C1 e C2 nas espumas de poliuretano



Sendo o número de transferências (passes) representado por P1 e P2 e o número de trocas de solução (sem inóculo) representado por T1, T2 e T3. **Fonte:** A autora (2019).

Já durante a primeira troca de solução, o rendimento de 1,3-PDO do inóculo C1 diminuiu levemente (0,48 mol.mol gli⁻¹), enquanto que a do C2 foi ainda menor (0,40 mol.mol gli⁻¹). É provável que as duas transferências iniciais de C2 não tenham sido suficientes para fixar uma boa quantidade de micro-organismos. Por isso, esses valores foram

aumentando com as demais trocas, atingindo um rendimento próximo a $0,6 \text{ mol.mol gli}^{-1}$, indicando maior facilidade de crescimento da biomassa aderida ao material suporte comparado a C1.

No final dos experimentos, tanto para C1 como C2 foi possível notar a produção de biogás nos poros do material suporte, também confirmando atividade de micro-organismos distribuídos pelo interior dos mesmos (Figura 25). Com relação aos ácidos e etanol formados, os resultados foram semelhantes aos obtidos e descritos também durante os testes em batelada para C1 e C2. E, talvez por isso, os valores de pH efluente medido no final de cada passe/troca se mantiveram próximos a 7 para C1 e 6,5 para C2 (iguais aos obtidos em batelada para cada cultivo, Seção 4.4.2).

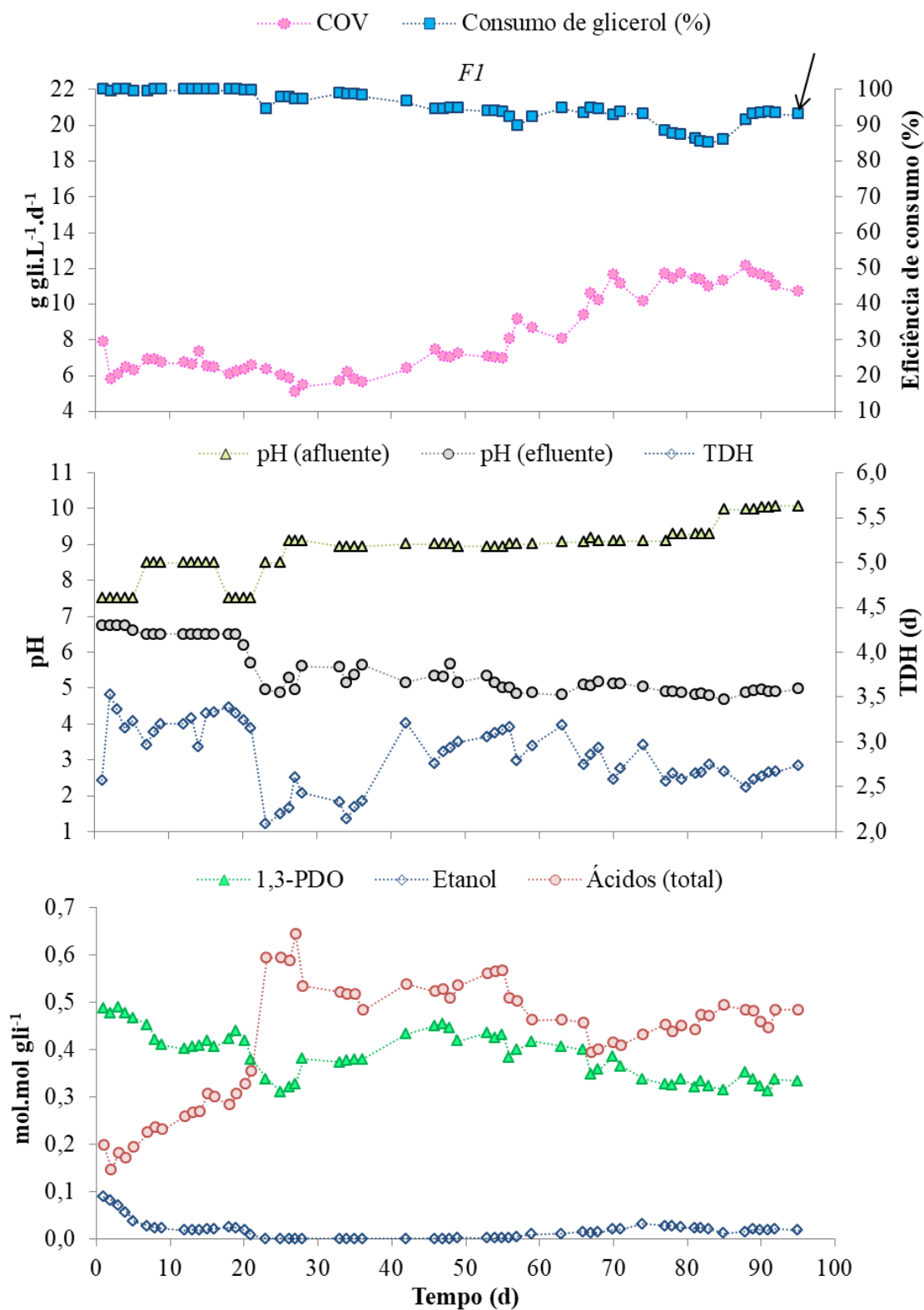
4.4.4 Experimento 3: Desempenho dos reatores UASB + biofilmes

As condições operacionais aplicadas a R1 e R2, bem como os rendimentos para 1,3-PDO, etanol e ácidos totais, estão apresentados nas Figuras 26 e 27. No APÊNDICE B, estão apresentadas as tabelas com os resumos das principais alterações realizadas (carga, TDH, pH) e os valores médios do consumo de glicerol e rendimento de 1,3-PDO referente a cada período operacional (com glicerol puro e bruto) incluindo os intervalos de tempo em que cada alteração foi mantida.

Para evitar ao máximo o contato com o oxigênio durante a montagem dos reatores (R1 e R2), todo o conteúdo dos frascos (700 mL de volume útil de cada) contendo os suportes de poliuretano com os micro-organismos aderidos e o efluente, foi utilizado para preenchê-los. A montagem dos reatores foi feita exatamente após o final da terceira troca de solução (descrito no experimento anterior, Seção 4.4.3). Então o efluente contido nos frascos foi o mesmo. Por isso, para os pontos iniciais apresentados nas Figuras 26 e 27, foram considerados os resultados obtidos após completar o TDH definido inicialmente para cada reator.

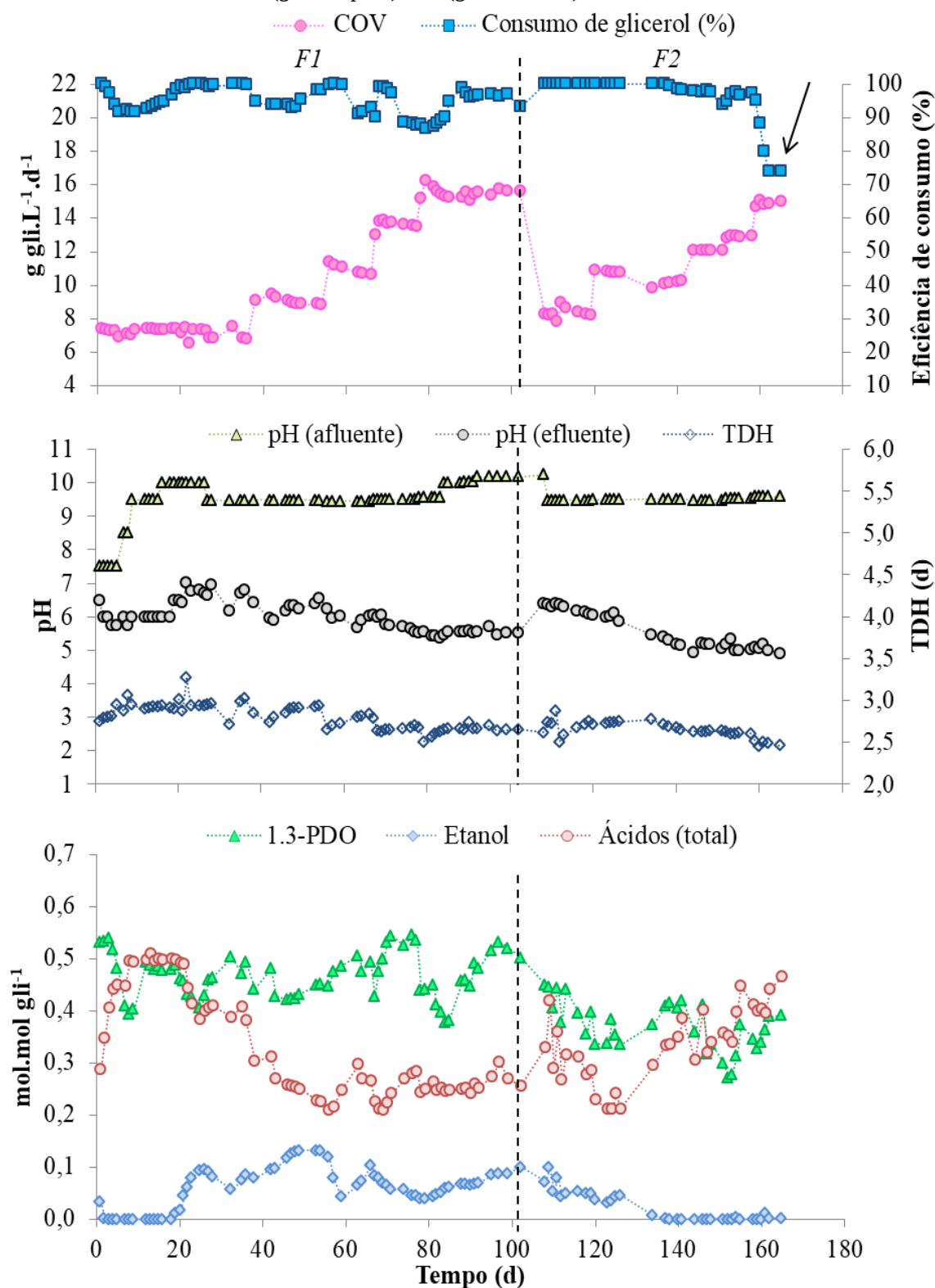
Os reatores R1 e R2, diferentemente do comportamento apresentado pelos inóculos C1 e C2 em batelada, logo no início da operação apresentaram um aumento na produção de ácidos. R1 se caracterizou pela elevada produção de ácidos, principalmente acetato e butirato. A diminuição do TDH (dia 23 a 36) de 3,3 para 2,3 dias parece ter contribuído ainda mais para o aumento desses compostos (de 0,32 para 0,55, com valor máximo de 0,64 mol de ácidos totais.mol gli⁻¹ entre os dias 20 e 30).

Figura 26 - Parâmetros operacionais e rendimentos de subprodutos (mol.mol gli^{-1}) durante a operação em fase única (F1, glicerol puro) do reator R1



Fonte: A autora (2019).

Figura 27 - Parâmetros operacionais e rendimentos de subprodutos (mol.mol gli^{-1}) durante a as fases F1 (glicerol puro) e F2 (glicerol bruto) do reator R2



Nota: A seta no final da operação indica o dia em que amostra final de lodo foi coletada para análise de biologia molecular. A linha pontilhada indica a troca de glicerol puro para glicerol bruto. **Fonte:** A autora (2019).

Ainda com relação a R1, mesmo usando o pH afluente entre 9 e 10, nenhum efeito positivo foi observado em relação à produção de 1,3-PDO. A partir do 20º dia, a produção de ácidos passou a ser maior do que a de 1,3-PDO, se mantendo assim até o final da operação. Em virtude disso, o maior rendimento de 1,3-PDO obtido com R1 foi 0,44 mol.mol gli⁻¹ (entre os dias 42 e 55). Por causa da maior produção de ácidos, a operação com R1 durou apenas 95 dias e foi decidido não utilizar glicerol bruto. A Tabela 17 reúne os parâmetros operacionais aplicados e os principais resultados obtidos em cada fase dos reatores. Nela, estão apresentados os períodos em que foram obtidos os maiores rendimentos médios de 1,3-PDO para cada reator.

Tabela 17 - Resumo das condições aplicadas e melhores resultados obtidos com R1 (biofilme com inóculo C1) e R2 (biofilme com inóculo C2) nas fases operacionais F1 (glicerol puro) e F2 (glicerol bruto)

Reator (fase)	Condições empregadas					Principais resultados		
	Tempo de operação (d)	COV (g gli.L ⁻¹ .d ⁻¹)	TDH (d)	pH _(af)	pH _(ef)	1,3-PDO (mol.mol gli ⁻¹)	Consumo de glicerol (%)	Ácidos _(Total) (mol.mol gli ⁻¹)
R1 (F1)*	42 - 55	7,0±0,3	3,0±0,1	9,0	5,3±0,2	0,44±0,01	94,40±0,94	0,54±0,02
R2 (F1)	67 - 77	13,6±0,3	2,7±0,1	9,5	5,8±0,2	0,51±0,04	93,41±5,35	0,24±0,03
R2 (F2)	103 - 119	8,3±0,3	2,7±0,1	9,5	6,2±0,1	0,41±0,03	99,97±0,02	0,26±0,05

*R1 foi operado apenas com glicerol puro (F1). **Fonte:** A autora (2019).

Em contrapartida, no reator R2, a produção de ácidos (~0,5 mol.mol gli⁻¹ a partir do 8º dia, Figura 27), pareceu ter sido desfavorecida com o aumento do pH afluente (adição de NaOH). Por isso, o pH afluente foi mantido próximo a 9,5 durante maior parte da operação. Diferentemente de R1, durante a F1 do reator R2, foram obtidos maiores valores para o rendimento de 1,3-PDO ao longo da operação. Como mostra a Tabela 17, usando glicerol puro, os maiores rendimentos foram verificados entre os dias 67 e 77, sendo o valor médio igual a 0,51 mol.mol gli⁻¹, valor satisfatório e em conformidade com alguns poucos trabalhos disponíveis envolvendo culturas mistas e sistemas contínuos com glicerol puro (GALLARDO *et al.* 2014; NAKAZAWA *et al.*, 2017) (ver Tabela 3, Seção 2.3.1).

Ao trocar o glicerol puro por glicerol bruto, logo no início da F2 foi observada uma diminuição na produção de 1,3-PDO e aumento na de ácidos. A partir do dia 130, a produção de etanol diminuiu e, provavelmente, estava relacionada ao significativo aumento de ácidos. Nesse caso, o uso do glicerol bruto provavelmente influenciou o sentido das reações, direcionando a conversão do acetil-CoA para produção de mais acetato e butirato (ver Figura 8, Seção 2). Ainda durante o final da operação, mesmo diminuindo mais um pouco o TDH em

0,3 d (~7,2 h a menos), nenhum efeito foi verificado na produção de ácidos, que seguiu aumentando até o final da operação em R2.

Em geral, a cada alteração na carga aplicada, o rendimento de 1,3-PDO diminuía durante a F2 no reator R2. Dessa maneira, o rendimento médio máximo de 1,3-PDO ($0,41 \text{ mol.mol gli}^{-1}$) foi obtido durante os 16 primeiros dias da operação com glicerol bruto em pH efluente próximo a 6. Ao aumentar a carga para valores próximos a $15 \text{ g gli.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, o consumo de glicerol caiu significativamente (de 95 para 74 %), marcando o final da operação.

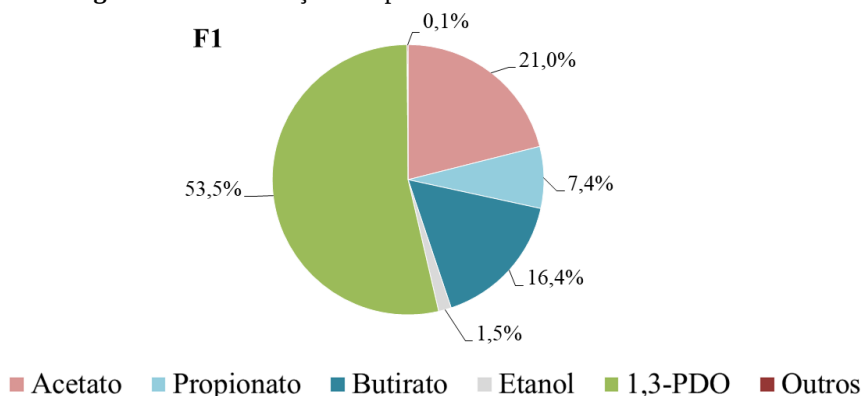
Com relação à taxa de produção volumétrica de 1,3-PDO, R1 apresentou menor valor ($2,42 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, F1) comparado aos resultados de R2 tanto com glicerol puro ($3,83 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, F1) como bruto ($3,19 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, F2). A Tabela 18 mostra a produtividade média dos metabólitos em cada fase operacional dos dois reatores. A partir destes resultados, em R1 durante toda a operação (95 dias) a produtividade dos ácidos produzidos ($2,14 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) foi muito próxima à de 1,3-PDO, reforçando seu potencial para produzir ácidos em comparação com R2.

Tabela 18 - Produtividade volumétrica média dos metabólitos em cada fase operacional dos reatores R1 e R2

Reator	Fase	Produtividade ($\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$)								1,3-PDO	Ácidos (total)
		Formiato	Acetato	Propionato	Etanol	Butirato	Lactato	Valerato	Caproato		
R1	F1	<0,005	1,00	0,29	0,07	0,84	n.d.	n.d.	n.d.	2,42	2,14
R2	F1	0,19	0,80	0,19	0,31	0,69	0,06	0,01	0,10	3,83	2,05
	F2	0,15	1,24	0,02	0,10	0,69	<0,002	0,11	0,04	3,19	2,26

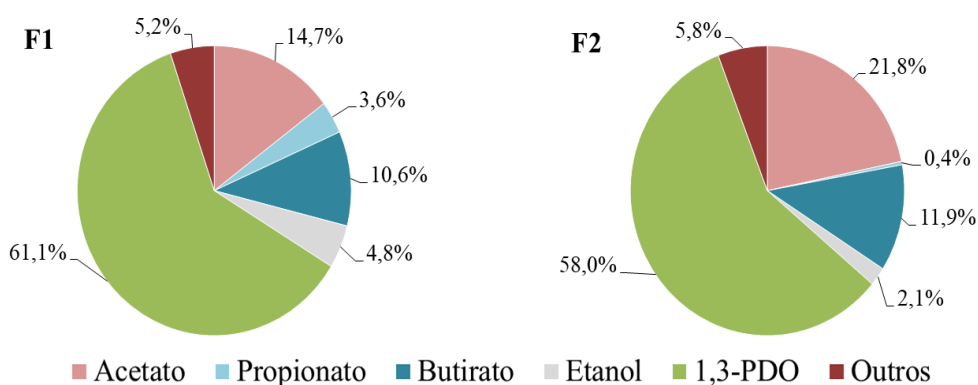
Onde F1 e F2 representam as fases operacionais com glicerol puro e bruto, respectivamente; e n.d., não detectado. **Fonte:** A autora (2019).

Como o objetivo era determinar as condições que resultaram em um melhor desempenho dos sistemas reator-biofilme (R1 e R2) em termos de rendimento e produtividade de 1,3-PDO, a distribuição dos produtos foi feita considerando o total de metabólitos identificados em termos de g de produto por g de produtos totais produzidos (Figuras 28 e 29). O percentual de 1,3-PDO produzido por R2 nas fases F1 e F2, estavam em conformidade aos valores reportados por Varrone *et al.* (2017), entre 60 e 64 %, com lodo anaeróbio e meio nutricional mínimo. Outro ponto observado foi que durante a fase F2 (com glicerol bruto), também, do reator R2, ficou comprovado que o aumento de ácidos produzidos foi marcado principalmente pela presença de acetato.

Figura 28 - Distribuição dos produtos durante a fase F1 do reator R1

Onde: Formiato está representado como “Outros”.

Fonte: A autora (2019).

Figura 29 - Distribuição dos produtos durante as fases F1 e F2 do reator R2

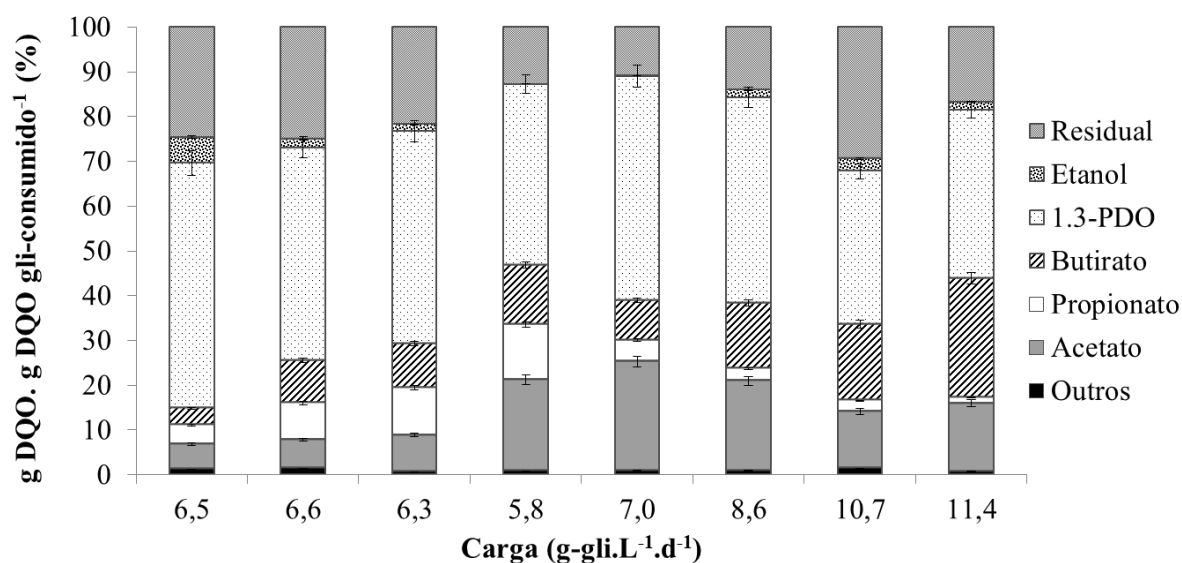
Onde: A soma entre formiato, lactato, valerato e caproato, está representada como “Outros”.

Fonte: A autora (2019).

No entanto, como complemento ao exposto, para cada reator, foi feita uma estimativa do balanço de massa total em % DQO (considerando g DQO de produto por g DQO de glicerol consumido, ver detalhes na Seção 4.3.5) considerando esses metabólitos identificados; biomassa, biogás e metabólitos não identificados, sendo estes três últimos considerados como “residual” (Figura 30 e 31).

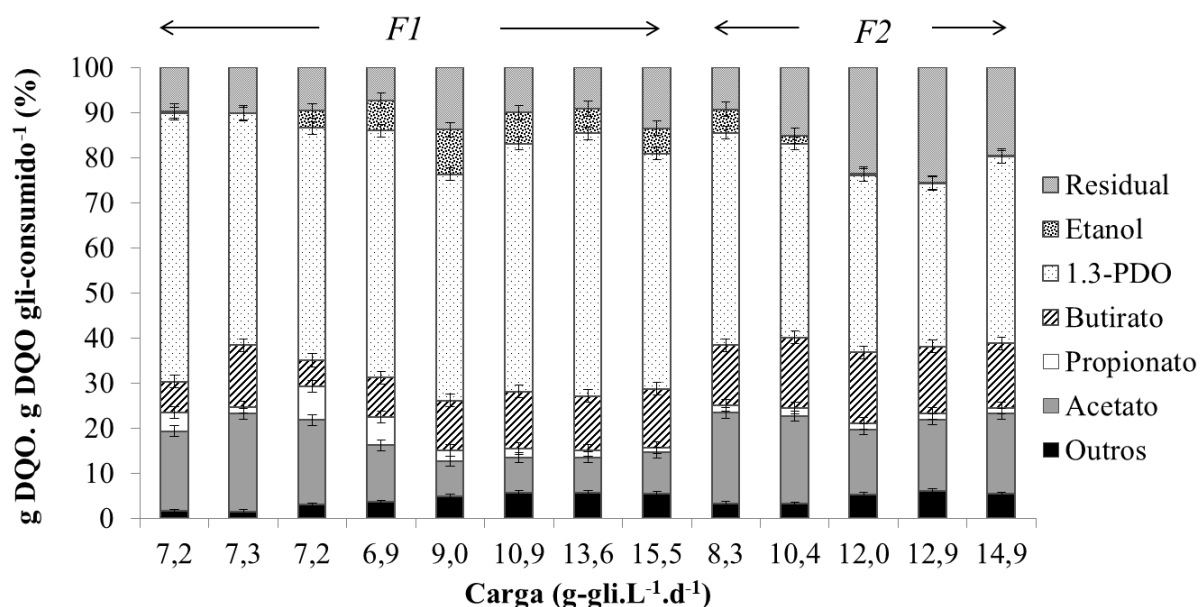
Nas Figuras 30 e 31, o eixo X apresenta os valores das cargas aplicadas ($\text{g glicerol.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) porque foi o parâmetro com mais alterações durante a operação dos reatores. As fases F1 (glicerol puro) e F2 (glicerol bruto) também estão indicadas nas figuras. No entanto, é importante ressaltar que inicialmente os reatores foram operados com a mesma carga e TDH, mas com alterações no pH afluente e, por isso, alguns valores do eixo X são iguais ou bastante próximos. Diante disso, as Tabelas B1 e B2 contidas no APÊNDICE B, auxiliam a compreensão das figuras.

Figura 30 - Estimativa do balanço de massa para R1 durante toda a operação com glicerol puro em função da carga de glicerol aplicada



Nota: Formiato e lactato foram incluídos como “outros”. Biogás, biomassa e metabólitos não identificados estão representados como “residual”. **Fonte:** A autora (2019).

Figura 31 - Estimativa do balanço de massa para R2 durante toda a operação com glicerol puro (F1) e bruto (F2) em função da carga de glicerol aplicada



Nota: Formiato, lactato, valerato e caproato foram incluídos como “outros”. Biogás, biomassa e metabólitos não identificados estão representados como “residual”. **Fonte:** A autora (2019).

Pela Figura 30 é possível verificar que em geral, os metabólitos identificados representam aproximadamente 80 % da DQO total. Pelas análises de HPLC para determinação dos metabólitos, foi verificada a existências de picos não identificados, mas que

se apresentavam com áreas muito baixas. Já com o reator R2 (Figura 31), pode-se dizer que durante toda a F1 todos os metabólitos foram identificados. Contudo, durante o uso de glicerol bruto, picos desconhecidos (1 ou 2 picos) foram identificados no cromatograma, embora também com áreas baixas. Portanto, erros analíticos podem ter influenciado fortemente os resultados apresentados.

Deste modo, considerando que o rendimento teórico máximo é $0,72 \text{ mol.mol gli}^{-1}$ (ZENG, 1996), pode-se dizer que os resultados de R2 na F1 ($0,51 \text{ mol.mol gli}^{-1}$), com culturas mistas foram satisfatórios. Além disso, os reatores foram operados com meio nutricional mínimo o que está relacionado a menores custos com insumos, caso seja aplicado em larga escala. Até mesmo o R1, com menor desempenho em relação à 1,3-PDO ($0,44 \text{ mol.mol gli}^{-1}$, dia 42 ao 55) e R2 com glicerol bruto ($0,41 \text{ mol.mol gli}^{-1}$), apresentaram resultados bastante próximos a alguns também utilizando culturas mistas ($0,43 \text{ mol.mol gli}^{-1}$, NAKAZAWA *et al.*, 2017) e outros, com cultura puras de *Lactobacillus reuteri* (DSM 20016) (RICCI *et al.*, 2015), *Hafnia alvei* (AD 27) e *Klebsiella pneumoniae* (JP 217) (DROZDZYŃSKA *et al.*, 2014) (ver Tabela 3, Seção 2).

4.4.5 Análise da diversidade e morfologia dos micro-organismos

4.4.5.1 Comunidade microbiana

Apesar dos bons rendimentos de 1,3-PDO obtidos com R2 usando glicerol puro ($0,51 \text{ mol.mol gli}^{-1}$, F1), apenas amostras no final da operação (F2) foram tomadas para caracterização microbiológica. Isso aconteceu porque seria necessário abrir o reator para coletar as amostras, o que poderia comprometer o funcionamento do sistema pelo contato com oxigênio. Além disso, como R1 não apresentou resultados relevantes em relação a produção desse composto, foi considerado que não valia a pena despende tempo e recursos para analisar a diversidade e morfologia da microbiota.

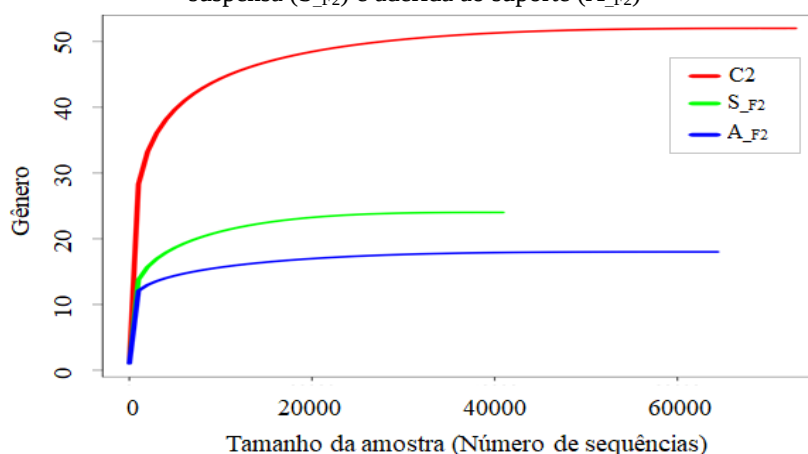
O sistema Illumina MySeq forneceu 105.185, 43.962 e 71.035 leituras para as amostras do inóculo (C2), biomassa em suspensão (S_{F2}) e biomassa aderida ao suporte (A_{F2}), respectivamente. As sequências de alta qualidade consideradas para análise dos dados, os comprimentos médios e os índices de cobertura, riqueza e equitatividade (define a uniformidade da distribuição de abundância de espécies em uma comunidade), estão resumidos na Tabela 19.

Tabela 19 - Índices de cobertura, diversidade e uniformidade para as amostras do reator R2

	C2	S _{F2}	A _{F2}
Total de leituras (sequências)	105185	43962	71035
Leituras de alta qualidade	73206	41089	64830
Comprimento médio	442	445	446
S _{obs}	454	294	553
Chao1	1057±232	1562±669	1793±411
Simpson	0,16±0,001	0,26±0,003	0,12±0,001
Shannon (H)	2,52±0,012	1,99±0,015	2,60±0,01
Shannon even (E _H)	0,4126	0,3507	0,4123
Gini	0,9214	0,9576	0,9470
Cobertura de <i>Good</i>	99 %	99 %	99 %

Fonte: A autora (2019).

A cobertura das espécies observadas, considerando o estimador de cobertura de *Good*, mostrou que um censo próximo ao total foi alcançado em relação às três amostras (99 %). As curvas de rarefação (Figura 32) se apresentaram como assíntotas, indicando que o número de micro-organismos identificados pelo sequenciamento representam todos os presentes nas amostras. Ou seja, mesmo aumentando o número de sequências (eixo x), o número de OTUs/espécies não aumentaria (eixo y). Diante disso, não foi necessário nenhum esforço adicional para o tratamento das sequências.

Figura 32 - Curvas de rarefação das amostras do inóculo (C2) e biomassas suspensa (S_{F2}) e aderida ao suporte (A_{F2})

Fonte: A autora (2019).

A Figura 33 mostra os perfis taxonômicos em nível de filo (33a), ordem (33b), família (33c) e gênero (33d). Um total de sete filos foi detectado, mas a cobertura total de três deles (*Acidobacteria*, *Cladiserica* e *Chloroflexi*) foi insignificante (menos de 0,008% do total de

sequências atribuídas confiavelmente). Outro filo, *Actinobacteria*, foi notável somente no inóculo (10,6 %; menos de 0,1 % no reator). Assim, apenas *Firmicutes*, *Proteobacteria* e *Bacteroidetes* cobriram a maioria das sequências totais classificadas em nível de filo (Figura 33a). Apesar dos filios abundantes serem os mesmos, a estrutura da comunidade microbiana mudou do inóculo em relação às amostras do reator.

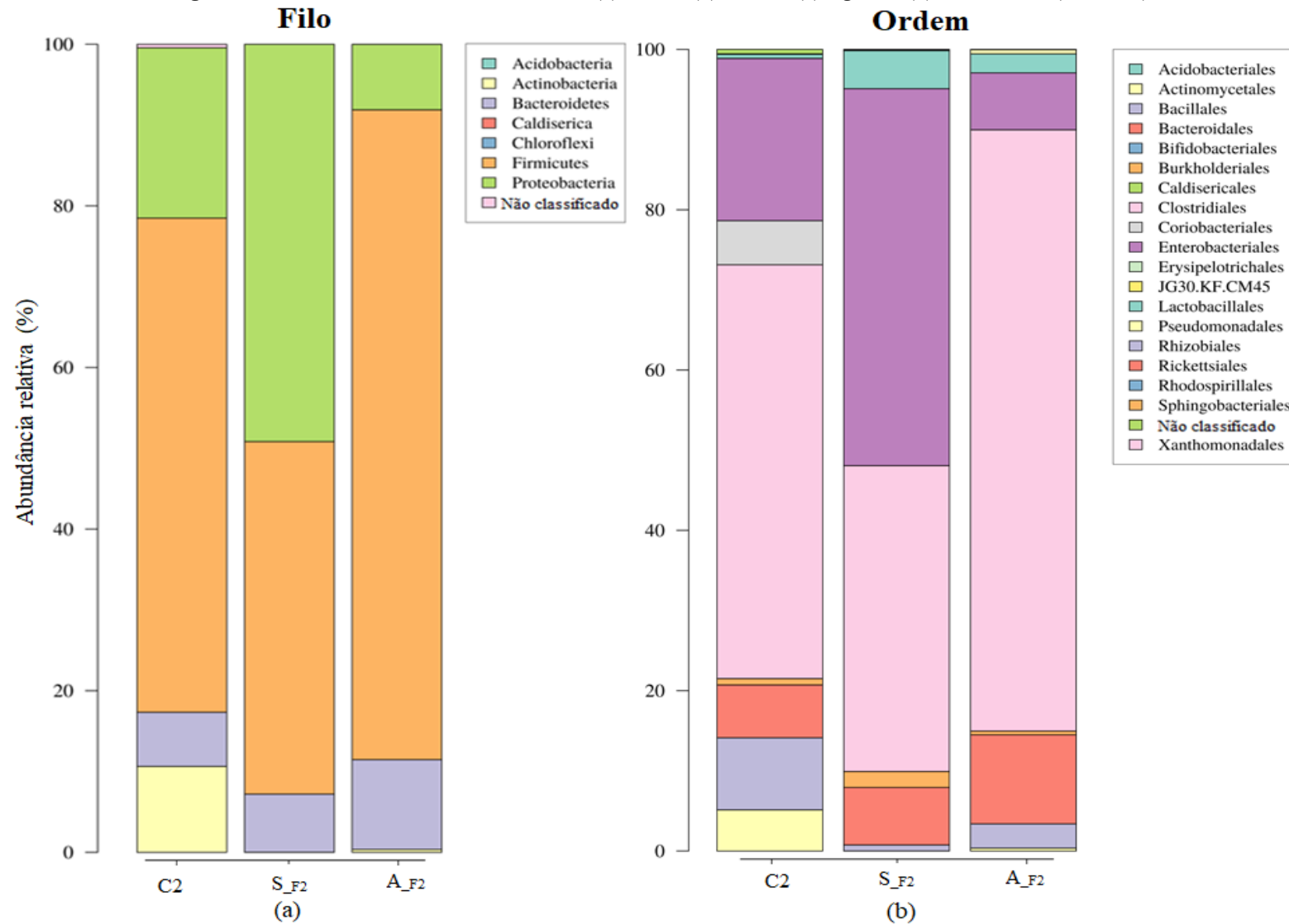
No inóculo (C2), houve predominância da ordem *Clostridiales*, seguido de *Enterobacteriales* e, com menor cobertura, *Bacillales*, *Bacteroidales* e *Coriobacteriales*. Já na biomassa suspensa (S_F2) *Clostridiales* e *Enterobacteriales* se mostraram como co-dominantes. A biomassa aderida ao suporte (A_F2), ao contrário da suspensa (S_F2), apresentou dominância da ordem *Clostridiales* com uma drástica diminuição de *Enterobacteriales*.

A maioria das leituras presentes no inóculo pode ser afiliada a famílias dentro do filo *Firmicutes*, ou seja, *Clostridiaceae*, Família *XI_Incertae Sedis*, *Ruminococcaceae*, *Veillonellaceae* (ordem *Clostridiales*, Figura 33b) e *Planococcaceae* (ordem *Bacillales*), que representam 58 % do total de leituras confiavelmente atribuídas a nível familiar. As famílias *Enterobacteriaceae* (*Proteobacteria*), *Porphyromonadaceae* (*Bacteroidetes*) e *Coriobacteriaceae* (*Actinobacteria*) também estavam presentes (Figura 33c).

Membros de todas essas famílias citadas são anaeróbios fermentativos. Uma mudança drástica ocorreu após 100 dias de operação do reator. Os membros dentro das famílias *Coriobacteriaceae* (basicamente o gênero *Eggerthella*), Família *XI_Incertae Sedis* (composta principalmente pelo gênero *Sporanaerobacter*), *Planococaceae* (composto principalmente pelo gênero *Kurthia*) e *Porphyromonadaceae* (gênero *Proteiniphilum* e outras leituras não classificadas) provavelmente não se adaptaram às condições aplicadas ao reator e, por isso, desapareceram ou se tornaram muito minoritárias. Vale lembrar que o inóculo vem de um filtro anaeróbio com a biomassa aderida a um suporte de PVC (conduítes corrugados).

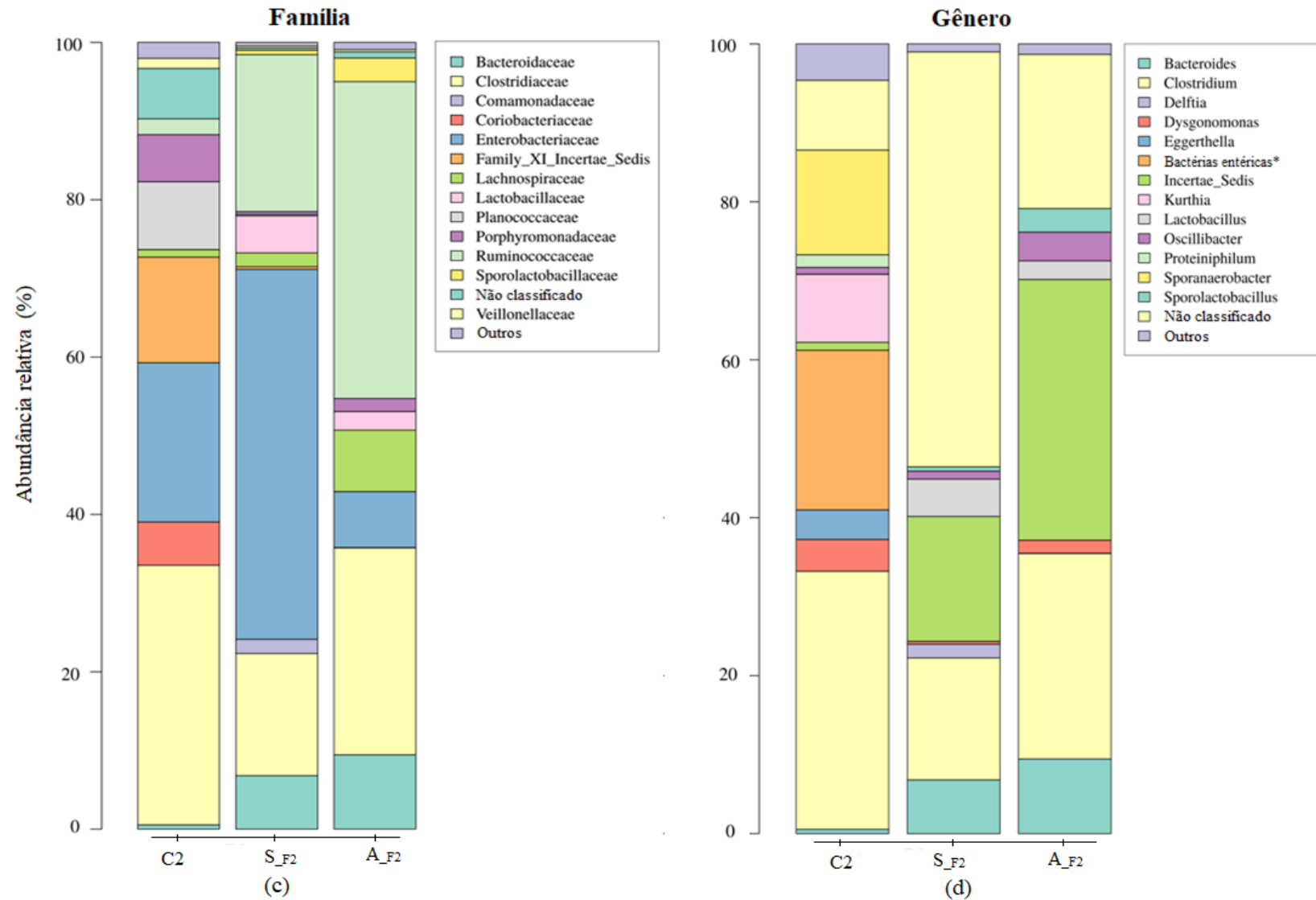
A biomassa suspensa no reator foi dominada pela família *Enterobacteriaceae* (47 %). Infelizmente, a maioria das sequências afiliadas a essa família não pode ser confiavelmente atribuída no nível do gênero. Em qualquer caso, várias espécies dentro da família *Enterobacteriaceae* estão envolvidas na formação de 1,3-PDO através da fermentação de glicerol, como *Klebsiella pneumoniae* (DROZDZYŃSKA *et al.*, 2014; LEE *et al.*, 2018; SAXENA *et al.*, 2009), *Escherichia coli* (PRZYSTAŁOWSKA *et al.*, 2015), *Hafnia alvei* e *Citrobacter freundii* (DROZDZYŃSKA *et al.*, 2014).

Figura 33 - Perfis taxonômicos no nível de filo (a), ordem (b), família (c) e gênero (d) do reator R2 (Continua)



Nota: Onde C2 representa o inóculo, S_F2 biomassa suspensa e A_F2 biomassa aderida ao suporte, sendo estas duas, coletadas no final da fase F2. **Fonte:** A autora (2019).

Figura 33 - Perfis taxonômicos no nível de filo (a), ordem (b), família (c) e gênero (d) do reator R2 (Continuação)



Nota: Onde C2 representa o inóculo, S_F2 biomassa suspensa e A_F2 biomassa aderida ao suporte, sendo estas duas, coletadas no final da fase F2. **Fonte:** A autora (2019).

Todas as sequências filiadas à família *Lactobacillaceae*, também fermentadores de glicerol, foram atribuídas ao gênero *Lactobacillus*, que por sua vez, cresceram até 4,7 % nas leituras da amostra de biomassa suspensa. Tem sido relatado que espécies pertencentes a este gênero como *Lactobacillus brevis* (VIVEK; PANDEY; BINOD, 2016a), *L. reuteri* (RICCI *et al.*, 2015), *L. buchneri*, *L. diolivorans* e *L. panis* (SUN *et al.*, 2018), são bons produtores de 1,3-PDO a partir do glicerol.

As famílias *Ruminococcaceae* e *Bacteroidaceae* (composta principalmente pelo gênero *Bacteroides*) também aumentaram acentuadamente a partir do inóculo. Os membros dessas duas famílias são bem conhecidos por serem anaeróbios estritos e fermentadores de açúcar e/ ou proteínas; embora seus papéis como produtores de 1,3-PDO do glicerol não tenham sido relatados. No entanto, foi reportado que membros da ordem *Bacteroidales* dominaram digestores alimentados com resíduos ricos em glicerol para produção de biogás (FERGUSON; COULON; VILLA, 2018); *Ercella succinigenes*, da família *Ruminococcaceae*, é capaz de fermentar o glicerol (VAN GELER *et al.*, 2014); e *Ruminococcus* spp. foram identificados como consumidores de glicerol (ENGELS *et al.*, 2016).

Em relação à biomassa aderida, a informação mais relevante foi a diminuição drástica da família *Enterobacteriaceae* (até 7,1 %) e o aumento concomitante da família *Ruminococcaceae* (até 40 %) (Figura 33c). Infelizmente, a maioria das leituras não pode ser atribuída no nível do gênero (Figura 33d). Em qualquer caso, o número de sequências incluídas nas famílias *Enterobacteriaceae*, *Clostridiaceae* e *Lactobacillaceae*, que incluem os gêneros descritos como produtores de 1,3-PDO a partir de glicerol foram de 67 % na biomassa em suspensão versus 35 % da biomassa aderida ao suporte de poliuretano. É legítimo supor que a maior parte do 1,3-PDO gerado no reator possa ser atribuída à biomassa suspensa, onde apenas o gênero *Clostridium* se destaca (15 %) como produtor de 1,3-PDO.

4.4.5.2 Morfologia

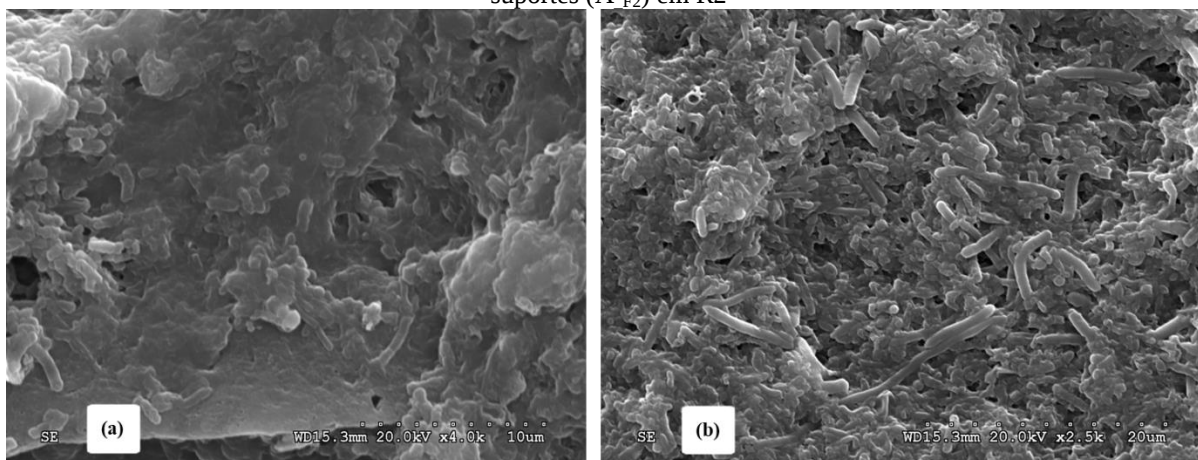
A análise da morfologia foi feita no inóculo C2 e na amostra final de R2 apenas da biomassa aderida ao suporte (A_{F2}) para avaliar o crescimento microbiano bem como a integridade celular da microbiota aderida ao suporte de poliuretano ao longo da operação.

Imagens de MEV de C2 e A_{F2} estão apresentadas na Figura 34a e 34b, respectivamente. A partir destas, foi possível notar o crescimento microbiano ao longo da

operação do reator pela comparação entre a biomassa inicial e final. Além disso, houve predominância de micro-organismos em forma de bastonetes, em concordância com a morfologia de membros dos gêneros *Clostridium*, *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Dysgonomonas* (bacilos ou também, cocobacilos), *Delftia*, entre outros apresentados na seção anterior (Figura 33d).

A biomassa aderida ao suporte de poliuretano mostrou uma boa integridade da estrutura celular durante a operação Figura 34b. Já pela Figura 34a, foi possível observar um menor número de células e com menor nitidez. A baixa quantidade de biomassa disponível no inóculo e a impossibilidade de concentrá-las foram responsáveis pela dificuldade relacionada à preparação e análise da amostra. Vale ressaltar que durante a preparação das amostras, após adição de glutaraldeído, há uma etapa para deposição da biomassa, seguida de trocas sucessivas de soluções de etanol (diferentes concentrações), também com etapas de decantação, pelas quais há perda de material celular.

Figura 34 - Morfologia de micro-organismos a partir de amostras de (a) inóculo (C2) e (b) biomassa fixa nos suportes (A_{F2}) em R2



Nota: As escalas utilizadas foram 10 e 20 μm para (a) e (b), respectivamente. **Fonte:** A autora (2019).

4.5 CONCLUSÕES

- Os dois inóculos testados, C1 (proveniente de um reator UASB) e C2 (originalmente de um filtro anaeróbio), apresentaram bons rendimentos de 1,3-PDO em batelada, principalmente com glicerol bruto (0,54 e 0,48 mol.mol gli^{-1} , respectivamente). A mistura entre eles C3, não apresentou resultados relevantes, e por isso, não foi utilizado para formação de biofilmes.

- A fixação de C1 e C2 nos suportes de poliuretano foi bem sucedida e permitiu rendimentos de 1,3-PDO e ácidos totais próximos aos resultados obtidos para os inóculos em batelada ($\sim 0,5$ mol de 1,3-PDO.mol gli⁻¹ e valores entre 0,1 e 0,2 mol de ácidos.mol gli⁻¹).
- O reator R1, alimentado com glicerol puro (F1), apresentou maiores rendimentos de 1,3-PDO (valor médio de 0,44 mol.mol gli⁻¹) em pH efluente de 5,3 e com eficiência de consumo de glicerol de 94,4 %. Durante esse período, a carga orgânica (COV), TDH e pH afluente foram próximos a 7 g gli.L⁻¹.d⁻¹, 3 dias e 9,0, respectivamente. No entanto, ele se caracterizou pela elevada produção de ácidos (entre 0,4 e 0,6 mol.mol gli⁻¹) ao longo da operação.
- O reator R2 apresentou rendimentos de 1,3-PDO satisfatórios (valor médio de 0,51 mol.mol gli⁻¹) usando glicerol puro. Nesta fase, os melhores rendimentos de 1,3-PDO foram obtidos em pH efluente próximo a 6 e com eficiência de consumo de glicerol de 93,4 %; aplicando carga orgânica próxima a 13,6 g gli.L⁻¹.d⁻¹, TDH de 2,7 dias e pH afluente de 9,5. Com glicerol bruto (F2) e praticamente mesmos valores para TDH, pH afluente e pH efluente, os maiores rendimentos (0,41 mol.mol gli⁻¹) foram obtidos aplicando uma carga orgânica mais baixa (8,3 g gli.L⁻¹.d⁻¹).
- O filo *Firmicutes* foi dominante em todas as amostras, principalmente na biomassa aderida ao suporte enquanto membros do filo *Proteobacteria* se fizeram presentes significativamente nas amostras do inóculo e biomassa em suspensão.
- A ordem *Clostridiales* foi dominante em todas as amostras, sendo *Enterobacteriales* também com presença significativa no inóculo e na biomassa em suspensão.
- Ao longo da operação, houve uma mudança drástica na microbiota e, por isso, membros das famílias *Coriobacteriaceae*, *Família XI_Incertae Sedis*, *Planococaceae* e *Porphyromonadaceae*, presentes no inóculo, provavelmente não se adaptaram às condições aplicadas ao reator e desapareceram ou se tornaram muito minoritárias.
- O número de sequências incluídas nas famílias *Enterobacteriaceae*, *Clostridiaceae* e *Lactobacillaceae*, que incluem os gêneros descritos como produtores de 1,3-PDO a partir de glicerol foram de 67 % na biomassa em suspensão *versus* 35 % da biomassa aderida ao suporte de poliuretano. Por isso, foi possível supor que a maior parte do 1,3-PDO gerado no reator pode ser atribuída à biomassa suspensa, onde apenas o gênero *Clostridium* se destaca (15 %) como produtor de 1,3-PDO.

5 PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL A PARTIR DE GLICEROL EM REATOR UASB COM BIOMASSA FIXA EM SUPORTE DE SILICONE

Parte desta seção foi publicada no periódico *Bioresource Technology* 279 (2019) 140–148 (<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.125>), com título: *Production of 1,3-propanediol from pure and crude glycerol using UASB reactor with attached biomass in silicone support*, sob autoria de Shyrlane T.S. Veras, Patricia R. Ojeda, Lourdinha Florencio, Mário T. Kato e José L. Sanz.

5.1 INTRODUÇÃO

O 1,3-PDO é amplamente utilizado como matéria-prima na produção e formulação de muitos produtos, sendo empregado na produção de: (i) polímeros, como o polítrimetileno tereftalato (PTT), que apresenta vantagens e preço competitivo em relação ao polietileno tereftalato (PET) e polibutileno tereftalato (PBT) (ZENG; BIEBL, 2002; ZENG; SABRA, 2011); (ii) aditivos destinados às indústrias alimentícias, farmacêuticas; (iii) aditivos utilizados na produção de solventes (para melhorar propriedades); e (iv) adesivos, resinas de poliéster (baixa viscosidade), tintas, lubrificantes, anticongelantes (com menor corrosão e toxicidade do que os derivados de etilenoglicol), cosméticos e biocidas (ABAD; TURON, 2012; SAXENA *et al.*, 2009; ZENG; SABRA, 2011). Por isso, devido a sua ampla faixa de uso, melhorar sua produção é um desafio e uma contribuição valiosa, principalmente do ponto de vista econômico.

Mais de 100 mil toneladas de 1,3-PDO (1,8 €/kg de preço de mercado, BURNIOL-FIGOLS *et al.*, 2018) são produzidas anualmente e a maior parte desse montante provém de processos químicos (SILVA; MACK; CONTIERO, 2009; JIANG *et al.*, 2016). No entanto, a produção de intermediários tóxicos e os maiores custos devido ao uso de catalisadores estão entre os desafios que precisam ser resolvidos para o uso da síntese química. Diante disso, processos biológicos têm sido considerados uma alternativa promissora e capazes de suprir essas desvantagens (NAKAZAWA *et al.*, 2017; YANG *et al.*, 2017). Além disso, os processos biotecnológicos podem utilizar materiais renováveis como substrato para os micro-organismos, valorizando os resíduos e agregando vantagens do ponto de vista ambiental. Nesse contexto, o glicerol pode ser utilizado como substrato para a produção de 1,3-PDO.

Embora o 1,3-PDO tenha sido sintetizado a partir do glicerol pela primeira vez em 1881 (WERKMAN; GILLEN, 1932), o interesse por melhorar sua produção aumentou acentuadamente com o marketing do PTT feito pela DuPont (1995) e Shell (1998). Mais recentemente, isso vem acontecendo devido ao aumento exponencial da produção global de biodiesel ao longo do tempo (de 20 milhões de m³ em 2010 para mais de 42 milhões de m³ até 2026) (OECD/FAO, 2017), já que o glicerol é gerado como um subproduto da produção de biodiesel através de uma reação de transesterificação entre gordura ou óleo e álcool na presença de um catalisador (hidróxido de sódio ou potássio). Estima-se que cerca de 0,1 kg de glicerol seja gerado por cada quilograma de biodiesel produzido (ABAD; TURON, 2012; BURNIOL-FIGOLS *et al.*, 2018; MONTEIRO *et al.*, 2018). Apesar de ser utilizado pela indústria como matéria-prima para uma gama de produtos como: cosméticos, produtos farmacêuticos, aditivos para combustíveis, surfactantes, aromatizantes, agentes gelatinizantes, solventes, lubrificantes, agentes anticongelantes e polímeros; a elevada produção de glicerol pela indústria do biodiesel gerou um enorme excesso que pode constituir um problema ambiental (CORMA *et al.*, 2007).

Além disso, os processos de purificação para remover as impurezas (gorduras residuais, sabões, catalisadores, etc.) têm altos custos. Esses elevados custos para purificação e a queda do preço do glicerol purificado (de 1,5 US \$/kg em quase 20 anos atrás para valores entre 0,5 e 0,6 US \$/kg) (CEIMICI NOVEL LIMITED, 2018; CHEN *et al.*, 2018) têm desencorajado essa prática. Por outro lado, o valor oscilante do glicerol bruto, entre 0 e 0,24 US \$/ kg (VARRONE *et al.*, 2017), aumenta a preocupação sobre o que fazer com a quantidade de glicerol gerada.

Como mencionado por Varrone *et al.* (2017), o glicerol é provavelmente o substrato mais estudado para a produção biológica de 1,3-PDO, que é formada pela via reductiva durante a fermentação do glicerol (SILVA *et al.*, 2009). Segundo Vivek, Pandey e Binod (2016a), uma vez que cada carbono de glicerol possui um grupo hidroxila (–OH), o glicerol tem uma tendência natural a ser reduzido. Vários micro-organismos podem estar envolvidos na formação de 1,3-PDO através da fermentação de glicerol, entre eles: *Klebsiella pneumoniae* (DROZDZYŃSKA *et al.*, 2014; LEE *et al.*, 2018), *Clostridium butyricum* (CHATZIFRAGKOU *et al.*, 2011; FORSBERG, 1987), *C. acetobutylicum* (FORSBERG, 1987), *C. pasteurianum* (LUERS *et al.*, 1997), *C. beijerinckii* (WISCHRAL *et al.*, 2016) *Escherichia coli* (PRZYSTAŁOWSKA *et al.*, 2015), *Citrobacter freundii* e *Hafnia alvei* (DROZDZYŃSKA *et al.*, 2014), *Latobacillus brevis* (VIVEK; PANDEY; BINOD, 2016) e *L.*

reuteri (RICCI *et al.*, 2015), *L. diolivorans* (PFLÜGL *et al.*, 2014); sendo *K. pneumoniae* e *C. butyricum* os mais estudados para a produção de 1,3-PDO (DIETZ; ZENG, 2013).

O rendimento máximo teórico é de 0,72 mol de 1,3-PDO por mol de glicerol consumido (Zeng, 1996), embora valores mais altos tenham sido publicados para culturas puras (Tabela 3, Seção 2). Muitas vezes, esses rendimentos elevados também podem ser atribuídos ao uso de co-fermentação (glicerol + açúcares). No entanto, deve-se destacar que o uso dessas culturas puras apresenta algumas desvantagens, como condições operacionais rigorosas e meios de cultura mais complexos, os quais normalmente estão associados a maiores custos (NAKAZAWA *et al.*, 2017).

Por outro lado, a produção de 1,3-PDO a partir de culturas mistas também foi relatada (BURNIOL-FIGOLS *et al.*, 2018; DIETZ; ZENG, 2013; GALLARDO *et al.*, 2014; MOSCOVIZ; TRABLY; BERNET, 2016; VARRONE *et al.*, 2017). No entanto, os dados disponíveis ainda não são suficientes para garantir que esse processo possa ser adotado em grande escala e como substituto para as aplicações com culturas puras. Portanto, uma maior contribuição científica ainda é necessária para esclarecer a influência de alguns parâmetros operacionais, visando maximizar o rendimento do 1,3-PDO.

5.2 OBJETIVOS

5.2.1 Geral

Avaliar a produção de 1,3-PDO a partir de glicerol puro e bruto utilizando cultura mista aderida em suporte de silicone bem como determinar as melhores condições operacionais do sistema reator UASB-biofilme visando maior rendimento.

5.2.2 Específicos

- Avaliar a formação de biofilme por uma cultura mista em mangueira de silicone (meio de suporte);
- Avaliar o rendimento de 1,3-PDO e determinar as condições que resultaram em melhor desempenho utilizando um reator UASB em escala de bancada contendo biomassa fixa;
- Caracterizar a microbiota do sistema reator-biofilme ao longo da operação (com glicerol puro e bruto), por meio de técnicas de biologia molecular e microscopia.

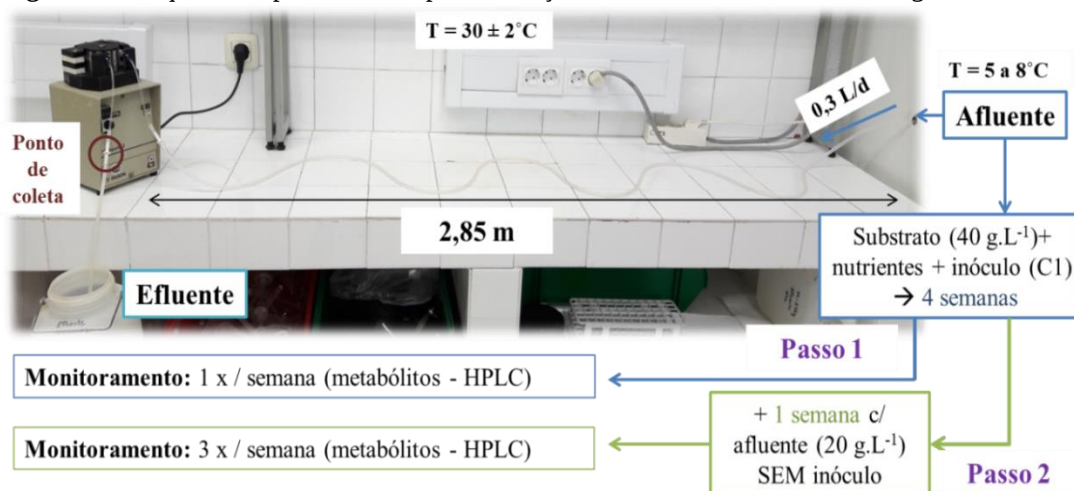
5.3 MATERIAIS E MÉTODOS

5.3.1 Experimento 1: Formação de biofilme no suporte de silicone

Uma mangueira flexível de silicone (Carl Roth[®], Germany) com espessura, diâmetro interno e comprimento, iguais a 0,15 cm, 0,4 cm e 285 cm, respectivamente, foi utilizada para o desenvolvimento da biomassa aderida. Durante quatro semanas, uma bomba enviou uma solução de alimentação através da mangueira com vazão de 0,3 L.d⁻¹. Inicialmente, a solução de alimentação era composta por 40 g.L⁻¹ de glicerol puro (97 %, VWR Chemicals BDH Pro Lab[®], Bélgica), nutrientes (mesma composição descrita na Tabela 13, Seção 4) e cultura mista (C1, 1 % v/v) em pH 7 a 7,5. O inóculo C1 utilizado no presente trabalho, foi o mesmo descrito na seção anterior. Amostras foram coletadas na saída da mangueira, uma vez por semana, para determinar a concentração de metabólitos.

Depois disso, para confirmar o desenvolvimento da biomassa aderida no interior da mangueira, o procedimento foi repetido sob condições semelhantes: um meio mineral com 20 g.L⁻¹ de glicerol, mas sem micro-organismos, foi bombeado através da mangueira por mais uma semana. Posteriormente, 285 cm da mangueira de silicone com a biomassa fixada à parede interna foram transferidos e dispostos em formato de espiral dentro do reator UASB em escala de laboratório (conectado à sua entrada). A Figura 35 mostra um esquema com o procedimento aplicado para a formação de biofilme durante as quatro primeiras semanas (Passo1) e, depois durante a semana final (Passo 2).

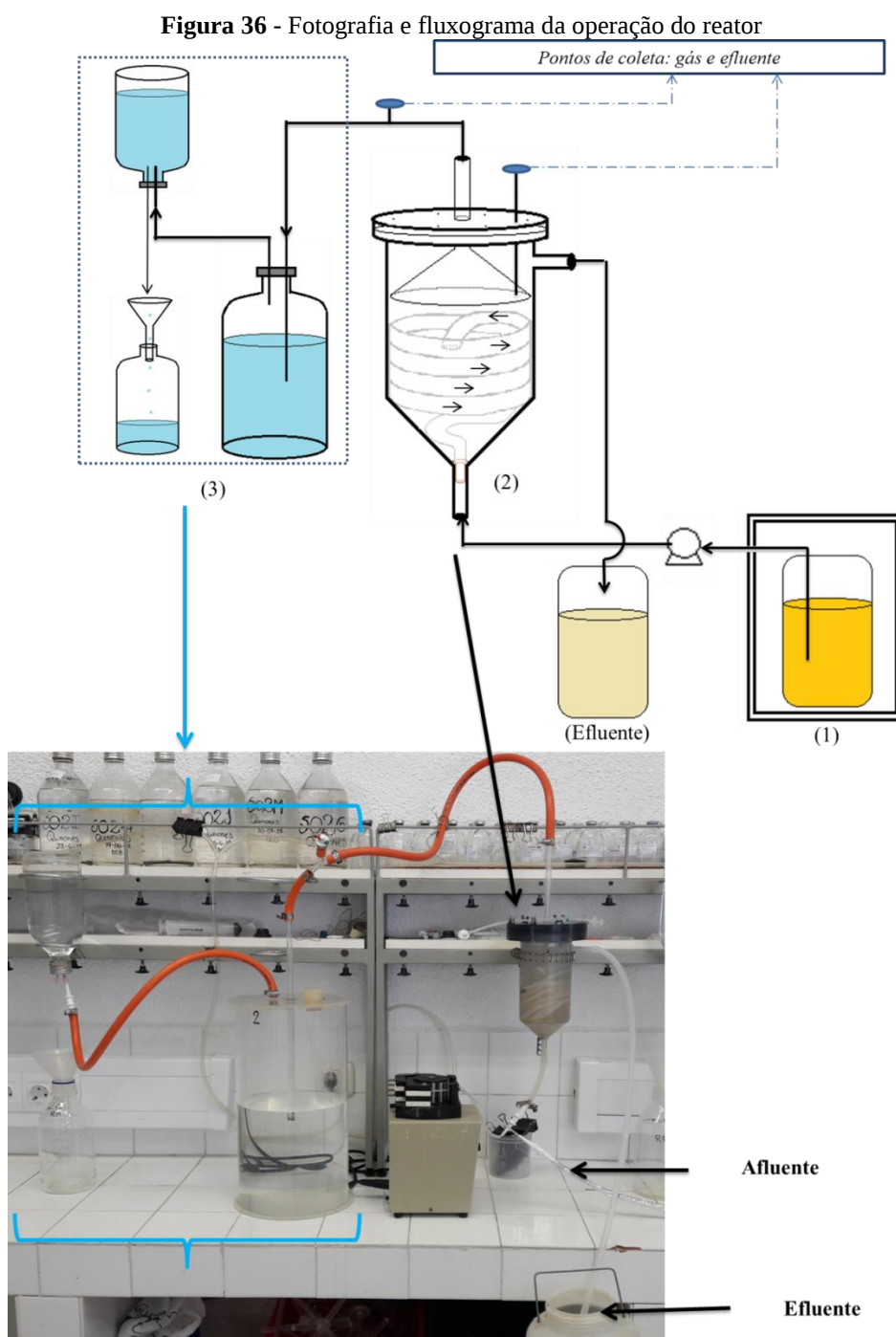
Figura 35 - Esquema do procedimento para formação de biofilme no interior da mangueira de silicone



Fonte: A autora (2019).

5.3.2 Experimento 2: Reator UASB + biomassa fixa

O suporte contendo o biofilme formado na parte interna da mangueira de silicone (descrito anteriormente) foi conectado à entrada de um reator UASB (R3) feito em acrílico (Figura 36).



Nota: (1) Reservatório da solução de alimentação, (2) reator + suporte contendo biofilme e (3) sistema para quantificar a produção de biogás (por deslocamento). **Fonte:** A autora (2019).

O volume útil do sistema (reator-biofilme), foi 762 mL. Os experimentos foram feitos ao longo de 155 dias, dos quais o reator foi alimentado com glicerol puro (fase F1) durante os primeiros 102 dias; e com glicerol bruto (fase F2) a partir do dia 103. O glicerol bruto utilizado foi o mesmo apresentado e descrito na Seção 4. Deste modo, seu uso foi feito após etapa de acidificação e separação de fases para remoção do excesso de óleos residuais. A solução de alimentação também foi preparada com o mesmo meio nutricional apresentado na Tabela 13.

Na Figura 36, a solução de alimentação foi armazenada em um reservatório (1), que foi mantido sob refrigeração (5 e 8 °C); e bombeada para o reator (2) através de uma mangueira de PVC conectado diretamente à entrada do sistema (início de uma das extremidades da mangueira de silicone contendo o biofilme formado na parte interna). O biogás produzido passou por um selo de água (3). Inicialmente, o reator foi operado com TDH, COV (sempre mencionada em termos de g de glicerol), pH afluente e pH efluente próximos a $4 \pm 1,7$ dias, $6 \pm 1,9$ g gli.L⁻¹.d⁻¹, 7,5 e $6,3 \pm 0,1$, respectivamente. Posteriormente, a COV foi subsequentemente aumentada para valores próximos a 22 g gli.L⁻¹.d⁻¹ durante a F1. Durante a F2, a carga foi reduzida pela metade, e em seguida, aumentada até valores próximos a 20 g gli.L⁻¹.d⁻¹.

5.3.2.1 Monitoramento e condições aplicadas

O monitoramento dos parâmetros operacionais (vazão, TDH, COV) aplicados ao reator, bem como a concentração de metabólitos e pH efluente, foram feitos diariamente. E, além disso, a montagem assim como toda a operação foi feita em uma sala com temperatura controlada a 30 ± 2 °C. A Tabela 20 mostra um resumo das condições operacionais aplicadas. A solução de alimentação do reator teve a mesma composição nutricional utilizada nos testes em batelada e para formação dos biofilmes (Tabela 13). Quando necessário, para corrigir o pH dessa solução de alimentação, foi utilizado NaOH (50 %, solução estoque).

Tabela 20 - Fases e condições operacionais aplicadas ao reator

Fase / Glicerol	Tempo de operação (d)	pH _{af}	TDH (d)	COV ^a (g gli.L ⁻¹ .d ⁻¹)
F1 – Puro	0 - 102	7,5 - 9,0	4,0 - 1,2	5,8 – 22,0
F2 – Bruto	103 - 155	8,0 - 9,0	1,5	11,0 – 20,0

^aCOV = Carga orgânica volumétrica em termos de gramas de glicerol. **Fonte:** A autora (2019).

5.3.3 Métodos analíticos

A determinação da concentração de metabólitos bem como o tratamento de dados em termos de rendimento (em mol de subproduto por mol de glicerol consumido), produtividade volumétrica (g de subproduto.L⁻¹.d⁻¹), distribuição dos produtos (%), eficiência de consumo de glicerol (%) e balanço de massa (% DQO) ao longo das fases de operação (F1 e F2), foram feitos conforme descrito na Seção 4.

5.3.4 Ecologia microbiana

5.3.4.1 Extração de DNA, sequenciamento massivo por Illumina e análise filogenética

As amostras do inóculo (C1) assim como amostras do reator obtidas no final da operação com glicerol puro (F1) e bruto (F2) tanto da biomassa suspensa como aderida ao suporte foram coletadas, armazenadas a -20 °C e nomeadas, como mostra a Tabela 21.

Tabela 21 - Nomenclatura, descrição e dia de coleta das amostras para análises de biologia molecular

Amostras		Descrição	Coleta (dia)
Inóculo	C1	Inóculo utilizado para formação de biofilme na mangueira de silicone utilizado no reator, que foi o mesmo utilizado no reator R1, descrito na Seção 4.	--
Glicerol puro	S _{F1}	Biomassa em suspensão coletada durante a fase F1	76
	A _{F1}	Biomassa aderida na parte interna da mangueira de silicone durante a fase F1	76
Glicerol bruto	S _{F2}	Biomassa em suspensão obtida no final da F2	155
	A _{F2}	Biomassa aderida na parte interna da mangueira de silicone durante o final da operação (F2)	155

Fonte: A autora (2019).

O reator não foi aberto em nenhum momento para a coleta das amostras. A biomassa suspensa foi coleta com o auxílio de uma seringa estéril acoplada a uma mangueira (mesmo ponto apresentado na Figura 36 para coleta de efluente). Para a amostra da parte interna, um volume com cerca de 4 mL foi retirado pela entrada do reator (fluxo inverso ao sentido de alimentação).

A extração e sequenciamento de DNA por Illumina assim como o tratamento das sequências e classificação taxonômica, foram feitas considerando os mesmos critérios e utilizando a mesma metodologia descrita durante a Seção 3. O sequenciamento de DNA por

Illumina foi feito pelo Serviço de Sequenciamento e Bioinformática da FISABIO, em Valência (Espanha).

Os resultados da caracterização obtidos no presente estudo foram registrados no Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI) sob o identificador BioProject PRJNA497360. O conjunto de dados contendo as leituras de sequência foi depositado no banco de dados da BioSamples, acessível sob os números de ID SRR8182192, SRR8182191, SRR8182190, SRR8182189 e SRR8182188.

5.3.4.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia bem como a integridade estrutural e crescimento microbiano ao longo da operação com o reator foi analisada por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para isso, amostras do inóculo (C1) e da biomassa suspensa (S_{F2}) e aderida ao suporte (A_{F2}) no final da operação (fase F2) do reator foram coletadas, preparadas e analisadas conforme descrito na Seção 4. Da mesma forma, a análise de MEV foi realizada em um microscópio Phillips XL30 EDAX SX4i no Serviço de Pesquisa Interdepartamental (SIIdI - UAM, Espanha).

5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta subseção, primeiro estão apresentados os resultados e discussão sobre a formação de biofilme na parte interna da mangueira de silicone (Experimento 1). Depois disso, serão apresentados os resultados da operação do sistema reator-biofilme com glicerol puro e bruto (Experimento 2).

Em seguida, uma discussão com base em experimentos preliminares realizados que não foram incluídos em detalhes no presente estudo, mas foram mencionados parcialmente apenas para justificar a escolha do inóculo C1 e da configuração do suporte dentro do reator UASB. E, por último, estão apresentados os resultados para a caracterização microbiológica do inóculo e amostras tomadas ao longo da operação do sistema reator-biofilme.

5.4.1 Experimento 1: Formação de biofilme no suporte de silicone e rendimento de 1,3-PDO

Durante a etapa inicial (quatro primeiras semanas com adição de inóculo) para formação do biofilme, o consumo de glicerol ficou entre 82 e 90 %, enquanto que o rendimento de 1,3-PDO variou entre 0,42 a 0,50 mol.mol gli⁻¹. Já durante a última semana (apenas com substrato e meio nutricional, sem inóculo), o rendimento se apresentou praticamente o mesmo (entre 0,44 e 0,51 mol.mol gli⁻¹), mas com consumo de glicerol entre 90 e 95 %, o que foi atribuído ao crescimento microbiano ao longo do tempo total de experimento (4 semanas com inóculo + 1 semana sem inóculo). Sendo assim, diante do rendimento de 1,3-PDO obtido sem adição de inóculo, ficou comprovada a existência de micro-organismos aderidos à parede interna da mangueira de silicone.

Em geral, a literatura apresenta estudos com TDH baixo (0,5 a 24 h) para a produção de 1,3-PDO (CASALI *et al.*, 2012; GALLARDO *et al.*, 2014; GUNGORMUSLER; GONEN; AZBAR, 2013; VARRONE *et al.*, 2017). Sendo encontrados, por Gungormusler, Gonen e Azbar (2013), bons rendimentos de 1,3-PDO na formação de biofilme aplicando TDH de 0,5 a 1,5 h. Por isso, foi escolhido um tempo longo para o contato entre os micro-organismos e o suporte (quatro semanas); e para garantir um maior número de micro-organismos aderidos, foi utilizado um TDH de 0,12 d (~2,9 h), mais próximo aos valores mínimos reportados.

Tomando em conta esse consumo de glicerol por uma parcela de micro-organismos em suspensão, foi decidido utilizar uma solução de alimentação com uma concentração de glicerol mais alta durante as quatro primeiras semanas (40 g gli.L⁻¹.d⁻¹) para garantir que não houvesse consumo total de glicerol e possível carência do mesmo para determinados grupos de micro-organismos. Durante a última semana (sem inóculo), a solução de alimentação utilizada continha metade da concentração de glicerol (20 g gli.L⁻¹.d⁻¹).

O rendimento médio obtido para 1,3-PDO (0,48 mol.mol gli⁻¹, na última semana) foi ligeiramente maior do que o obtido em batelada (descrito na Seção 4). Com a aderência ao material suporte devido à formação de biofilme, há uma menor perda de micro-organismos do sistema. E nesse caso, com um tempo maior do que uma semana (considerando sua aplicação em sistema contínuo), o crescimento microbiano poderia aumentar ainda mais o consumo de glicerol e formação dos subprodutos, em conformidade com a literatura (GUNGORMUSLER; GONEN; AZBAR, 2013; SUN *et al.*, 2018).

Ainda existem poucos estudos com produção de 1,3-PDO por meio de células imobilizadas (biofilme e microcápsulas), mas entre eles, a maioria envolve a formação de microcápsulas a partir de culturas puras (SOUZA; ROSSI; AYUB, 2014; YANG *et al.*, 2017; ZHAO; CHEN; YAO, 2006). A diferença entre esses dois métodos para imobilização celular envolve basicamente a estabilidade do sistema. As microcápsulas tendem a se destruir ou liberar as células ao longo do tempo, o que não é tão fácil de acontecer com biofilmes. Por permitirem maior estabilidade, o uso de biofilmes é bastante útil na operação de reatores, pois permitem que sejam aplicados menores valores de TDH. Gungormusler, Gonen e Azbar (2013), utilizando anéis de Raschig de vidro como material suporte obtiveram uma maior concentração de 1,3-PDO com menores valores de TDH (0,5 e 1,5 h), embora tenham testados valores de até 16 h, como mencionado anteriormente.

Apesar de serem metodologias distintas (fazendo uma breve comparação), os rendimentos apresentados por alguns estudos envolvendo microcápsulas (e culturas puras) apresentaram valores próximos ou um pouco abaixo do apresentado no presente estudo, com suporte de silicone. Zhao, Chen e Yao (2006), usando glicerol puro, reator de leito fixo e células de *Klebsiella pneumoniae* (ZJU 5205) encapsuladas com NaCS/PDMDAAC; apresentaram rendimentos próximos a $0,4 \text{ mol.mol gli}^{-1}$. Em batelada com a mesma cultura suspensa, obtiveram um rendimento bem maior ($0,65 \text{ mol.mol gli}^{-1}$). Por outro lado, Souza, Rossi e Ayub (2014), usando células de *K. pneumoniae* BLh-1 encapsuladas com alginato de cálcio, reportaram rendimento maior ($0,65 \text{ mol.mol gli}^{-1}$) do que o obtido em batelada ($0,54 \text{ mol.mol gli}^{-1}$).

Por isso, os resultados próximos a $0,5 \text{ mol.mol gli}^{-1}$ encontrados no presente estudo com cultura mista se apresentam bastante interessantes do ponto de vista econômico, antevendo uma possível aplicação em larga escala; e também em termos de contribuição acadêmica, dada a baixa disponibilidade de estudos com culturas mistas e uso de biofilmes para a produção de 1,3-PDO.

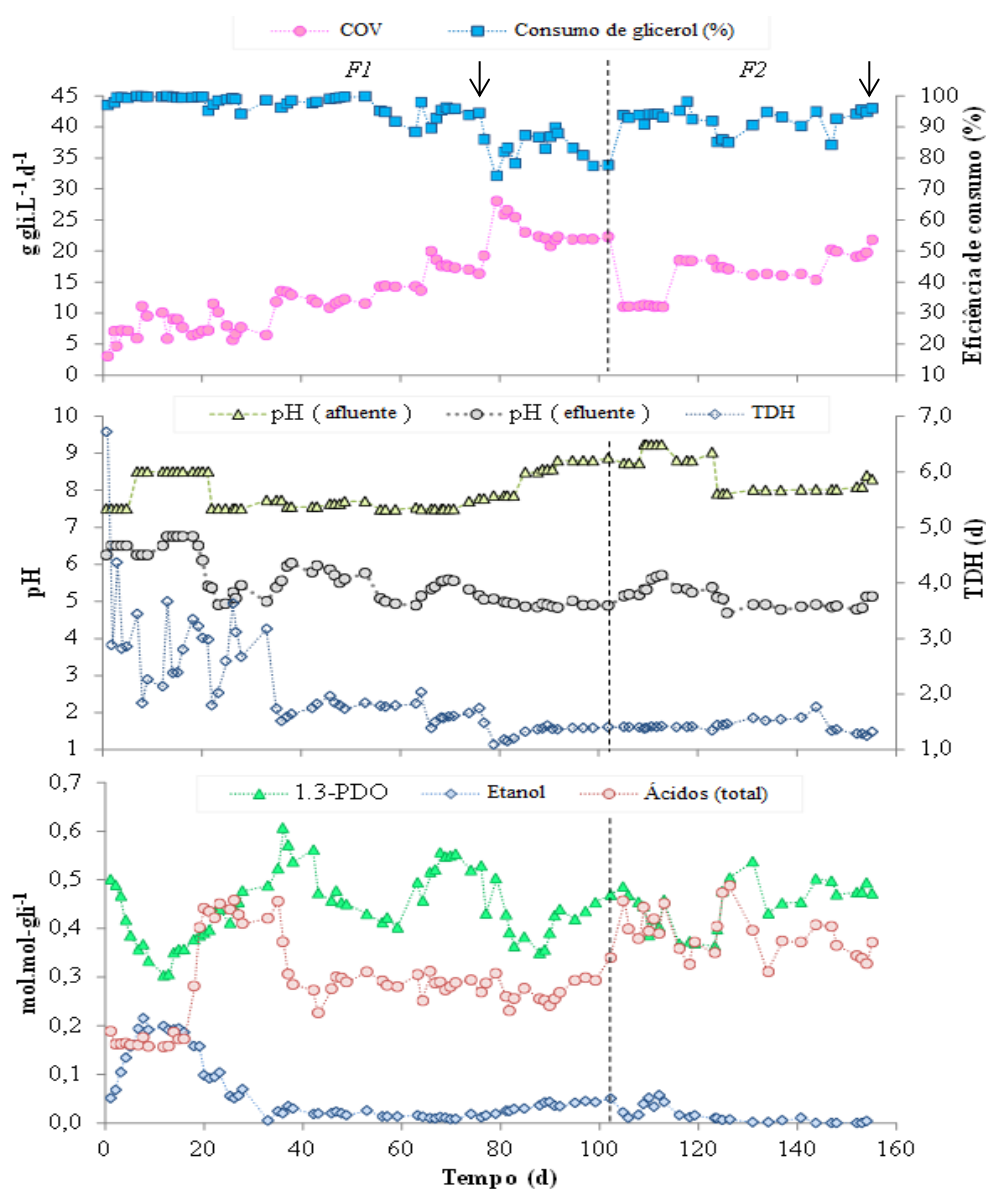
Esses resultados, tanto durante as quatro semanas iniciais (com adição de inóculo) como durante a semana seguinte (sem inóculo), apresentaram comportamentos semelhantes ao inóculo original C1 (batelada descrita na Seção 4), incluindo menor rendimento em ácidos formados ($\sim 0,2 \text{ mol.mol gli}^{-1}$) e etanol ($\sim 0,1 \text{ mol.mol gli}^{-1}$). Mas, diferentemente dos valores obtidos em batelada, além do acetato, o butirato também estava entre os principais carboxilatos produzidos. E isso pode justificar o pH efluente, entre 6 e 6,5, que foi um pouco

mais baixo do que o valor encontrado durante os testes em batelada para o inóculo C1 (pH = 7).

5.4.2 Experimento 2: Desempenho do sistema reator UASB-biofilme

O reator UASB contendo o suporte de silicone com biofilme em seu interior foi utilizado para avaliar a produção de 1,3-PDO. Os resultados obtidos e as condições operacionais aplicadas durante as fases F1 e F2 estão apresentadas na Figura 37.

Figura 37 - Parâmetros operacionais e rendimentos de subprodutos (mol.mol gli^{-1}) durante as fases F1 (glicerol puro) e F2 (glicerol bruto) do reator



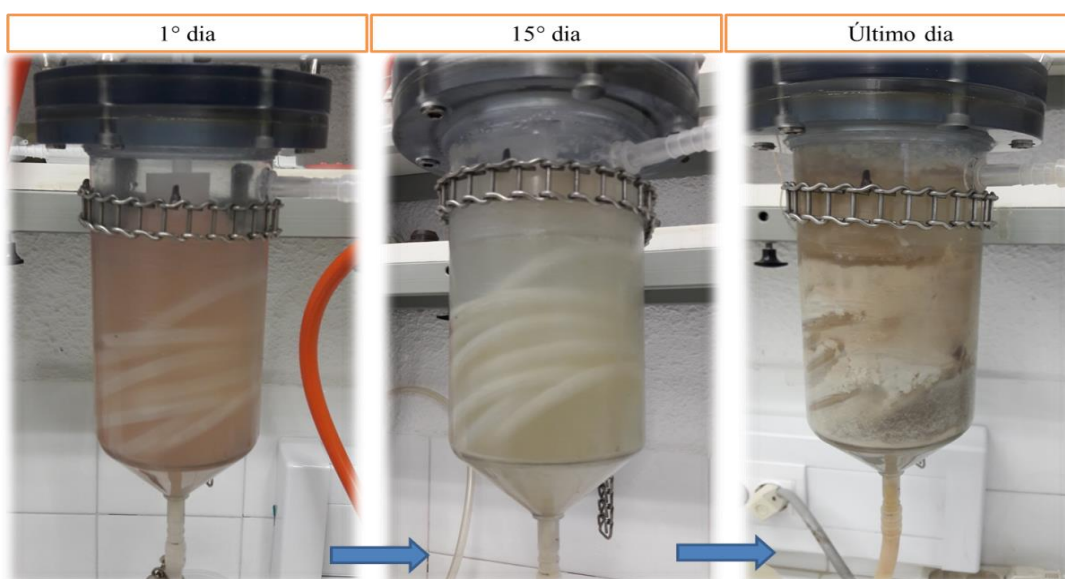
Nota: As setas indicam os dias em que amostras de lodo foram coletadas para análises de biologia molecular. A linha pontilhada indica a troca de glicerol puro para glicerol bruto. **Fonte:** A autora (2019).

Inicialmente, os rendimentos dos produtos (1,3-PDO e demais metabólitos) foram próximos aos obtidos e descritos durante a etapa de formação do biofilme no interior da mangueira de silicone ($0,5 \text{ mol.mol gli}^{-1}$). Contudo, depois disso, a relação 1,3-PDO diminuiu, podendo estar relacionado ao contato inicial com oxigênio durante a montagem do sistema.

Ao mesmo tempo, foi observado um aumento na produção de etanol (de $0,1$ para $0,2 \text{ mol.mol gli}^{-1}$) durante os quinze primeiros dias. Como a saída da mangueira tinha uma pequena curvatura (Figura 36) parte do biogás produzido era retido dentro da mesma. O aumento de etanol juntamente com a produção praticamente constante de acetato, indica que o biogás retido pode ter desfavorecido a oxidação do etanol (ANGENENT *et al.*, 2016).

Passado 15 dias, foi visualmente possível notar a formação de biofilme também na parede externa da mangueira de silicone (Figura 38), podendo justificar a diminuição de etanol e aumento na produção de acetato e de 1,3-PDO; que até então, ambos estavam sendo produzidos principalmente pelos micro-organismos aderidos no interior da mangueira.

Figura 38 - Crescimento microbiano ao longo da operação do reator



Fonte: A autora (2019).

A presença de micro-organismos fora da parte interna, também pode ter favorecido algumas reações de alongamento de cadeia, visto que a diminuição no rendimento de etanol foi acompanhada pelo aumento de acetato e, em menor quantidade, de butirato (de $0,05$ para $0,1 \text{ mol.mol gli}^{-1}$). Isso também poderia explicar o consumo quase total de lactato que pode ter atuado como doador de elétrons junto com o etanol (CAVALCANTE *et al.*, 2017;

KUCEK; NGUYEN; ANGENENT, 2016; LONKAR; FU; HOLTZAPPLE, 2016). Apesar de apresentar baixa produção ($\sim 0,07 \text{ mol.mol gli}^{-1}$), após esse período, a produção de lactato passou a ser nula ao longo da operação. O pH efluente diminuiu de 6,5 para 5, acompanhando o aumento na produção de ácidos.

Posteriormente, com o aumento da carga (para $12 \text{ g gli.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) e diminuição do TDH para 2 dias, foi verificado um aumento no rendimento de 1,3-PDO de 0,49 (dia 33) para um valor máximo de $0,61 \text{ mol.mol gli}^{-1}$ (dia 36). E esse valor foi muito próximo ao rendimento máximo reportado por Varrone *et al.* (2017) usando um reator com tanque agitado tipo CSTR (*continuous flow stirred-tank reactor*), inoculado com lodo anaeróbio enriquecido ($0,63 \text{ mol.mol gli}^{-1}$). Ao mesmo tempo, o rendimento médio dos ácidos formados diminuiu para $0,3 \text{ mol.mol gli}^{-1}$ e permaneceu próximo a esse valor até o final da F1 (dia 102).

Depois de aumentar a carga para $18 \text{ g gli.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ (dia 65 a 76) e diminuir o TDH para 1,5 dias, o rendimento de 1,3-PDO voltou a aumentar. Durante esse período, o rendimento médio de 1,3-PDO apresentou maior valor durante a F1 ($0,54 \text{ mol.mol gli}^{-1}$), com pH efluente em 5,4 e usando uma solução de alimentação sem adição de reagentes (pH afluente de 7,5). O acetato foi o principal ácido produzido, representando $0,2 \text{ mol.mol gli}^{-1}$ de $0,3 \text{ mol.mol gli}^{-1}$ do total produzido. Quando o acetato é o principal produto da via oxidativa, é mais provável que sejam obtidos maiores rendimentos de 1,3-PDO (SAXENA *et al.*, 2009). Além disso, como está discutido mais adiante, o desenvolvimento e dominância de membros do gênero *Clostridium* podem estar relacionados com o elevado rendimento de 1,3-PDO (CHATZIFRAGKOU *et al.*, 2011; FORSBERG, 1987; LUERS *et al.*, 1997; MENDES *et al.*, 2011).

Na sequência, foi imposta uma sobrecarga de glicerol ($\sim 25 \text{ g gli.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) e como consequência, o seu consumo caiu para 80,1 %, assim como o rendimento de 1,3-PDO, ($0,35 \text{ mol.mol gli}^{-1}$). Depois disso, entre os dias 84 e 102, a carga foi diminuída e mantida em $22 \text{ g gli.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$. Gradualmente, o rendimento de 1,3-PDO foi sendo recuperado. Após então, decidiu-se avaliar o desempenho do reator usando agora glicerol bruto (fase F2).

No início da F2, para evitar algum efeito inibitório sobre a biomassa devido aos componentes do glicerol bruto, a carga orgânica foi diminuída pela metade, de 22 para $11 \text{ g gli.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, do dia 103 ao 113. O pH afluente e TDH foram mantidos próximos a 9 e 1,5 dias, respectivamente. O pH efluente ficou em torno de 5,5 e o consumo de glicerol voltou a aumentar para 93 %. Com glicerol bruto, a produção de ácidos aumentou comparada à

quantidade observada durante a F1. Nesse caso, possivelmente ele pode ter sido facilmente metabolizado por bactérias produtoras de ácidos.

A partir do dia 114, devido a problemas operacionais, ocorreu outra sobrecarga no reator, de 11 para 18 g gli.L⁻¹.d⁻¹. Diante disso, a carga foi diminuída para valores próximos a 16,5 g gli.L⁻¹.d⁻¹ e, com o tempo, o sistema foi se recuperando e se adaptando à esta última condição. Ao aumentar um pouco mais a carga, agora para 20 g gli.L⁻¹.d⁻¹, o reator continuou apresentando os maiores rendimentos para 1,3-PDO durante a F2, com valores entre 0,48 e 0,50 mol.mol gli⁻¹. Estes resultados sugerem que usando glicerol bruto, os valores de pH afluente e efluente ótimos foram 8 e 5, respectivamente. Além disso, estes rendimentos foram bastante próximos aos obtidos para o inóculo (C1) em batelada, apesar de o pH efluente ser mais baixo. A Tabela 22 reúne os parâmetros operacionais aplicados e os principais resultados obtidos em cada fase do reator. Nela, também estão apresentados os períodos em que foram obtidos os maiores rendimentos médios de 1,3-PDO.

Tabela 22 - Resumo das condições aplicadas e melhores resultados obtidos nas fases operacionais F1 (glicerol puro) e F2 (glicerol bruto)

Fase	Condições empregadas					Principais resultados		
	Tempo de operação (d)	COV (g gli.L ⁻¹ .d ⁻¹)	TDH (d)	pH _(af)	pH _(ef)	1,3-PDO (mol.mol gli ⁻¹)	Consumo de glicerol (%)	Ácidos _(Total) (mol.mol gli ⁻¹)
F1	65 - 76	18,0±1,1	1,5±0,1	7,5	5,4±0,2	0,54±0,02	94,18±2,23	0,29±0,01
F2	125 - 144	16,4±0,7	1,5±0,1	8,0	4,9±0,1	0,48±0,04	90,64±4,00	0,40±0,06
F2*	145 - 155	20,0±1,0	1,3±0,1	8,0±0,2	4,9±0,2	0,48±0,01	92,84±4,40	0,36±0,03

*Rendimento de 1,3-PDO semelhante com maior valor para a carga aplicada. **Fonte:** A autora (2019).

Dessa maneira, os melhores rendimentos médios de 1,3-PDO obtidos usando glicerol puro (0,54 mol.mol gli⁻¹) e bruto (0,48 mol.mol gli⁻¹), estão em conformidade com os dados da literatura (ver Tabela 3, Seção 2), inclusive, apresentando-se maior do que o reportado por alguns estudos com culturas puras em batelada (DROZDYŃSKA *et al.*, 2014; PRZYSTAŁOWSKA *et al.*, 2015; RICCI *et al.*, 2015), culturas mistas em sistemas contínuos (NAKAZAWA *et al.*, 2017) e, também, com células imobilizadas (microcápsulas) (ZHAO; CHEN; YAO, 2006). Esses resultados obtidos com o reator durante F1 e F2 apresentaram uma diferença abaixo de 0,2 mol.mol gli⁻¹, comparado ao reportado por Jun *et al.* (2010) com cultura pura de *K. pneumoniae* e suportes de poliuretano (cubos de 5 mm).

É importante ressaltar que os menores valores de temperatura (30 °C) e pH efluente (entre 5,0 e 5,5), aplicados em relação aos dados reportados na literatura (temperatura de 37

°C e pH efluente entre 7,0 e 8,0, com adição constante de reagentes para manter essa faixa; SAXENA *et al.*, 2009), contribuem para reduzir os custos, principalmente se considerar que a solução de alimentação no presente trabalho tinha pH de 7,5 e não houve a necessidade de adicionar reagentes.

Em termos de produtividade de 1,3-PDO, o glicerol bruto forneceu melhores resultados do que com o glicerol puro. Durante toda a F1 (glicerol puro), a produtividade de 1,3-PDO foi de 4,63 g.L⁻¹.d⁻¹, enquanto para a F2 (glicerol bruto) este valor foi de 5,21 g.L⁻¹.d⁻¹. Maiores produtividades de 1,3-PDO usando glicerol bruto não são comuns devido ao efeito inibidor causado pela composição de glicerol. No entanto, isso também foi obtido por Jun *et al.* (2010) usando células suspensas de *K. pneumoniae* e em batelada alimentada. Estes autores mencionaram que ao contrário da *K. pneumoniae*, algumas espécies de *Clostridium* são inibidas com o uso de glicerol bruto, o que está de acordo com o maior número de *Klebsiella* identificado para a F2 (R3), discutido em detalhes mais adiante. A Tabela 23 mostra a produtividade média dos metabólitos em cada fase operacional do reator.

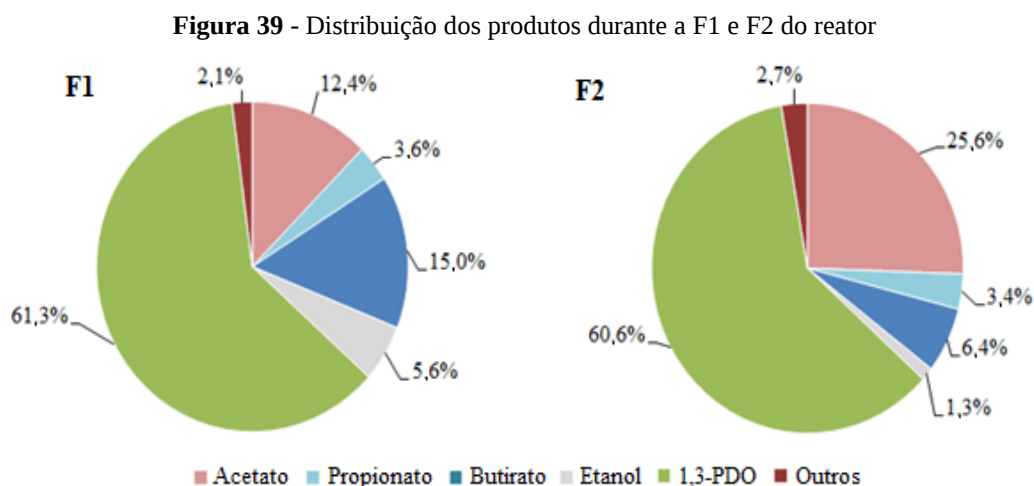
Tabela 23 - Produtividade volumétrica média dos metabólitos em cada fase operacional do reator

Fase	Produtividade (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)								1,3-PDO	Ácidos (total)
	Formiato	Acetato	Propionato	Etanol	Butirato	Lactato	Valerato	Caproato		
F1	0,01	0,94	0,23	0,30	1,17	0,14	n.d.	n.d.	4,63	2,49
F2	n.d.	2,16	0,31	0,09	0,57	0,20	0,01	n.d.	5,21	3,24

Onde F1 e F2 representam as fases operacionais com glicerol puro e bruto, respectivamente; e n.d., não detectado. **Fonte:** A autora (2019).

Portanto, a grande variabilidade na composição do glicerol bruto pode explicar a diferença verificada nas produtividades de 1,3-PDO durante a F1 e F2. Esses valores não foram altos em comparação com os dados da literatura com culturas puras (14 e 76 g.L⁻¹.d⁻¹) (SAXENA *et al.*, 2009; SUN *et al.*, 2018), mas se mantiveram dentro dos valores obtidos para alguns trabalhos com culturas mistas usando tanto glicerol puro como bruto, entre 1,5 e 7,0 g.L⁻¹.d⁻¹ (GALLARDO *et al.*, 2014; VARRONE *et al.*, 2017). Diante disso, a produtividade de 1,3-PDO obtida no presente estudo com glicerol bruto foi muito próxima da reportada por Varrone *et al.* (2017), também usando glicerol bruto e lodo anaeróbico com uma composição nutricional de meio mínimo (5,4 g.L⁻¹.d⁻¹) e outro mais completo (5,2 g.L⁻¹.d⁻¹), ambos com TDH de 1 dia.

A Figura 39 mostra a distribuição dos produtos para a F1 e F2. Em ambas as fases, o principal produto formado foi o 1,3-PDO, representando aproximadamente 61 % do total dos produtos obtidos usando glicerol puro e bruto, também bastante próximos aos valores reportados por Varrone *et al.* (2017), entre 60 e 64 %. Para os primeiros 102 dias (F1), o acetato e butirato foram os principais ácidos carboxílicos produzidos, representando 12,4 e 15 %, respectivamente.



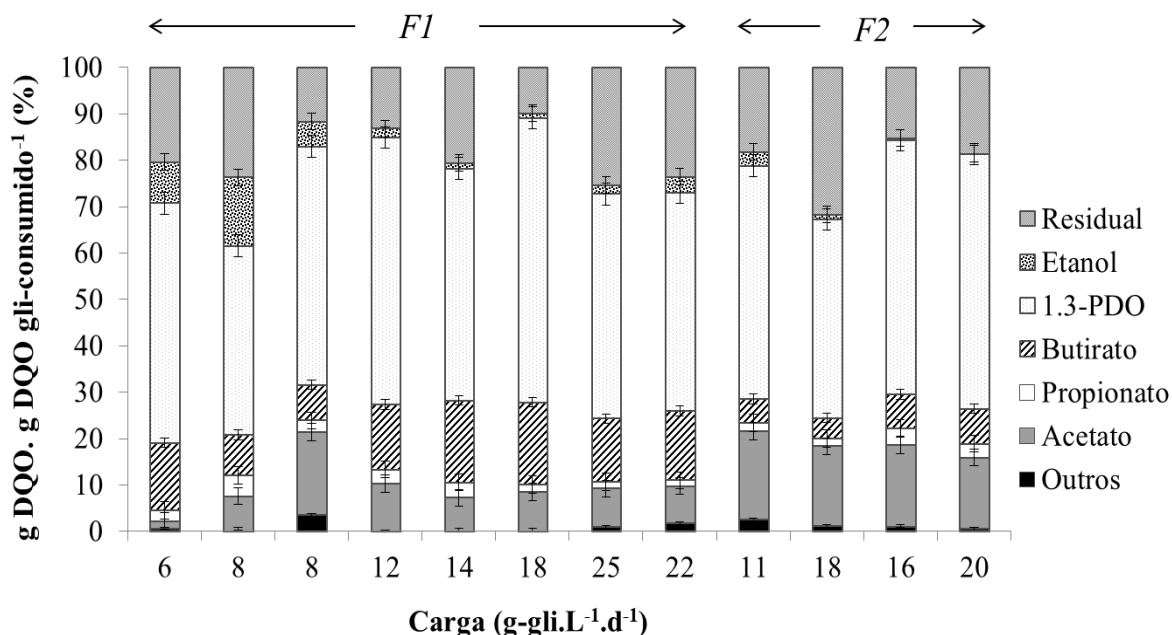
Onde: A soma entre o formiato, lactato e valerato produzidos, está representada como “Outros”.

Fonte: A autora (2019).

Depois disso, na F2, a quantidade de acetato produzida aumentou para 25,6 % dos produtos totais. Formiato, lactato e valerato tiveram uma baixa produção ao longo das duas fases (“outros” na Figura 39). O etanol foi produzido em maior quantidade praticamente apenas no início da operação de F1 (Figura 37, primeiros 15 dias) e pode ter sido consumido para formar mais acetato, como mencionado anteriormente. Ainda durante F2, a pequena formação de valerato também pode ter sido responsável por parte do consumo de etanol e propionato.

Da mesma forma como apresentado na seção anterior, foi feita uma estimativa do balanço de massa (em % DQO), considerando g DQO de cada produto por g DQO glicerol consumido como apresentado na Figura 40. Além disso, a tabela com o resumo das condições operacionais aplicadas, eficiência de consumo de glicerol e rendimento de 1,3-PDO; está contida no APÊNDICE B junto com as tabelas dos outros dois reatores anteriormente descritos (R1 e R2). Nesse caso, R3 apresentou um total semelhante (~80 %) ao descrito para R1 na Seção anterior. Portanto, de forma similar, a existência de picos não identificados pode ter contribuído para o aumento da parcela considerada como “residual”.

Figura 40 - Estimativa do balanço de massa para R3 durante toda a operação com glicerol puro (F1) e bruto (F2) em função da carga de glicerol aplicada



Nota: Formiato, lactato e valerato foram incluídos como “outros”. Biogás, biomassa e metabólitos não identificados estão representados como “residual”. **Fonte:** A autora (2019).

5.4.3 Justificativa para a escolha do inóculo C1 e da configuração do sistema reator UASB + suporte contendo biofilme

Para compreender melhor o motivo da escolha apenas do inóculo C1 para formação de biofilme no suporte de silicone e, principalmente, a disposição do suporte dentro do reator, é necessário contar um pouco sobre os “erros e acertos” que levaram às atividades bem sucedidas descritas com o reator UASB contendo o suporte de silicone com biofilme.

Antes de todas as atividades descritas nas Seções 4 e 5, três reatores com volumes úteis menores (50 – 85 mL) foram testados usando o mesmo inóculo C1 com glicerol bruto, mas com diferentes tipos de suportes. Um quarto reator de 700 mL também foi utilizado para avaliar a produção de 1,3-PDO usando apenas carvão ativado como suporte para C1. Ao todo, cada reator foi operado em três condições diferentes que incluíram tipo de material suporte e condições operacionais.

Entre os meios de suporte, além de carvão ativado, foram testados anéis cerâmicos e discos de vidro poroso. Também foram testadas algumas combinações entre esses materiais como: (i) carvão ativado e discos de vidro poroso (em camadas alternadas), e (ii) anéis cerâmicos e discos porosos. Em cada caso, a produção de metabólitos apresentou diferentes comportamentos apesar de partir do mesmo inóculo. Um exemplo disso foi a elevada

produção de ácido propiônico (valor médio e máximo de 0,47 e 0,7 mol.mol gli⁻¹, respectivamente) no reator contendo carvão ativado como meio de suporte (TDH variando ao longo da operação entre 0,3 e 0,5 d; carga entre 14 e 40 g gli.L⁻¹.d⁻¹ e volume útil de 700 mL). Por esse motivo, a operação foi interrompida.

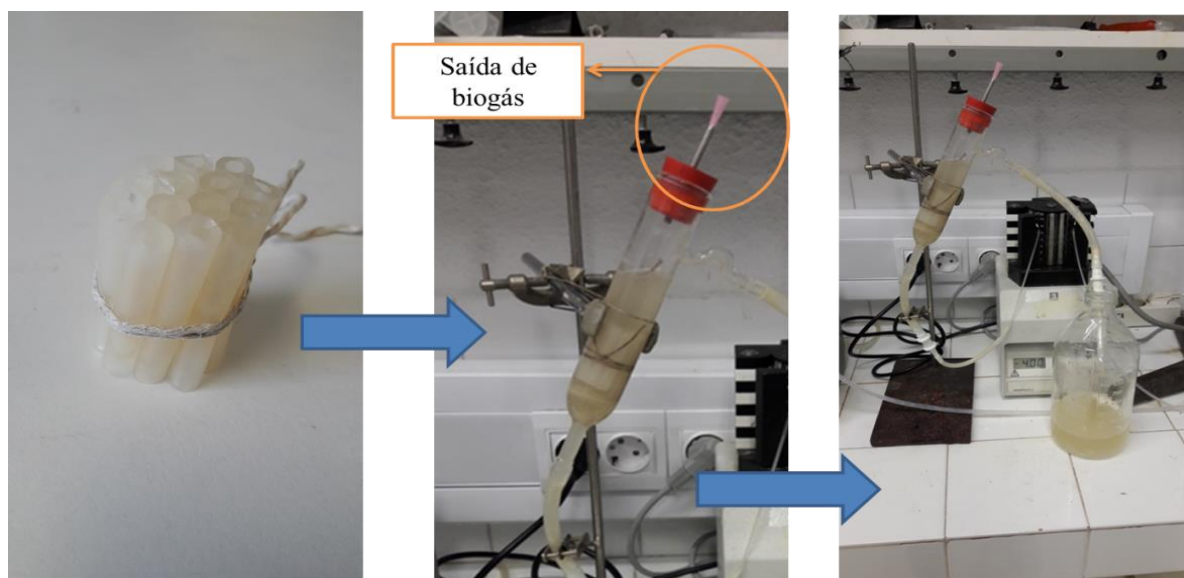
Com os demais tipos de suportes, inicialmente foram obtidos rendimentos de 1,3-PDO bastante próximos ao encontrado em batelada com o inóculo C1. Mas curiosamente, a partir do 20º dia, o consumo de glicerol diminuía consideravelmente, de 85 - 98 %, para valores próximos a 40 %. Isso acontecia independentemente do tipo de suporte e condições operacionais testadas.

Paralelamente, foi observado que ao longo da operação, uma camada visível de biomassa crescia e se aderida de forma estável à parede interna da mangueira (silicone) de alimentação. Em decorrência disso, amostras foram coletadas em três pontos para tentar determinar: (i) se havia consumo significativo de glicerol ainda na linha de alimentação (antes de entrar no reator) e (ii) quais metabólitos aquela biomassa produzia em maior quantidade. O primeiro ponto de coleta foi a solução de alimentação, para poder determinar o consumo de glicerol. O segundo ponto incluiu amostragem da solução antes de passar pela bomba e entrar no reator (área contendo a biomassa formada). E, por último, foi feita a coleta de efluente do reator.

Dessa forma, foi possível concluir que a maior parte o 1,3-PDO formado estava sendo produzido pela biomassa aderida à parede interna da mangueira de silicone (segundo ponto de coleta). Nesse ponto, parte da biomassa se acumulava (decantava) na linha pela ausência de dispositivos para impedir “inversão de vazão”, como válvulas de retenção (sentido único). Então, obviamente, uma parcela significativa do glicerol estava sendo consumido antes de entrar no reator. Em virtude disso, por constatar a facilidade do inóculo em se fixar ao silicone, apenas C1 foi utilizado nos experimentos para formação de biofilme em suporte de silicone.

Assim, um dos reatores foi montado com pedaços dessa mangueira (cerca de 4 cm de comprimento cada), já com a biomassa aderida, mas dispostos verticalmente no sentido do fluxo do reator, como mostra a Figura 41. Durante os 23 primeiros dias, o rendimento médio de 1,3-PDO foi 0,47 mol.mol gli⁻¹ com valores variando entre 0,38 e 0,57 mol.mol gli⁻¹. No entanto, depois disso, assim como vinha acontecendo com os demais reatores, o rendimento desse subproduto caiu, se mantendo praticamente constante (0,37 mol.mol gli⁻¹).

Figura 41 - Reator contendo biofilme em pequenos pedaços de mangueira de silicone dispostos verticalmente



Fonte: A autora (2019).

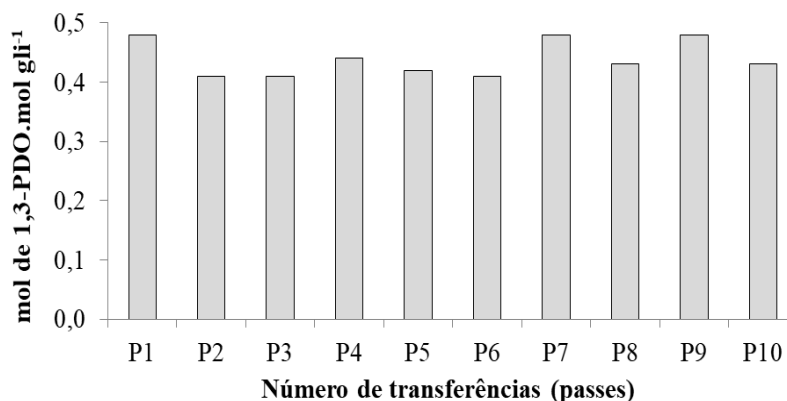
Diante disso, a conclusão que se tinha era: que independente do tipo de suporte e condições operacionais aplicadas, em intervalos entre 20 a, no máximo, 45 dias, os reatores apresentavam uma diminuição aparentemente inexplicável na produção de 1,3-PDO. Ao longo dos testes com os reatores e os tipos de suportes, alterações em parâmetros como TDH e carga orgânica também foram testados. O pH efluente sempre ficou entre 6 e 7,5, portanto, dificilmente poderia estar acontecendo inibição pelo pH.

Então, até esse ponto, o inóculo C1 apresentava uma significativa relação de 1,3-PDO por glicerol consumido apenas em batelada. Para tentar entender porque não funcionavam bem nos reatores, durante os testes em batelada (descritos na Seção 4), os passes ou transferências dos inóculos para frascos com solução nova continuaram sendo feitos (mesma metodologia descrita na Seção anterior). A ideia era verificar, se ao longo do tempo, esses passes apresentariam uma diminuição do rendimento de 1,3-PDO. Os resultados (Figura 42) mostraram que ao longo dos passes (cada um com duração de 3 a 4 dias), a atividade dos micro-organismos contidos no inóculo C1 se manteve, apresentando rendimento de 1,3-PDO médio igual a $0,44 \text{ mol.mol gli}^{-1}$.

Portanto, de posse destes resultados, foi concluído que por um período de 30 a 40 dias (considerando os 10 passes) e em batelada, não houve diminuição significativa no rendimento de 1,3-PDO pelo inóculo C1. Contudo, estes resultados por si só, não explicavam o que poderia estar acontecendo com a atividade da microbiota durante a operação com os reatores. Então, de posse da única informação comprovada, a de que o inóculo produzia 1,3-PDO de

forma praticamente estável em batelada, mas não em operações contínuas, duas possíveis explicações foram levantadas.

Figura 42 - Rendimento de 1,3-PDO pelo inóculo C1 com dez transferências consecutivas para meios frescos



Fonte: A autora (2019).

A primeira envolvia o possível arraste de micro-organismos, pois até então o biofilme no suporte de silicone havia sido testado no mesmo sentido do fluxo. Ademais, como o TDH ficava entre 0,3 e 0,4 dias, a vazão aplicada poderia estar sendo suficiente para permitir o arraste de parte dos micro-organismos. Já a segunda hipótese envolvia a diferença de pressão entre a produção em batelada e com reatores. Pela Figura 41, é possível observar que o reator (assim como os demais reatores testados), funcionava com pressão atmosférica. Isso porque a saída deles tinha um pequeno orifício aberto.

Assim sendo, durante a etapa para formação de biofilme na mangueira de silicone (descrita na presente seção e que já havia sido posta em andamento), além da formação visível de biomassa com coloração branca na parte interna, foi possível observar que o biogás formado ao longo da mangueira ficava retido na parte superior. Com isso, o sistema apresentado na Figura 35 funcionava como um reator tubular contendo líquido na parte inferior e gases na parte superior. Como o rendimento médio obtido durante essa etapa foi próximo ao obtido em batelada, funcionando por um tempo total de 5 semanas, ou seja, maior do que 20 dias e com rendimentos de 1,3-PDO e consumo de glicerol praticamente estáveis; provavelmente a diminuição no rendimento de 1,3-PDO tenha sido causado pela pressão do sistema.

Conforme mencionado durante a revisão bibliográfica (Seção 2.4.4), a composição dos gases influencia na produção dos metabólitos. A pressão parcial de H₂ e CO₂ afetam diretamente as reações acetogênicas (ARSLAN *et al.*, 2016) e, talvez por isso, a produção de

ácido acético tenha sido maior (Seções 4 e 5) do que a de propiônico com os experimentos preliminares (reatores com diferentes materiais suportes). Além do ácido acético, a produção de butírico que era praticamente zero e, em alguns casos, inexistente; passou a ser significativa. E isso, também pode ser atribuído à retenção do biogás formado no sistema, pois ainda de acordo com Arslan *et al.* (2016), maior pressão parcial de hidrogênio favorece a formação de compostos mais reduzidos (ex. butírico, valérico, capróico).

Em decorrência disso, foi decidido dispor o suporte contendo biofilme de modo a reter parte do biogás produzido dentro da mangueira para favorecer a produção de 1,3-PDO pela microbiota, mesmo não operando o sistema sem saída de gases como vinha sendo feito. Ou seja, o reator UASB além do *headspace* formado no separador trifásico, teria outro dentro da mangueira. Por isso, ela foi conectada na parte interna da entrada do reator e disposta em formato espiral com sua saída levemente inclinada para baixo, para reter parte dos gases formados.

Diante dos resultados apresentados nas duas seções anteriores (formação de biofilme no suporte de silicone pelo inóculo C1 e operação do sistema reator UASB-biofilme), muito provavelmente a retenção de parte do biogás formado na parte interior da mangueira contendo o biofilme pode ter contribuído para a dominância de determinados grupos de micro-organismos, podendo justificar a diferença de comportamento entre esse reator e os reatores utilizados nos testes preliminares, incluindo o reator R1 (com mesmo inóculo C1, mas suporte de poliuretano, Seção 4).

Além disso, o tipo de suporte também influencia a formação de biofilme e dos micro-organismos que nele se estabelecem. O suporte de silicone pode ter favorecido o crescimento e aderência de bactérias produtoras de 1,3-PDO em comparação com os demais tipos de suportes testados. Deste modo, se esses micro-organismos estiverem aderidos ao suporte, não serão arrastados com facilidade pela vazão aplicada, permitindo que o reator funcione de forma mais estável diante das modificações operacionais ao longo da operação.

5.4.4 Análise da diversidade e morfologia dos micro-organismos

5.4.4.1 Comunidade microbiana

O sistema Illumina MySeq forneceu entre 80.000 e 100.000 leituras para amostras. Após a filtragem de qualidade, de 65.000 (A_{F1}) a 91.000 (A_{F2}) sequências foram

consideradas para posterior análise. Os comprimentos médios ficaram entre 440 e 450 pb, e foram organizados para atribuições taxonômicas confiáveis em nível de gênero. Os estimadores de cobertura, diversidade e uniformidade foram calculados (Tabela 24). S_{obs} (calcula o número de espécies) e Chao1 evidenciaram uma maior riqueza (diversidade) do reator alimentado com glicerol bruto (A_{F2} e S_{F2}) sobre o inóculo (C1).

Tabela 24 - Índices de cobertura, diversidade e uniformidade para as amostras do reator

	C1	A _{F1}	S _{F1}	A _{F2}	S _{F2}
Total de leituras (sequências)	77682	79002	80439	101513	99330
Leituras de alta qualidade	71396	65183	74497	91165	90332
Comprimento médio	442	440	450	450	452
S_{obs}	127	122	129	386	314
Chao1	499±265	470±259	367±164	1797±592	1341±475
Simpson	0,24±0,001	0,62±0,003	0,19±0,001	0,26±0,002	0,16±0,001
Shannon(H)	1,63± 0,006	0,69±0,007	1,86±0,006	1,90±0,009	2,23±0,007
Shannon even (E_H)	0,3368	0,1429	0,3832	0,3193	0,3876
Gini	0,6787	0,9103	0,7811	0,7202	0,6999
Cobertura de <i>Good</i>	99 %	99 %	99 %	99 %	99 %

Fonte: A autora (2019).

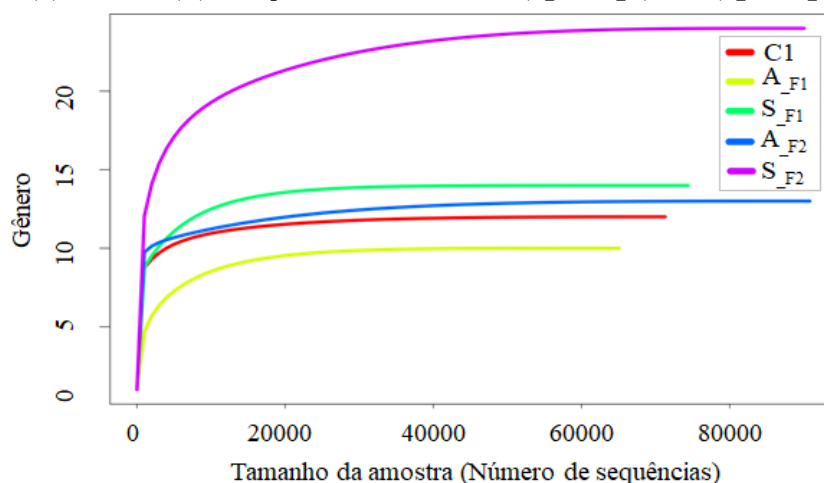
Devido ao elevado número de *raretons*, os valores do índice de Simpson mostraram uma diversidade média, embora a diversidade microbiana tenha sido três vezes menor na A_{F1} do que nas outras amostras. Os dois índices de Shannon (H e E_H) mostraram baixa diversidade ($H < 3$) e baixa uniformidade, enquanto o índice de Gini ($> 0,6$) em todas as cinco amostras evidenciou alta desigualdade, especialmente na amostra A_{F1} . A cobertura das espécies observadas, considerando o estimador de cobertura de *Good*, mostrou que um censo quase total foi alcançado em relação às cinco amostras (99 %).

As curvas de rarefação (Figura 43), que se apresentaram como assíntotas, indicam que o número de micro-organismos identificados pelo sequenciamento representam todos os presentes nas amostras. Ou seja, mesmo aumentando o número de sequências (eixo x), o número de OTUs/espécies não aumentaria (eixo y). Diante disso, não foi necessário nenhum esforço adicional para o tratamento das sequências.

A Figura 44 mostra os perfis taxonômicos em nível de filo (44a), ordem (44b), família (44c) e gênero (44d). Com relação ao nível de filo, *Firmicutes* foi dominante em todas as amostras do reator (entre 66 e 98 %); essa dominância foi mantida no nível de ordem

(*Clostridiales*) e família (*Clostridiaceae*), o que confirma a falta de equitatividade nas populações bacterianas do reator. Após 100 dias de operação, a população do reator já estava aclimatada ao glicerol puro. Outros filos como *Bacteroidetes*, que possuíam presença significativa apenas no inóculo (36 %), diminuíram ou até mesmo desapareceram do reator.

Figura 43 - Curvas de rarefação das amostras do inóculo (C1) e biomassas suspensa (S) e aderida (A) ao suporte durante a fase F1 (S_{F1} e A_{F1}) e F2 (S_{F2} e A_{F2})

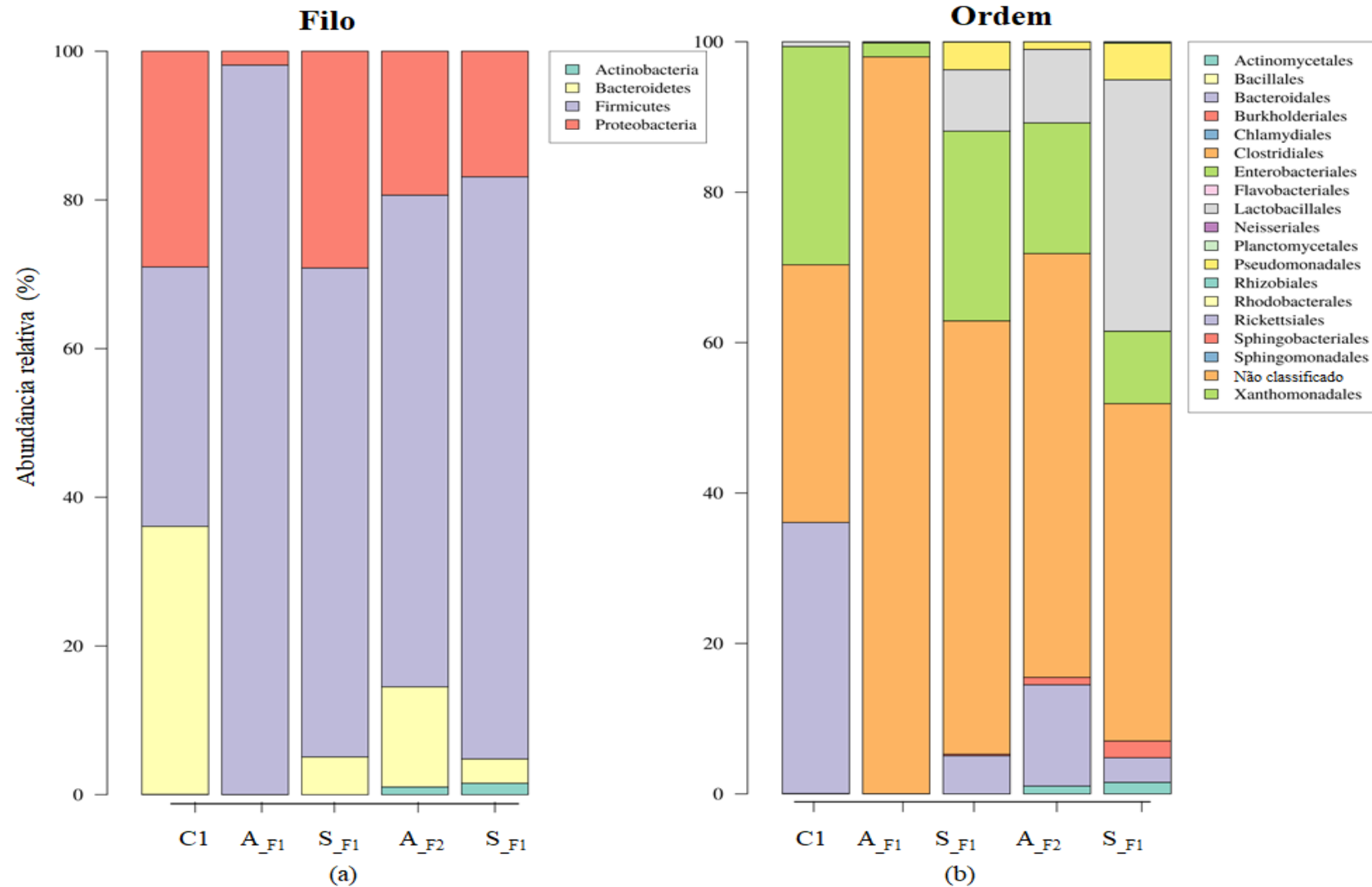


Fonte: A autora (2019).

As famílias *Bacteroidaceae*, *Lachnospiraceae* e *Veillonellaceae*, responsáveis por 48% das sequências no inóculo, também diminuíram acentuadamente ou até desapareceram no reator. Quase todas as bactérias aderidas à parede interna da mangueira de silicone pertenciam à família *Clostridiaceae* (98%) enquanto uma maior diversidade foi observada na biomassa suspensa (Figura 44c). Embora a família *Clostridiaceae* tenha sido majoritária, membros das famílias *Enterobacteriaceae* (25 %) e *Lactobacillaceae* (8 %) também estavam presentes em quantidades significativas. Está bem documentado que os gêneros pertencentes a essas três famílias são responsáveis pela conversão do glicerol em 1,3-PDO sob condições anaeróbias (LEE *et al.*, 2015; SIVASANKARAN; GOVINDARAJ; MANI, 2016; YANG *et al.*, 2018).

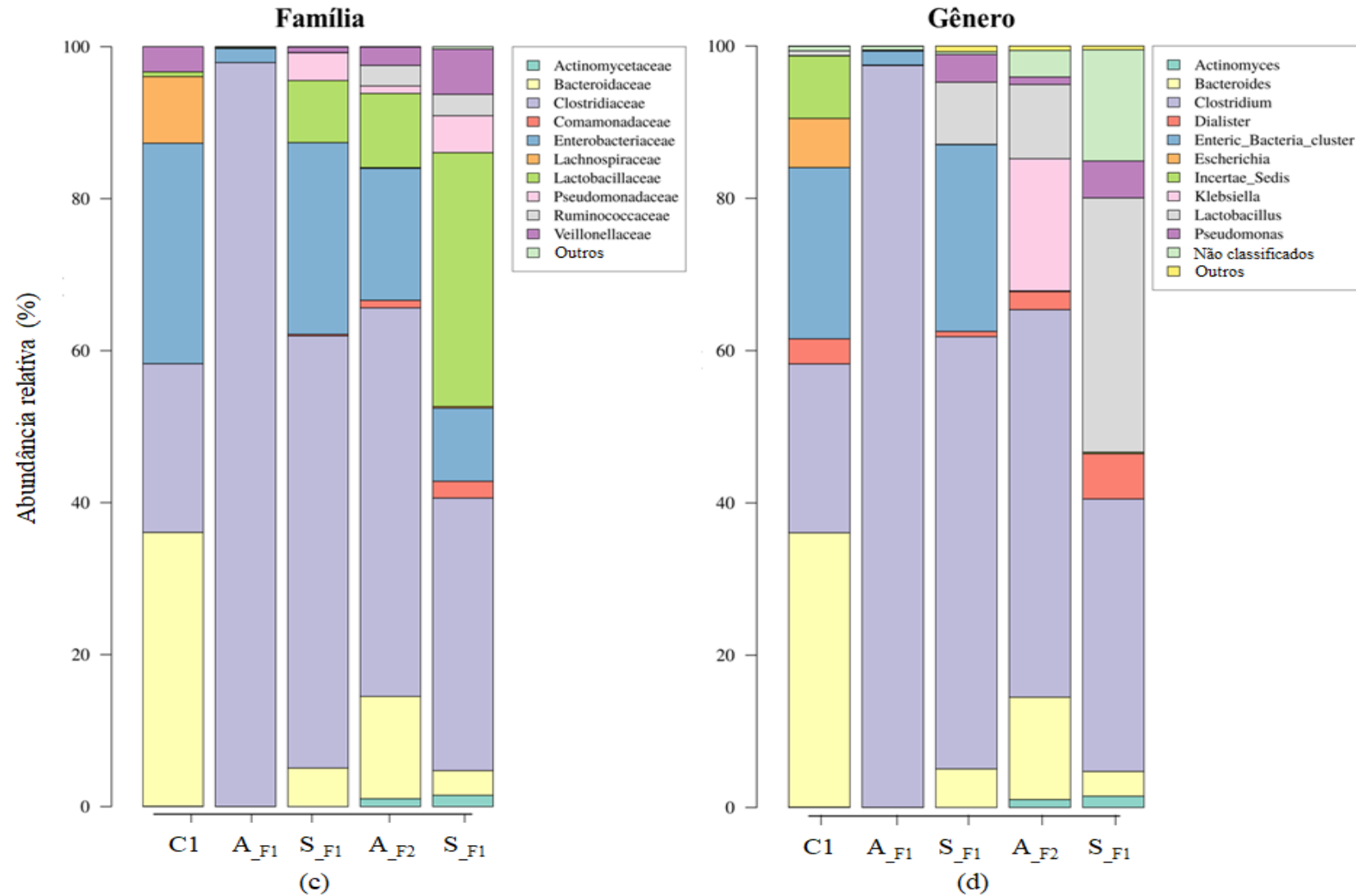
A maioria das leituras de 16S rRNA foi taxonomicamente atribuída de forma fidedigna ao nível de gênero (Figura 44d). Quase todas as sequências recuperadas do biofilme formado dentro do silicone após 100 dias de operação com glicerol puro, foram afiliadas ao gênero *Clostridium*. Após a mudança para glicerol bruto, *Klebsiella* (17 %) e, em menor extensão, *Lactobacillus* (9,7 %), também foram detectados. *K. pneumoniae* (DROZDZYŃSKA *et al.*, 2014; LEE *et al.*, 2018) e *Lactobacillus* (RICCI *et al.*, 2015; VIVEK; PANDEY; BINOD, 2016a) são bactérias conhecidas envolvidas na fermentação do glicerol a 1,3-PDO.

Figura 44 - Perfis taxonômicos no nível de filo (a), ordem (b), família (c) e gênero (d) do reator (Continua)



Nota: Onde o inóculo está representado por C1 e as amostras de biomassa aderida ao suporte (A) e suspensa (S), coletadas durante as fases operacionais F1 e F2 do reator, estão representadas por A_F1, S_F1, A_F2 e S_F2. **Fonte:** A autora (2019).

Figura 44 - Perfis taxonômicos no nível de filo (a), ordem (b), família (c) e gênero (d) do reator (Continuação)



Nota: Onde o inóculo está representado por C1 e as amostras de biomassa aderida ao suporte (A) e suspensa (S), coletadas durante as fases operacionais F1 e F2 do reator, estão representadas por A_F1, S_F1, A_F2 e S_F2. **Fonte:** A autora (2019).

Em relação à biomassa suspensa, após alimentar o reator com glicerol puro, bactérias entéricas e *Lactobacillus* pareceram estar envolvidos na conversão do glicerol. Depois de mudar para glicerol bruto, *Lactobacillus* e *Clostridium* tornaram-se co-dominantes. Além disso, *Pseudomonas*, *Dialister* e alguns gêneros não classificados afiliados às famílias *Veillonellaceae* e *Ruminococcaceae* (ordem *Clostridiales*) também foram detectados.

A análise intra-gênero (Tabela 25) revela aspectos interessantes. Analisando as sequências de consenso das diferentes OTUs atribuídas ao mesmo gênero, é possível acompanhar a evolução das diferentes espécies dependendo da alimentação (glicerol puro ou bruto) e do estado da biomassa (fixada ou suspensa). O foco foi *Clostridium*, um dos gêneros mais representativos e estudados envolvidos na conversão de glicerol em 1,3-PDO (CHATZIFRAGKOU *et al.*, 2011; FORSBERG, 1987; LEE *et al.*, 2015; LUERS *et al.*, 1997).

Tabela 25 - Atribuição taxonômica em nível de espécie usando a sequência de consenso para cada OTU das amostras do reator

Amostra	OTU	% ^a	Espécie	Similaridade ^b
C1	OTU1	22,2	<i>Clostridium beijerinckii</i>	99
	OTU2	8,2	<i>C. sphenoides</i>	99
	OTU3	0,5	<i>Lactobacillus casei/ L. paracasei</i>	99
A_F1	OTU1	75,9	<i>C. pasteurianum</i>	99
	OTU2	21,3	<i>C. beijerinckii</i>	99
	OTU3	0,13	<i>L. paracasei/ L. casei</i>	100
S_F1	OTU1	24,4	<i>C. beijerinckii</i>	99
	OTU2	22,7	<i>C. pasteurianum</i>	99
	OTU3	9,4	<i>C. autoethanogenum/ C. ljungdahlii</i>	99
	OTU4	8,0	<i>L. paracasei/ L. casei</i>	100
A_F2	OTU1	45,4	<i>C. pasteurianum</i>	99
	OTU2	3,3	<i>C. autoethanogenum/ C. ljungdahlii</i>	99
	OTU3	1,6	<i>C. beijerinckii</i>	99
	OTU4	17,3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99
	OTU5	4,4	<i>L. paracasei/ L. casei</i>	99
	OTU6	3,8	<i>L. coryniformis</i>	99
	OTU7	1,5	<i>L. parabuchneri</i>	99
S_F2	OTU1	25,6	<i>C. pasteurianum</i>	99
	OTU2	5,5	<i>C. autoethanogenum/ C. ljungdahlii</i>	99
	OTU3	4,4	<i>C. beijerinckii</i>	99
	OTU4	26,5	<i>L. casei/ L. paracasei</i>	99

^a Percentagem em relação às sequências totais (confiáveis) atribuídas a cada amostra.

^b De acordo com o recurso BLAS do banco de dados NCBI. **Fonte:** A autora (2019).

As sequências retiradas do inóculo (C1) foram atribuídas a *C. beijerinckii* (22,2 %) e *C. sphenoides* (8,2 %). O número de *C. beijerinckii* permaneceu praticamente inalterado após a alimentação com glicerol puro (21,3 % e 24,4 % em A_{F1} e S_{F1}, respectivamente). Entretanto, *C. pasteurianum* se mostrou com elevada dominância no biofilme (75,9 %) e co-dominante com *C. beijerinckii* (24,4 %) na biomassa suspensa, onde 9,4 % das sequências se associam a *C. autoethanogenum*/ *C. ljungdahlii*, não sendo possível atribuir a sequência confiavelmente a uma ou outra espécie. Tanto *C. beijerinckii* como a *C. pasteurianum* foram citados como responsáveis diretos pela produção de 1,3-PDO (JOHNSON; REHMANN, 2016; WISCHRAL *et al.*, 2016).

A mudança na alimentação para glicerol bruto também teve um efeito significativo nas populações de *Clostridium* spp., particularmente em *C. beijerinckii*. Enquanto *C. pasteurianum* permaneceu como a maioria das espécies (45,4 % e 25,6 % em A_{F2} e S_{F2}, respectivamente), o número de *C. beijerinckii* caiu fortemente para 1,6 % na biomassa aderida e 4,4 % na biomassa suspensa.

Foi descrito que o glicerol bruto derivado do biodiesel é tóxico para *C. pasteurianum* e um pré-tratamento foi necessário para a sua conversão em butanol e 1,3-PDO (JENSEN *et al.*, 2012). Jun *et al.* (2010) descobriram que *K. pneumoniae* DSM 4799 era capaz de usar o glicerol bruto como a única fonte de carbono para a produção de 1,3-PDO, ao contrário de várias espécies de *Clostridium* produtoras de 1,3-PDO que eram significativamente inibidas. Por isso, as impurezas contidas no glicerol bruto utilizado podem ter exercido um efeito fortemente inibidor sobre *C. beijerinckii* e, em menor grau, sobre *C. pasteurianum*.

De fato, parte das populações de *Clostridium* foi então substituída por *Klebsiella pneumoniae* (17,3 %) e diferentes espécies de *Lactobacillus* (*L. casei*/ *L. paracasei*, *L. coryniformis*, *L. parabuchneri*; que juntos compuseram 9,7 % das leituras) na biomassa aderida e por *L. casei*/ *L. paracasei* (26,5 %) na biomassa suspensa. Como mencionado anteriormente, tanto *Klebsiella* quanto *Lactobacillus* realizam a conversão de glicerol em 1,3-PDO. Interessante o suficiente, já que a maioria dos trabalhos de pesquisa tenha focado na fermentação de 1,3-PDO a partir de glicerol usando *K. pneumoniae* e *C. butyricum* (DIETZ; ZENG, 2013). No presente estudo, nenhuma sequência afiliada a esta última foi recuperada.

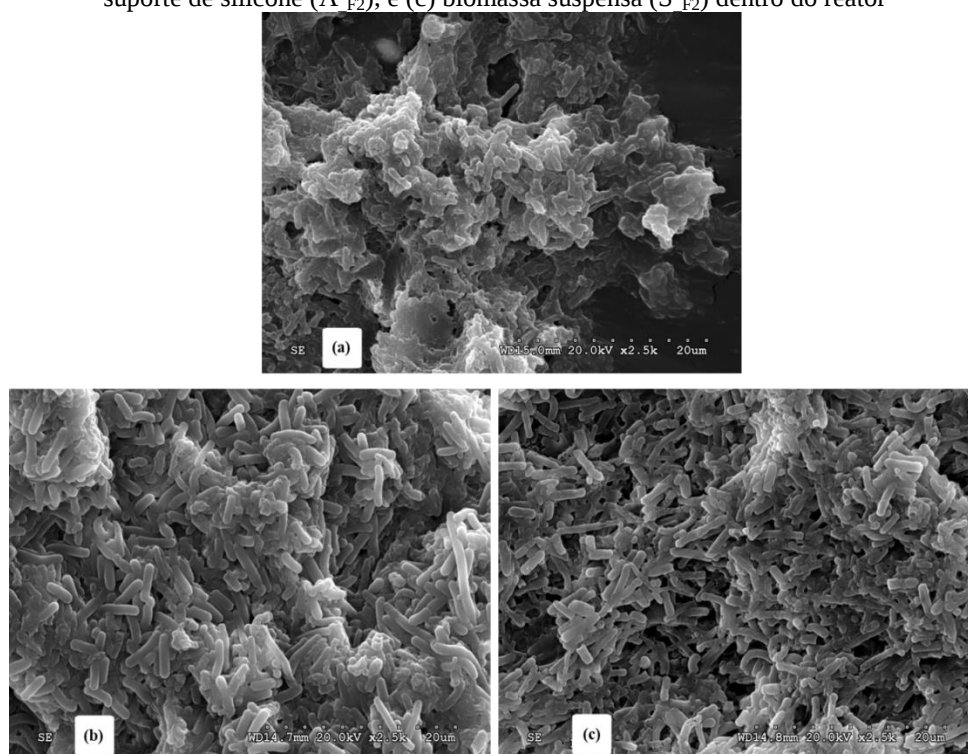
Deste modo, com base no percentual de leituras e considerando que (i) a produção de 1,3-PDO por *L. casei* e *L. paracasei* ainda não foi citada; e (ii) as espécies *C. autoethanogenum*, *C. ljungdahlii* foram mencionadas pela literatura como responsáveis diretas pela produção de acetato e etanol (COTTER; CHINN; GRUNDEN, 2009) enquanto

que *L. coryniformis* como produtora de lactato (GU *et al.*, 2014), é possível sugerir que a maior parte da produção de 1,3-PDO tenha acontecido devido à biomassa aderida. Com glicerol puro, *C. pasteurianum* (JOHNSON; REHMANN, 2016) e *C. beijerinckii* (WISCHRAL *et al.*, 2016) foram os principais responsáveis pela formação desse composto: 97,2 % na biomassa aderida e apenas 47,1 % na suspensão. Depois, com glicerol bruto, esse papel foi dividido entre *C. pasteurianum* e *Klebsiella pneumoniae* (JUN *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2017) e, em quantidade bem menor, *C. beijerinckii* e *L. parabuchneri* (SUN *et al.*, 2018), todos, somando 65,8 %. Apesar da biomassa suspensa apresentar uma parcela de *C. pasteurianum* e *C. beijerinckii*, a soma de ambos (30 %) foi menor do que o percentual total de produtores de 1,3-PDO na biomassa aderida.

5.4.4.2 Morfologia

Para avaliar o crescimento microbiano no interior do tubo e em suspensão ao longo da operação, foram analisadas três amostras. Imagens de MEV inóculo (C1), bem como biomassa coletada no final da operação da parte interna do tubo (A_{F2}) e também, biomassa suspensa (S_{F2}) estão presentes na Figura 45.

Figura 45 - Morfologia de micro-organismos a partir de amostras de (a) inóculo (C1), (b) biomassa aderida ao suporte de silicone (A_{F2}), e (c) biomassa suspensa (S_{F2}) dentro do reator



Nota: todas as escalas utilizadas foram 20 μm. **Fonte:** A autora (2019).

Comparando a Figura 45a com 45b e 45c, foi possível comprovar o crescimento microbiano durante toda a operação do sistema. Além disso, as imagens revelaram para todas as amostras predominância de micro-organismos em forma de bastonetes, em concordância com a morfologia de membros dos gêneros *Clostridium*, *Bacteroides*, *Klebsiella* e *Lactobacillus* identificados como majoritários nas três amostras. Também foi verificada uma boa integridade da estrutura celular ao longo do tempo.

5.5 CONCLUSÕES

- A formação de biofilme no suporte de silicone com o inóculo proveniente de um reator UASB adaptado para consumo de glicerol (C1) foi bem sucedida e permitiu bons rendimentos de 1,3-PDO ($\sim 0,5 \text{ mol.mol gli}^{-1}$) com baixa produção de ácidos ($0,1 - 0,2 \text{ mol.mol gli}^{-1}$).
- Com glicerol puro (fase F1), o reator contendo o suporte de silicone com biomassa aderida em seu interior, apresentou rendimentos de 1,3-PDO muito satisfatórios (valor médio de $0,54 \text{ mol.mol gli}^{-1}$) em pH efluente próximo a 5,5 e com eficiência média de consumo de glicerol de 94,2 %. Durante esse período, a carga orgânica (COV), TDH e pH afluente foram próximos a $18 \text{ g gli.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, 1,5 dias e 7,5, respectivamente.
- Com glicerol bruto (fase F2), o reator seguiu apresentando resultados promissores com rendimentos de 1,3-PDO próximos a $0,5 \text{ mol.mol gli}^{-1}$ (valor médio de $0,48 \text{ mol.mol gli}^{-1}$), mas permitindo uma faixa maior para a carga orgânica (de 16,4 a $20,0 \text{ g gli.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$), pH efluente ligeiramente mais baixo ($\sim 5,0$). O TDH e pH afluente foram próximos aos aplicados durante a F1; e a eficiência de consumo ficou entre 90 e 93 %.
- Durante a fase F2, também foi verificada maior produtividade de 1,3-PDO ($5,21 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) em relação a F1 ($4,63 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$), o que é interessante para a valorização do uso de glicerol bruto como substrato em processos biológicos.
- A ecologia microbiana do reator apresentou maior diversidade com o uso de glicerol bruto em comparação com o puro e, também, com o inóculo C1.
- No inóculo houve predominância de *Clostridium beijerinckii* (22,2 %) e *C. sphenoides* (8,2 %). Durante a fase F1, número de *C. beijerinckii* permaneceu praticamente inalterado na biomassa em suspensão (24,4 %) e na biomassa aderida (21,3 %). No entanto, *C. pasteurianum* se mostrou com elevada dominância no biofilme (75,9 %) e co-dominante com *C. beijerinckii* (24,4 %) na biomassa suspensa.

- A mudança na alimentação para glicerol bruto teve um efeito significativo nas populações de *Clostridium* spp., particularmente em *C. beijerinckii*, que diminuiu fortemente para 1,6 % na biomassa aderida e 4,4 % na suspensão, enquanto *C. pasteurianum* permaneceu como a maioria das espécies (45,4 % na biomassa aderida e 25,6 % na suspensão). Parte das populações de *Clostridium* foi substituída por *Klebsiella pneumoniae* na biomassa aderida (17,3 %) e *Lactobacillus casei*/ *L. paracasei* na biomassa em suspensão (9,7 %).

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Diante dos resultados obtidos, é possível fazer algumas sugestões para pesquisas futuras. Com relação ao apresentado na Seção 3, seria interessante avaliar o efeito de outros doadores de elétrons, principalmente o lactato, sobre os ácidos de cadeia média (ACCM) produzidos. Nesse mesmo contexto, experimentos com culturas puras de *Megasphaera elsdenii* com etanol (e, talvez, misturas entre etanol e lactato) também poderiam ser realizados, já que a literatura ainda não reportou o uso de etanol como doador de elétrons por estes micro-organismos. Essa também seria uma maneira de comprovar que de fato, o consórcio *Mitsuokella* – *Mesgasphaera* foi fundamental na produção de valerato, conforme suposto diante dos resultados apresentados.

Com relação à etapa de extração, novos experimentos para testar diferentes parâmetros operacionais (carga, TDH, gradiente de pH e concentração), poderiam ser capazes de indicar melhorias para garantir um melhor funcionamento, e conseqüentemente, melhores eficiências das taxas de extração. Melhorias no controle do pH da solução alcalina e da pressão do sistema (evitando formação de biogás nas linhas) certamente permitiram melhores resultados. Em contrapartida, poderiam ser testadas alternativas para extrair o 1,3-PDO. Outro ponto que poderia ser mais explorado, seria a capacidade do glicerol em produzir ACCM com cadeias pares e, nesse caso, novas culturas mistas poderiam ser testadas ou, a utilizada poderia ser “adaptada” para esse objetivo. O caminho para isso poderia ser produzir acetato em maior concentração ao invés de propiônico. Mas como isso poderia ser feito? As condições operacionais poderiam ser alteradas a ponto de fazer com que a microbiota siga produzindo mais acetato.

O papel do hidrogênio também pode ser melhor explorado tanto para a produção de ácidos apresentada (Seção 3), já que a maior disponibilidade de H_2 no sistema pode favorecer a produção dos ACCM porque ele é consumido na maioria das reações; como para a seleção de micro-organismos produtores de 1,3-PDO como proposto com a configuração definida para o reator R3 com suporte de silicone contendo a cultura mista estudada (Seção 5). Nesse último, inicialmente poderiam ser realizados testes em batelada com diferentes concentrações de H_2 no *headspace* para tentar definir as melhores condições para, em seguida, testá-las em sistema contínuo (reator com as mesmas configurações de R3 ou com uma configuração que permita maior retenção de biogás para fins comparativos).

Por fim, um estudo mais detalhado da microbiota presente nas culturas assim como no glicerol bruto (quais metabólitos são preferencialmente consumidos, quais os principais produtos formados, etc.), pode ajudar a direcionar o processo para os produtos desejados, seja ácidos (ACCC e ACCM) ou 1,3-PDO.

7 CONCLUSÕES FINAIS

O uso de glicerol bruto como substrato se mostrou bastante atraente tanto para a produção biológica de produtos da via oxidativa (ácidos, principalmente valérico) quanto da redutiva (1,3-PDO).

Na **Seção 3** estudou-se uso do glicerol bruto juntamente com etanol (baixa adição) como doador de elétrons para produção de ACCM por meio de reações de alongamento de cadeia. A maior disponibilidade de propionato (como ACCC) e as condições operacionais aplicadas podem ter influenciado a microbiota pelo caminho mais favorável energeticamente, resultando na maior produção de valerato (ACCM de cadeia ímpar). Portanto, esta é uma alternativa promissora para a produção biológica de valerato em substituição aos métodos convencionais (químicos e termoquímicos), que geralmente estão associados a elevados custos.

O uso do sistema de extração com membranas em linha desfavoreceu a produção de 1,3-PDO e favoreceu a de ácidos (principalmente propionato e valerato), o que é interessante quando o objetivo estiver direcionado para a obtenção destes últimos. No entanto, a eficiência de extração do valerato foi apenas satisfatória (em torno de 54 %), e provavelmente foi influenciada por fatores como: (i) acúmulo de biomassa nos filtros; (ii) pH da solução alcalina abaixo de 9 devido a problemas na dosagem de NaOH, e (iii) baixa afinidade entre TOPO (agente extrator) e valerato; portanto, trabalhos futuros podem se concentrar em estratégias para otimização do processo de extração.

Em termos de biodiversidade, o filo *Firmicutes* foi predominante ao longo dos experimentos. Com o uso do sistema contínuo de extração, foi visível o aumento de *Megasphaera elsdenii* em paralelo com o aumento na produção de valerato (de 0,86 para 1,81 g DQO. L⁻¹.d⁻¹), sugerindo que eles foram fundamentais para a produção desse subproduto.

Na **Seção 4**, estudou-se basicamente o uso de dois inóculos (C1 e C2) e dois reatores UASB (R1, R2) contendo biofilmes formados com C1 e C2 (respectivamente) em suportes de poliuretano. Em batelada, foi comprovado que os dois inóculos apresentaram bons rendimentos de 1,3-PDO, tanto com glicerol puro (0,43 e 0,46 mol.mol gli⁻¹ para C1 e C2, respectivamente), como com o glicerol bruto (0,54 e 0,48 mol.mol gli⁻¹ para C1 e C2, respectivamente), sendo o desempenho com C1 ligeiramente melhor com glicerol bruto do que com o puro.

Com a operação dos reatores foi verificado comportamentos distintos. Usando glicerol puro (fase F1), R1 apresentou maiores rendimentos de ácidos, enquanto R2 apresentou

resultados satisfatórios para a produção de 1,3-PDO ($0,51 \text{ mol. mol gli}^{-1}$), com pH efluente próximo a 6 e eficiência de consumo de glicerol de 93,4 %. As condições operacionais aplicadas nesse período incluíram COV, TDH e pH afluente próximos a $13,6 \text{ g gli.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, 2,7 dias e 9,5, respectivamente. Já com glicerol bruto, os maiores rendimentos ($0,41 \text{ mol.mol gli}^{-1}$) foram obtidos aplicando uma carga orgânica mais baixa ($8,3 \text{ g gli.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$).

Em relação à biodiversidade, no reator R2 foi verificado um maior número de sequências, atribuídas aos micro-organismos descritos pela literatura como produtores de 1,3-PDO, na amostra de biomassa em suspensão (67 % contra 35 % na biomassa aderida ao suporte). Por isso, a maior parte desse composto provavelmente estava sendo produzida pela microbiota suspensa, principalmente por membros do gênero *Clostridium*.

Na **Seção 5**, o inóculo C1 foi utilizado para formação de biofilme em suporte de silicone. Em seguida, o rendimento de 1,3-PDO foi avaliado usando um sistema compostos por um reator UASB (R3) e o suporte contendo o biofilme.

Os rendimentos de 1,3-PDO obtidos este reator foram bastante promissores ($0,54$ e $0,48 \text{ mol.mol gli}^{-1}$ nas fases F1 e F2, respectivamente), considerando o rendimento teórico ($0,72 \text{ mol.mol gli}^{-1}$) e comparando com os poucos dados disponíveis na literatura para culturas mistas e sistemas contínuos. A produtividade foi maior com glicerol bruto ($5,21 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) do que com o puro ($4,63 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) e permitiu bons rendimentos com uma faixa maior para a carga orgânica ($16 - 20 \text{ g gli.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$).

Com relação ao ecossistema contido no reator com suporte de silicone, membros do gênero *Clostridium* foram os principais responsáveis pela conversão de glicerol em 1,3-PDO, embora diferentes espécies tenham sido identificadas dependendo do estado da biomassa (suspensa ou aderida) e do glicerol (puro ou bruto). Com glicerol puro, a produção de 1,3-PDO foi atribuída à biomassa aderida, que mostrou dominância de *C. pasteurianum* (75,9 %) e co-dominância de *C. beijerinckii* (21,3%). O uso do glicerol bruto permitiu uma maior diversidade de micro-organismos envolvidos na fermentação de glicerol com diminuição significativa de *C. beijerinckii* tanto na biomassa aderida quanto na suspensa e substituição de alguns membros do gênero *Clostridium* por *Klebsiella pneumoniae* (17,3 %) na biomassa aderida. A produção de 1,3-PDO também foi associada à biomassa aderida, que nesse caso, apresentou dominância de *C. pasteurianum* e co-dominância de *K. pneumoniae*.

Comparando os dois reatores (R1 e R2) estudados e descritos na Seção 4 com o reator contendo biofilme formado em suporte de silicone (R3, Seção 5), apesar de R2 apresentar rendimento médio de 1,3-PDO próximo ao apresentado por R3 com glicerol puro ($\sim 0,5$

mol.mol gli⁻¹) pode-se concluir que R3 apresentou melhor desempenho pois permitiu uma (i) maior carga aplicada tanto com glicerol puro (18 g gli.L⁻¹.d⁻¹) como bruto (20 g gli.L⁻¹.d⁻¹); (ii) menor TDH (1,5 dias), (iii) maior produtividade e (iv) menor valor para pH afluente (7,5), dispensando a adição de reagentes para correção de pH e, portanto, agregando vantagens econômicas em relação aos demais.

O reator R1 apresentou comportamento completamente diferente do inóculo C1 (batelada) e de R3 (reator + suporte de silicone). Apesar de apresentar o mesmo inóculo, R1 produziu mais acetato e butirato, onde os maiores rendimentos de 1,3-PDO (~ 0,44 mol.mol gli⁻¹) foram obtidos aplicando uma carga orgânica bem mais baixa (7,0 g gli.L⁻¹.d⁻¹) comparado aos demais reatores. A configuração aplicada na montagem do sistema reator com biofilme em R3, com retenção de parte do biogás formado na parte interior do suporte de silicone, certamente foi fundamental para o bom funcionamento do sistema (em termos rendimento de 1,3-PDO) pelo favorecimento de determinados grupos de micro-organismos, podendo justificar a diferença entre os resultados obtidos com esses dois reatores.

Dessa forma, pode-se concluir que a formação de biofilme tanto em suporte de poliuretano, como em silicone, foi bem sucedida e com grande simplicidade durante as etapas de formação e comprovação da sua atividade. Analogamente, a produção de 1,3-PDO se mostrou bastante viável a partir do emprego de reator tipo UASB juntamente com materiais suportes contendo os biofilmes; mas neste estudo, o suporte de silicone favoreceu grupos importantes de produtores de 1,3-PDO, tanto na biomassa aderida (*Clostridium* e *Klebsiella*), como na biomassa em suspensão (*Clostridium* e *Lactobacillus*), o que certamente permitiu uma maior estabilidade do sistema com glicerol puro e bruto.

Portanto, recomenda-se a continuidade de pesquisas envolvendo cultivos mistos usando glicerol bruto, a fim de contribuir para o desenvolvimento de materiais e conhecimentos científicos e tecnológicos necessários para implantação de processos mais simples, para obtenção de produtos de valor agregado, com menores custos e ambientalmente viáveis. E, como consequência, contribuir com conhecimentos necessários para ampliar os processos envolvidos nas plataformas que compõem uma biorrefinaria.

REFERÊNCIAS

- ABAD, S.; TURON, X. Valorization of biodiesel derived glycerol as a carbon source to obtain added-value metabolites: Focus on polyunsaturated fatty acids. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 733–741, 2012.
- AGLER, M.T.; SPIRITO, C.M.; USACK, J.G.; WERNERAB, J.J.; ANGENENT, L.T. Chain elongation with reactor microbiomes: upgrading dilute ethanol to medium-chain carboxylates. **Energy and Environmental Science**, v. 5, p. 8189-8192, 2012.
- AGLER, M.T.; SPIRITO, C.M.; USACK, J.G.; WERNER, J.J.; ANGENENT, L.T. Development of a highly specific and productive process for *n*-caproic acid production: Applying lessons from methanogenic microbiomes. **Water Science and Technology**, v. 69, n. 1, p. 62–68, 2014.
- AGLER, M.T.; WRENN, B.A.; ZINDER, S.H.; ANGENENT, L.T. Waste to bioproduct conversion with undefined mixed cultures: the carboxylate platform. Special Issue – **Applied Microbiology: Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 70-78, 2011.
- AIYUK, S; FORREZ, I; LIEVEN, K.; VAN HAANDEL, A.; VERSTRAETE, W. Anaerobic and complementary treatment of domestic sewage in regions with hot climates - A review. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 2225-2241, 2006.
- ALPHENAAR, P.A.; GROENEVELD, N. Scanning electron microscopical method for internal structure analysis of anaerobic granular sludge. **Pergamon Micron**, v. 25, n. 2, p. 129–133, 1994.
- AMORIM, N.C.S., AMORIM, E.L.C., KATO, M.T., FLORENCIO, L., GAVAZZA, S. The effect of methanogenesis inhibition, inoculum and substrate concentration on hydrogen and carboxylic acids production from cassava wastewater. **Biodegradation**, v. 29, n. 1, p. 41–58, 2018.
- ANDERSEN, S.J.; DE GROOF, V.; KHOR, W.C.; ROUME, H.; PROPS, R.; COMA, M.; RABAEY, K. A Clostridium Group IV species dominates and suppresses a mixed culture fermentation by tolerance to medium chain fatty acids products. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 5, n. February, p. 1–10, 2017.
- ANGENENT, L.T.; KLEEREBEZEM, R. Bioproducts from undefined mixed cultures: electron pushing. **Microbial Biotechnology**, v. 4, n. 2, p. 109-137, 2011.
- ANGENENT, L.T.; RICHTER, H.; BUCKEL, W.; SPIRITO, C.M.; STEINBUSCH, K.J.J.; PLUGGE, C.M.; STRIK, D.P.B.T.B.; GROOTSCHOLTEN, T.I.M.; BUISMAN, C.J.N.; HAMELERS, H.V.M. Chain elongation with reactor microbiomes: Open-culture biotechnology to produce biochemicals, **Environmental Science and Technology**, v. 50, p. 2796-2810, 2016.

ANP. Agência Nacional do Petróleo, 2018. **Anuário estatístico de 2017**. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/publicacoes/anuario-estatistico/3819-anuario-estatistico-2017> Acesso em: 17 de Julho de 2018.

APHA/ AWWA/ WEF 2012. **Standard Methods for examination of water and wastewater**. 22nd ed. American Public Health Association/ American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington, DC, USA.

APROBIO. **Associação dos produtores de biodiesel do Brasil**. Disponível em: <<https://aprobio.com.br/2018/04/19/producao-de-biodiesel-deve-ser-de-5-bilhoes-de-litros-em-2018/>> Acesso em: 17 ago. 2018.

ARSLAN, D.; STEINBUSCH, K.J.J.; DIELS, L.; HAMELERS, H.V.M.; STRIK, D.P.B.T.B., BUISMAN; C.J.N., DE WEVER, H. Selective short-chain carboxylates production: A review of control mechanisms to direct mixed culture fermentations. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 46, n. 6, p. 592–634, 2016.

BAHRMANN, H.; FROHNING, C.D.; HEYMANNS, P.; KALBFELL, H.; LAPPE, P.; PETERS, D.; WIEBUS, E. *n*-valeric acid: Expansion of the two phase hydroformylation to butenes. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 116, n. 1–2, p. 35–37, 1997.

BARBIRATO, F.; CHEDAILLE, D.; BORIES, A. Propionic acid fermentation from glycerol: Comparison with conventional substrates. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 47, n. 4, p. 441–446, 1997.

BEATRIZ, A.; ARAÚJO, Y.J.K.; LIMA, D.P. Glicerol: um breve histórico e aplicação em sínteses estereosseletivas. **Química Nova**, v. 34, 2, p. 306-319, 2011.

BERMÚDEZ-PENABAD, N.; KENNES, C.; VEIGA, M. C. Anaerobic digestion of tuna waste for the production of volatile fatty acids. **Waste Management**, v. 68, p. 96–102, 2017.

BORNSTEIN, B.T. AND BARKER, H.A. The energy metabolism of *Clostridium kluyveri* and the synthesis of fatty acids. **Journal of Biological Chemistry**, v. 172, p. 659–669, 1948.

BOTTON, V.; SOUZA, R.T.; WIGGERS, V.R.; SCHARF, D.R.; SIMIONATTO, E.L.; ENDER, L.; MEIER, H.F. Thermal cracking of methyl esters in castor oil and production of heptaldehyde and methyl undecenoate. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 121, p. 387–393, 2016.

BRANDNER, A.; LEHNERT, K.; BIENHOLZ, A.; LUCAS, M.; CLAUS, P. Production of biomass-derived chemicals and energy: chemocatalytic conversions of glycerol. **Topics in Catalysis**, v. 52, n. 2, p. 283-301, 2009.

BURNIOL-FIGOLS, A.; VARRONE, C.; LE, S.B.; DAUGAARD, A.E.; SKIADAS, I. V.; GAVALA, H.N. Combined polyhydroxyalkanoates (PHA) and 1,3-propanediol production from crude glycerol: Selective conversion of volatile fatty acids into PHA by mixed microbial

consortia. **Water Research**, v. 136, p. 180–191, 2018.

CASALI, S.; GUNGORMUSLER, M.; BERTIN, L.; FAVA, F.; AZBAR, N. Development of a biofilm technology for the production of 1,3-propanediol (1,3-PDO) from crude glycerol. **Biochemical Engineering Journal**, v. 64, p. 84–90, 2012.

CAVALCANTE, W.A. **Fermentação anaeróbia para formação de ácido caproico a partir de produtos e subprodutos da cadeia produtiva da cana-de-açúcar**. Dissertação de Mestrado: São Carlos, SP: Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de São Carlos, 2016, 136p.

CAVALCANTE, W.A.; LEITÃO, R.C.; GEHRING, T.A.; ANGENENT, L.T.; SANTAELLA, S.T. Anaerobic fermentation for *n*-caproic acid production: A review. **Process Biochemistry**, v. 54, p. 106–119, 2017.

CEIMICI NOVEL LIMITED. **Biodiesel**. Disponível em: <<http://www.ceimicinovel.com/po/biodiesel.php>> Acesso em: 18 out 2018.

CETINKAYA, M.; KARAOSMANOGLU, F. Optimization of base-catalyzed transesterification reaction of used cooking oil. **Energy and Fuels**, v. 18, n. 6, p. 1888-1895, 2004.

CHANG, H.N.; KIM, N.J.; KANG, J.; JEONG, C.M. Biomass-derived volatile fatty acid platform for fuels and chemicals. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 15, p. 1-10, 2010.

CHATZIFRAGKOU, A.; PAPANIKOLAOU, S.; DIETZ, D.; DOULGERAKI, A.I.; NYCHAS, G.J.E.; ZENG, A.P. Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* growing on biodiesel-derived crude glycerol through a non-sterilized fermentation process. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 1, p. 101–112, 2011.

CHEN, J.; YAN, S.; ZHANG, X.; TYAGI, R.D.; SURAMPALLI, R.Y.; VALÉRO, J.R. Chemical and biological conversion of crude glycerol derived from waste cooking oil to biodiesel. **Waste Management**, v. 71, p. 164–175, 2018.

CHEN, W.S.; YE, Y.; STEINBUSCH, K.J.J.; STRIK, D.P.B.T.B.; BUISMAN, C.J.N. Methanol as an alternative electron donor in chain elongation for butyrate and caproate formation. **Biomass and Bioenergy**, v. 93, p. 201–208, 2016.

COELHO, P. **Manual do guerreiro da luz**. 1ªed. São Paulo: Paralela, 2017. 160p.

COLARES, A.; CAVALCANTE, W.A.; GEHRING, T.; LEITÃO, R.C.; SANTAELLA, S.T. **Extração seletiva de ácido caproico de um biorreator anaeróbio através de um sistema de membranas**. In: Encontro de Iniciação Científica da Embrapa Agroindústria Tropical, 2016, Fortaleza. Anais do XIV Encontro de Iniciação Científica da Embrapa Agroindústria Tropical, 2016.

COLIN, T.; BORIES, A.; MOULIN, G. Inhibition of *Clostridium butyricum* by 1,3-propanediol and diols during glycerol fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, n. 2, p. 201–205, 2000.

CORMA, A.; IBORRA, S.; VELTY, A. Chemical routes for the transformations of biomass into chemicals. **Chemical Reviews**, v. 107, p. 2411–2502, 2007.

CORMA, A.; OLIVER-TOMAS, B.; RENZ, M.; SIMAKOVA, I.L. Conversion of levulinic acid derived valeric acid into a liquid transportation fuel of the kerosene type. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 388–389, p. 116–122, 2014.

COTTER, J. L.; CHINN, M. S.; GRUNDEN, A. M. Influence of process parameters on growth of *Clostridium ljungdahlii* and *Clostridium autoethanogenum* on synthesis gas. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 44, n. 5, p. 281–288, 2009.

DESANTIS, T.Z.; HUGENHOLTZ, P.; LARSEN, N.; ROJAS, M.; BRODIE, E.L.; KELLER, K.; HUBER, T.; DALEVI, D.; HU, P.; ANDERSEN, G.L. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 7, p. 5069–5072, 2006.

DHANDE, Y. K.; XIONG, M.; ZHANG, K. Production of C5 carboxylic acids in engineered *Escherichia coli*. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 12, p. 1965–1971, 2012.

DIETZ, D.; ZENG, A. P. Efficient production of 1,3-propanediol from fermentation of crude glycerol with mixed cultures in a simple medium. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, n. 2, p. 225–233, 2013.

DING, H. B.; TAN, G. Y. A.; WANG, J. Y. Caproate formation in mixed-culture fermentative hydrogen production. **Bioresource Technology**, 2010.

DISHISHA, T.; IBRAHIM, M.H.A.; CAVERO, V.H.; ALVAREZ, M.T.; HATTI-KAUL, R. Improved propionic acid production from glycerol: Combining cyclic batch- and sequential batch fermentations with optimal nutrient composition. **Bioresource Technology**, v. 176, p. 80–87, 2015.

DROZDZYŃSKA, A.; PAWLICKA, J.; KUBIAK, P.; KOŚMIDER, A.; PRANKE, D.; OLEJNIK-SCHMIDT, A.; CZACZYK, K. Conversion of glycerol to 1,3-propanediol by *Citrobacter freundii* and *Hafnia alvei* - newly isolated strains from the Enterobacteriaceae. **New Biotechnology**, v. 31, n. 5, p. 402–410, 2014.

EBB. **European Biodiesel Board Statistics**. Disponível em: <<http://www.ebb-eu.org/stats.php>>. Acesso em: 24 abr. 2018.

ENGELS, CHRISTINA; RUSCHEWEYH, HANS-JOACHIM; BEERENWINKEL, NIKO; LACROIX, C.; SCHAWAB, C. The common gut microbe *Eubacterium hallii* also contributes to intestinal propionate formation. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. MAY, p. 1–12, 2016.

FABER, M. O.; FERREIRA-LEITÃO, V.S. Optimization of biohydrogen yield produced by bacterial consortia using residual glycerin from biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 219, p. 365–370, 2016.

FERGUSON, R.M.W.; COULON, F.; VILLA, R. Understanding microbial ecology can help improve biogas production in AD. **Science of the Total Environment**, v. 642, p. 754-763, 2018.

FIUZA JUNIOR, R. A. **Hidrogenólise do glicerol sobre catalisadores de cobre e cromo**. Dissertação de Mestrado. Salvador, BA: Universidade Federal da Bahia, 2012. 113p.

FONTS, I.; GEA, G.; AZUARA, M.; ÁBREGO, J.; ARAUZO, J. Sewage sludge pyrolysis for liquid production: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, p. 2781–2805, 2012.

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

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

FORSBERG, C. W. Production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium acetobutylicum* and other *Clostridium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 639–643, 1987.

FRAGMAQ. **Biorrefinaria: conheça as usinas renováveis**. Matéria publicada em: 31 Ago 2012. Disponível em: <<http://www.fragmaq.com.br/blog/energia-renovavel/biorrefinaria/>> Acesso em: 08 Mar 2015.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, p.405-416, 2001.

GABELMAN, A.; HWANG, S. Hollow fiber membrane contactors. v. 159, p. 61–106, 1999.

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

GE, S.; USACK, J.G.; SPIRITO, C.M.; ANGENENT, L.T. Long-term n-caproic acid production from yeast-fermentation beer in an anaerobic bioreactor with continuous product extraction. **Environmental Science and Technology**, v. 49, n. 13, p. 8012–8021, 2015.

GEHRING, T.; CAVALCANTE, W.; COLARES, A.; VIANA, P.B.; PINHEIRO, B.M.; VIANNA, A.F.; LEITÃO, R.C.; SANTAELLA, S.T. **Produção de ácidos carboxílicos de cadeia média em biorreatores anaeróbios com extração seletiva por membranas**. In: III

Encontro de Pós-Graduação da Embrapa Agroindústria Tropical, 2016, Fortaleza. Anais do III Encontro de Pós-Graduação da Embrapa Agroindústria Tropical, 2016.

GEHRING, T.; CAVALCANTE, W.; VIANNA, A. F.; DAMS, R. I.; SANTAELLA, S. T.; LEITÃO, R. C. **Implementação de um modelo cinético-estequiométrico para descrição dos processos de produção, extração e re-extração de ácido caproico em reatores anaeróbios combinados com sistema de membranas.** In: II Encontro de Pós-Graduação da Embrapa Agroindústria Tropical, 2015, Fortaleza. Anais do II Encontro de Pós-Graduação da Embrapa Agroindústria Tropical - EPGEAT, 2015.

GROOTSCHOLTEN, T.I.M.; STEINBUSCH, K.J.J.; HAMELERS, H.V.M.; BUISMAN, C.J.N. High rate heptanoate production from propionate and ethanol using chain elongation. **Bioresource Technology**, v. 136, p. 715–718, 2013a.

GROOTSCHOLTEN, T.I.M.; STEINBUSCH, K.J.J.; HAMELERS, H.V.M.; BUISMAN, C.J.N. Chain elongation of acetate and ethanol in an upflow anaerobic filter for high rate MCFA production. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 440–5, maio 2013b.

GU, S.A.; JUN, C.; JOO, J.C.; KIM, S.; LEE, S.H.; KIM, Y.H. Higher thermostability of l-lactate dehydrogenases is a key factor in decreasing the optical purity of d-lactic acid produced from *Lactobacillus coryniformis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 58–59, p. 29–35, 2014.

GU, X.; ZHANG, B.; LIANG, H.; GE, H.; YANG, H.; QIN, Y. Pt/HZSM-5 catalyst synthesized by atomic layer deposition for aqueous-phase hydrogenation of levulinic acid to valeric acid. **Journal of Fuel Chemistry and Technology**, v. 45, n. 6, p. 714–722, 2017.

GUJER, W.; ZEHNDER, A.J.B. Conversion processes in anaerobic digestion. **Water Science and Technology**, v. 15, p. 127-167, 1983.

GUNGORMUSLER, M.; GONEN, C.; AZBAR, N. Effect of cell immobilization on the production of 1,3-propanediol. **New Biotechnology**, v. 30, n. 6, p. 624–628, 2013.

GUPTA, A.; SINGH, D.; BARROW, C.J.; PURI, M. Exploring potential use of *Australian thraustochytrids* for the bioconversion of glycerol to omega-3 and carotenoids production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 78, p. 11–17, 2013.

HARON, R.; MAT, R.; ABDULLAH, T.A.T.; RAHMAN, R.A. Overview on utilization of biodiesel by-product for biohydrogen production. **Journal of Cleaner Production**, v. 172, p. 314–324, 2018.

HU, S.; LUO, X.; WAN, C.; LI, Y. Characterization of crude glycerol from biodiesel plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 23, p. 5915–5921, 2012.

JANKOWSKA, E.; DUBER, A.; CHWIALKOWSKA, J.; STODOLNY, M.; OLESKOWICZ-POPIEL, P. Conversion of organic waste into volatile fatty acids – The

influence of process operating parameters. **Chemical Engineering Journal**, v. 345, n. January, p. 395–403, 2018.

JENSEN, T.Ø.; KVIST, T.; MIKKELSEN, M.J.; CHRISTENSEN, P.V.; WESTERMANN, P. Fermentation of crude glycerol from biodiesel production by *Clostridium pasteurianum*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 5, p. 709–717, 2012.

JEON, B.S.; CHOI, O.; UM, Y.; SANG, B.I. Production of medium-chain carboxylic acids by *Megasphaera sp.* MH with supplemental electron acceptors. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2016.

JIANG, W.; WANG, S.; WANG, Y.; FANG, B. Key enzymes catalyzing glycerol to 1,3-propanediol. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 1–19, 2016.

JOHNSON, E. E.; REHMANN, L. The role of 1,3-propanediol production in fermentation of glycerol by *Clostridium pasteurianum*. **Bioresource Technology**, v. 209, p. 1–7, 2016.

JUN, S.A.; MOON, C.; KANG, C.H.; KONG, S.W.; SANG, B.I.; UM, Y. Microbial fed-batch production of 1,3-propanediol using raw glycerol with suspended and immobilized *Klebsiella pneumoniae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, n. 1–8, p. 491–501, 2010.

KAUR, G.; SRIVASTAVA, A. K.; CHAND, S. Advances in biotechnological production of 1,3-propanediol. **Biochemical Engineering Journal**, v. 64, p. 106–118, 2012.

KENEALY, W. R.; CAO, Y.; WEIMER, P. J. Production of caproic acid by cocultures of ruminal cellulolytic bacteria and *Clostridium kluyveri* grown on cellulose and ethanol. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 44, n. 3–4, p. 507–513, dez. 1995.

KERTÉSZ, R.; SCHLOSSER, Š. Design and simulation of two phase hollow fiber contactors for simultaneous membrane based solvent extraction and stripping of organic acids and bases. **Separation and Purification Technology**, v. 41, n. 3, p. 275–287, 2005.

KLINDWORTH, A.; PRUESSE, E.; SCHWEER, T.; PEPLIES, J.; QUAST, C.; HORN, M.; GLÖCKNER, F.O. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 1, p. 1–11, 2013.

KUCEK, L. A.; NGUYEN, M.; ANGENENT, L. T. Conversion of L-lactate into n-caproate by a continuously fed reactor microbiome. **Water Research**, v. 93, p. 163–171, 2016.

KUCEK, L. A.; SPIRITO, C. M.; ANGENENT, L. T. High n-caprylate productivities and specificities from dilute ethanol and acetate: chain elongation with microbiomes to upgrade products from syngas fermentation. **Energy & Environmental Science**, v. 9, n. 3, p. 3482–3494, 2016.

KUCEK, L.A.; XU, J.; NGUYEN, M.; ANGENENT, L.T. Waste conversion into n-caprylate and n-caproate: Resource recovery from wine lees using anaerobic reactor microbiomes and in-line extraction. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1–14, 2016.

KUCZMAN, O.; TAVARES, M.H.F.; GOMES, S.D.; GUEDES, L.P.C.; GRISOTTI, G. Effects of stirring on cassava effluent treatment in an anaerobic horizontal tubular pilot reactor with support medium – A Review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 77, n. February 2016, p. 984–989, 2017.

KUMAR, V.V.; NARESH, G.; DEEPA, S.; BHAVANI, P.G.; NAGARAJU, M.; SUDHAKAR, M.; CHARY, K.V.R.; VENUGOPAL, A.; KUMAR, V.V.; NARESH, G.; TARDIO, J.; BHARGAVA, S.K. Influence of W on the reduction behaviour and Brønsted acidity of Ni/TiO₂ catalyst in the hydrogenation of levulinic acid to valeric acid: Pyridine adsorbed DRIFTS study. **Applied Catalysis A: General**, v. 531, p. 169–176, 2017.

KURIAN, J.V. A new polymer platform for the future - Sorona[®] from corn derived 1,3-propanediol. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 13, n. 2, p. 159–167, 2005.

LEE CHANG, K.J.; PAUL, H.; NICHOLS, P.D.; KOUTOULIS, A.; BLACKBURN, S.I. *Australian thraustochytrids*: Potential production of dietary long-chain omega-3 oils using crude glycerol. **Journal of Functional Foods**, v. 19, p. 810–820, 2015.

LEE, J.H.; JUNG, M.Y.; OH, M.K. High-yield production of 1,3-propanediol from glycerol by metabolically engineered *Klebsiella pneumoniae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 1–13, 2018.

LEE, S.J.; LEE, J.H.; YANG, X.; YOO, H.Y.; HAN, S.O.; PARK, C.; KIM, S.W. Re-utilization of waste glycerol for continuous production of bioethanol by immobilized *Enterobacter aerogenes*. **Journal of Cleaner Production**, v. 161, p. 757–764, 2017.

LENG, L.; YANG, P.; MAO, Y.; WU, Z.; ZHANG, T.; LEE, P.H. Thermodynamic and physiological study of caproate and 1,3-propanediol co-production through glycerol fermentation and fatty acids chain elongation. **Water Research**, v. 114, p. 200–209, 2017.

LENG, L., NOBU, M.K., NARIHIRO, T., YANG, P., TAN, G.A., LEE, P. Shaping Microbial Consortia in Coupling Glycerol Fermentation and Carboxylate Chain Elongation for Co-production of 1,3-Propanediol and Caproate: Pathways and Mechanisms. **Water Research**, v. 148, p. 281–291, 2019.

LONKAR, S.; FU, Z.; HOLTZAPPLE, M. Optimum alcohol concentration for chain elongation in mixed-culture fermentation of cellulosic substrate. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 113, n. 12, p. 2597–2604, 2016.

LÓPEZ-GARZÓN, C.S.; STRAATHOF, A.J.J. Recovery of carboxylic acids produced by fermentation. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 5, p. 873–904, 2014.

LUERS, F.; SEYFRIED, M.; DANIEL, R.; GOTTSCHALK, G. Glycerol conversion to 1,3-propanediol by *Clostridium pasteurianum*: cloning and expression of the gene encoding 1,3-propanediol dehydrogenase. **FEMS Microbiology Letters**, v. 154, p. 337–345, 1997.

MA, F.; HANNA, M. A. Biodiesel production: a review. **Bioresource Technology**, v. 70, p. 1-15, 1999.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Brock - Microbiología de los microorganismos**. 10 ed. Prentice Hall, 2008. 608 p.

MARCHANDIN, H.; JUVONEN, R.; HAIKARA, A. **Megasphaera**. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed., Vol. Three: The Firmicutes. De Vos, P., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K-H., Whitman, W. (eds). Springer, 2009. p. 1082-1090.

MAROUNEK, M.; FLIEGROVA, K.; BARTOS, S. Metabolism and some characteristics of ruminal strains of *Megasphaera elsdenii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 6, p. 1570–1573, 1989.

MENDES, F.S.; GONZÁLEZ-PAJUELO, M.; CORDIER, H.; FRANÇOIS, J.M.; VASCONCELOS, I. 1,3-Propanediol production in a two-step process fermentation from renewable feedstock. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, n. 3, p. 519–527, 2011.

MONTEIRO, M.R.; KUGELMEIER, C.L.; PINHEIRO, R.S.; BATALLA, M.O.; DA SILVA CÉSAR, A. Glycerol from biodiesel production: Technological paths for sustainability. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 88, p. 109–122, 2018.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. D. N. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. **Revista processos químicos/SENAI**, v. 3, n. 5, p. 9–23, 2009.

MORAES, L.S.; KRONEMBERGER, F.A.; FERRAZ, H.C.; HABERT, A.C. Liquid-liquid extraction of succinic acid using a hollow fiber membrane contactor. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 21, p. 206–211, 2015.

MOSCOVIZ, R.; TRABLY, E.; BERNET, N. Consistent 1,3-propanediol production from glycerol in mixed culture fermentation over a wide range of pH. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2016.

MOTA, C.J.A.; SILVA, C.X.A.; GONÇALVES, V.L.C. Glicerquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. **Química Nova**, v. 32, 3, p. 639-648, 2009.

NAKAGAWA, Y.; TOMISHIGE, K. Catalyst development for the hydrogenolysis of biomass-derived chemicals to value-added ones. **Catalysis Surveys from Asia**, v. 15, n. 2, p. 111-116, 2011.

NAKAZAWA, M. M. **Aproveitamento de glicerol para a produção de biogás ou 1,3-propanodiol em reator UASB**. Tese de doutorado. Recife, PE: Universidade Federal de Pernambuco, 2015. 103p.

NAKAZAWA, M.M.; FLORENCIO, L.; KATO, M.T.; GAVAZZA, S.; SANZ, J.L. Effects of the operational conditions on the production of 1,3-propanediol derived from glycerol in anaerobic granular sludge reactors. **Water Science and Technology**, v. 75, p. 963–970, 2017.

NG, J.H.; LEONG, S.K.; LAM, S.S.; ANI, F.N.; CHONG, C.T. Microwave-assisted and carbonaceous catalytic pyrolysis of crude glycerol from biodiesel waste for energy production. **Energy Conversion and Management**, v. 143, p. 399–409, 2017.

OECD/FAO. **OECD-FAO Agricultural Outlook 2017-2026**. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i7465e.pdf>> Acesso: 15 junho 2018.

OKASANEN, A.J.; BLANCHET, F.G.; FRIENDLY, M.; KINDT, R.; LEGENDRE, P.; MCGLINN, D.; MINCHIN, P.R.; HARA, R.B.O.; SIMPSON, G.L.; SOLYMOS, P.; STEVENS, M.H.H.; SZOECS, E. **Package ‘vegan’ (Version 2.4-0)**. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/index.html>> Acesso: 1 jul 2017.

PAES, F.C.; KANDA, L.R.S.; VOLL, F.A.P.; CORAZZA, M.L. Liquid-liquid equilibrium of ternary systems comprising ethyl valerate (1), water (2), ethanol (3) and valeric acid (4). **Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 111, p. 185–190, 2017.

PECES, M.; ASTALS, S.; JENSEN, P.D.; CLARKE, W.P. Deterministic mechanisms define the long-term anaerobic digestion microbiome and its functionality regardless of the initial microbial community. **Water Research**, 2018.

PFLÜGL, S.; MARX, H.; MATTANOVICH, D.; SAUER, M. Heading for an economic industrial upgrading of crude glycerol from biodiesel production to 1,3-propanediol by *Lactobacillus diolivorans*. **Bioresource Technology**, v. 152, p. 499–504, 2014.

PRZYSTAŁOWSKA, H.; ZEYLAND, J.; SZYMANOWSKA-POWAŁOWSKA, D.; SZALATA, M.; SŁOMSKI, R.; LIPIŃSKI, D. 1,3-Propanediol production by new recombinant *Escherichia coli* containing genes from pathogenic bacteria. **Microbiological Research**, v. 171, p. 1–7, 2015.

RICCI, M.A.; RUSSO, A.; PISANO, I.; PALMIERI, L.; DE ANGELIS, M.; AGRIMI, G. Improved 1,3-propanediol synthesis from glycerol by the robust *Lactobacillus reuteri* strain DSM 20016. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 6, p. 893–902, 2015.

RITTMANN, B. E. Biofilms, active substrata, and me. **Water Research**, v. 132, p. 135–145, 2018.

SÁ, L.R.V.; CAMMAROTA, M.C.; OLIVEIRA, T.C.; OLIVEIRA, E.M.M.; MATOS, A.; FERREIRA-LEITÃO, V.S. Pentoses, hexoses and glycerin as substrates for biohydrogen

production: An approach for Brazilian biofuel integration. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 7, p. 2986–2997, 2013.

SADHUKHAN, S.; VILLA, R.; SARKAR, U. Microbial production of succinic acid using crude and purified glycerol from a *Crotalaria juncea* based biorefinery. **Biotechnology Reports**, v. 10, p. 84–93, 2016.

SANZ, J. L.; KÖCHLING, T. Molecular biology techniques used in wastewater treatment: An overview. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 2, p. 119–133, 2007.

SANZ, J.L.; ROJAS, P.; MORATO, A.; MENDEZ, L.; BALLESTEROS, M.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C. Microbial communities of biomethanization digesters fed with raw and heat pre-treated microalgae biomasses. **Chemosphere**, v. 168, p. 1013–1021, 2017.

SARMA, S.J.; BRAR, S.K.; LE BIHAN, Y.; BUELNA, G. Bio-hydrogen production by biodiesel-derived crude glycerol bioconversion: A techno-economic evaluation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 36, p. 1–10, 2013.

SAXENA, R.K.; ANAND, P.; SARAN, S.; ISAR, J. Microbial production of 1,3-propanediol: Recent developments and emerging opportunities. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 6, p. 895–913, 2009.

SCHAEFER, R. Técnicas em biologia molecular. **Embrapa Suínos e Aves**, p. 24, 2006.

SCHLOSS, P.D.; WESTCOTT, S.L.; RYABIN, T.; HALL, J.R.; HARTMANN, M.; HOLLISTER, E.B.; LESNIEWSKI, R.A.; OAKLEY, B.B.; PARKS, D.H.; ROBINSON, C.J.; SAHL, J.W.; STRES, B.; THALLINGER, G.G.; VAN HORN, D.J.; WEBER, C.F. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 23, p. 7537–7541, 2009.

SCHLOSSER, Š.; KERTÉSZ, R.; MARTÁK, J. Recovery and separation of organic acids by membrane-based solvent extraction and pertraction: An overview with a case study on recovery of MPCA. **Separation and Purification Technology**, v. 41, n. 3, p. 237–266, 2005.

SEEDORF, H.; FRICKE, W.F.; VEITH, B.; BRUGGEMANN, H.; LIESEGANG, H.; STRITTMATTER, A.; MIETHKE, M.; BUCKEL, W.; HINDERBERGER, J.; LI, F.; HAGEMEI, C.; THAUER, R.K.; GOTTSCHALK, G. The genome of *Clostridium kluyveri*, a strict anaerobe with unique metabolic features. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 6, p. 2128–2133, 2008.

SEIFERT, K.; WALIGORSKA, M.; WOJTOWSKI, M.; LANIECKI, M. Hydrogen generation from glycerol in batch fermentation process. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 9, p. 3671–3678, 2009.

SILVA, G.P.; CONTIERO, J.; ÁVILA NETO, P.M.; LIMA, C.J.B. 1,3-Propanediol:

production, applications and biotechnological potential. **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 527–534, 2014.

SILVA, G.P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 30 – 39, 2009.

SITTIJUNDA, S.; REUNGSANG, A. Biohydrogen production from waste glycerol and sludge by anaerobic mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 18, p. 13789-13796, 2012.

SIVASANKARAN, C.; GOVINDARAJ, K.; MANI, J. Bio-conversion of glycerol into commercial production of 1,3-propanediol - A review. **Journal of Environmental Biology**, v. 37, p. 1539–1543, 2016.

SOUZA, E.A.; ROSSI, D.M.; AYUB, M.A.Z. Bioconversion of residual glycerol from biodiesel synthesis into 1,3-propanediol using immobilized cells of *Klebsiella pneumoniae* BLh-1. **Renewable Energy**, v. 72, p. 253–257, 2014.

SPIRITO, C.M.; RICHTER, H.; RABAEY, K.; STAMS, A.J.M.; ANGENENT, L.T. Chain elongation in anaerobic reactor microbiomes to recover resources from waste. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 27, p. 115-122, 2014.

STEINBUSCH, K.J.J.; HAMELERS, H.V.M.; PLUGGE, C.M.; BUISMAN, C.J.N. Biological formation of caproate and caprylate from acetate: Fuel and chemical production from low grade biomass. **Energy and Environmental Science**, v. 4, n. 1, p. 216–224, 2011.

TEMUDO, M.F.; MUYZER, G.; KLEEREBEZEM, R.; VAN LOOSDRECHT, M.C.M. Diversity of microbial communities in open mixed culture fermentations: Impact of the pH and carbon source. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, n. 6, p. 1121–1130, 2008b.

TEMUDO, M.F.; POLDERMANS, R.; KLEEREBEZEM, R.; VAN LOOSDRECHT, M.C.M. Glycerol fermentation by (open) mixed cultures: A chemostat study. **Biotechnology and Bioengineering**, v.100, n 6, p. 1088-1098, 2008a.

THAUER, R. K.; JUNGERMANN, K.; DECKER, K. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. **Bacteriological Reviews**, v. 41, n. 1, p. 100–180, 1977.

THAUER, R.K.; JUNGERMANN, K.; HENNINGER, H.; WENNING, J.; DECKER, K. The energy metabolism of *Clostridium kluyveri*. **European Journal of Biochemistry**, v. 4, p. 173–180, 1968.

TOMASZEWSKA, L.; RYWIŃSKA, A.; RYMOWICZ, W. High selectivity of erythritol production from glycerol by *Yarrowia lipolytica*. **Biomass and Bioenergy**, v. 64, p. 309–320, 2014.

TSAL, W. T.; LEE, M. K.; CHANG, Y. M. Fast pyrolysis of rice straw, sugarcane bagasse and coconut shell in an induction-heating reactor. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 76, n. 1–2, p. 230–237, 2006.

TYAGI, V. K.; LO, S. L. Sludge: A waste or renewable source of energy and resources recovery? **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 25, p. 708–728, 2013.

UPRETY, B.K.; REDDY, J.V.; DALLI, S.S.; RAKSHIT, S.K. Utilization of microbial oil obtained from crude glycerol for the production of polyol and its subsequent conversion to polyurethane foams. **Bioresource Technology**, v. 235, p. 309–315, 2017.

VAN GELDER, A.H.; SOUSA, D.Z.; RIJPSTRA, W.I.C.; DAMSTE, J.S.S.; STAMS, A.J.M.; SANCHEZ-ANDREA, I. *Ercella succinigenes* gen. nov., sp nov., an anaerobic succinate-producing bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p.2449–2454. 2014.

VAN HAANDEL, A.; VAN DER LUBBE, J. (2011) **Handbook biological wastewater treatment: design and optimization of activated sludge systems**. 1. ed. Leidschendam: Quist, Netherlands.

VARRONE, C.; FLORIOTIS, G.; HEGGESET, T.M.B.; LE, S.B.; MARKUSSEN, S.; SKIADAS, I. V.; GAVALA, H.N. Continuous fermentation and kinetic experiments for the conversion of crude glycerol derived from second-generation biodiesel into 1,3 propanediol and butyric acid. **Biochemical Engineering Journal**, v. 128, p.149–161, 2017.

VARRONE, C.; GIUSSANI, B.; IZZO, G.; MASSINI, G.; MARONE, A.; SIGNORINI, A.; WANG, A. Statistical optimization of biohydrogen and ethanol production from crude glycerol by microbial mixed culture. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 21, p. 16479–16488, 2012.

VARRONE, C.; ROSA, S.; FIOCCHETTI, F.; GIUSSANI, B.; IZZO, G.; MASSINI, G.; MARONE, A.; SIGNORINI, A.; WANG, A. Enrichment of activated sludge for enhanced hydrogen production from crude glycerol. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 3, p. 1319–1331, 2013.

VASUDEVAN, D.; RICHTER, H.; ANGENENT, L. T. Upgrading dilute ethanol from syngas fermentation to n-caproate with reactor microbiomes. **Bioresource Technology**, v. 151, p. 378–382, 2014.

VIANA, M.B. **Digestão anaeróbia do glicerol oriundo da produção do biodiesel: alternativas para geração de energia e produtos de alto valor agregado**. Tese de doutorado. Fortaleza, CE: Universidade Federal do Ceará, 2016, 157 p.

VIANA, M.B.; FREITAS, A V; LEITÃO, R.C.; SANTAELLA, S.T. Biodegradability and methane production potential of glycerol generated by biodiesel industry. **Water Science and Technology**, v. 66, p. 2217–22, 2012.

VIANA, Q.M.; VIANA, M.B.; VASCONCELOS, E.A.F.; SANTAELLA, S.T.; LEITÃO, R.C. Fermentative H₂ production from residual glycerol: A review. **Biotechnology Letters**, v. 36, n. 7, p. 1381–1390, 2014

VIKROMVARASIRI, N.; LAOTHANACHAREON, T.; CHAMPREDA, V.; PISUTPAISAL, N. Bioethanol production from glycerol by mixed culture system. **Energy Procedia**, v. 61, p.1213–1218, 2014.

VIVEK, N.; PANDEY, A.; BINOD, P. Biological valorization of pure and crude glycerol into 1,3-propanediol using a novel isolate *Lactobacillus brevis* N1E9.3.3. **Bioresource Technology**, v. 213, p. 222–230, 2016a.

VIVEK, N.; PANDEY, A.; BINOD, P. **Production and applications of 1,3-propanediol**. Current developments in biotechnology and bioengineering: Production, isolation and purification of industrial products, p. 719–738, 2016b.

WASEWAR, K. L. Reactive extraction: An intensifying approach for carboxylic acid separation. **International Journal of Chemical Engineering and Applications**, v. 3, n. 4, p. 249–255, 2012.

WEIMER, P. J.; NERDAHL, M.; BRANDL, D. J. Production of medium-chain volatile fatty acids by mixed ruminal microorganisms is enhanced by ethanol in co-culture with *Clostridium kluyveri*. **Bioresource Technology**, v. 175, p. 97–101, 2015.

WEIMER, P. J.; STEVENSON, D. M. Isolation, characterization, and quantification of *Clostridium kluyveri* from the bovine rumen. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 94, n. 2, p. 461–466, 2012.

WERKMAN, C. H.; GILLEN, G. F. Bacteria producing trimethylene glycol. **Journal of Bacteriology**, v. 23, n. 2, p. 167–182, 1932.

WISCHRAL, D.; ZHANG, J.; CHENG, C.; LIN, M.; SOUZA, L.M.G.; PESSOA, F.L.P.; PEREIRA, N.; YANG, S.T. Production of 1,3-propanediol by *Clostridium beijerinckii* DSM 791 from crude glycerol and corn steep liquor: Process optimization and metabolic engineering. **Bioresource Technology**, v. 212, p. 100–110, 2016.

WOESE, C. Bacterial evolution background. **Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 221–271, 1987.

WOESE, C. R.; FOX, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 11, p. 5088–5090, 1977.

WU, Z.; ZHANG, M.; YAO, Y.; WANG, J.; WANG, D.; ZHANG, M.; LI, Y. One-pot catalytic production of 1,3-propanediol and γ -valerolactone from glycerol and levulinic acid. **Catalysis Today**, v. 302, p. 217–226, 2018.

XU, J., HAO, J., GUZMAN, J.J.L., SPIRITO, C.M., HARROFF, L.A., ANGENENT, L.T. Temperature-phased conversion of acid whey waste into medium-chain carboxylic acids via lactic acid: No external e-donor. **Joule**, p. 1–16, 2017.

YADAV, S.; RAWAT, G.; TRIPATHI, P.; SAXENA, R.K. A novel approach for biobutanol production by *Clostridium acetobutylicum* using glycerol: A low cost substrate. **Renewable Energy**, v. 71, p. 37–42, 2014.

YANG, M.; YUN, J.; ZHANG, H.; MAGOCHA, T.A.; ZABED, H.; XUE, Y.; FOKUM, E.; SUN, W.; QI, X. Genetically engineered strains: Application and advances for 1,3-Propanediol production from glycerol. **Food Technology and Biotechnology**, v. 56 (1), p. 3–15, 2018.

YANG, X.; KIM, D.S.; CHOI, H.S.; KIM, C.K.; THAPA, L.P.; PARK, C.; KIM, S.W. Repeated batch production of 1,3-propanediol from biodiesel derived waste glycerol by *Klebsiella pneumoniae*. **Chemical Engineering Journal**, v. 314, p. 660–669, 2017.

ZENG, A. P. Pathway and kinetic analysis of 1,3-propanediol production from glycerol fermentation by *Clostridium butyricum*. **Bioprocess Engineering**, v. 14, n. 4, p. 169–175, 1996.

ZENG, A. P.; SABRA, W. Microbial production of diols as platform chemicals: Recent progresses. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 6, p. 749–757, 2011.

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

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

ZHANG, H.; DU, R.; CAO, S.; WANG, S.; PENG, Y. Mechanisms and characteristics of biofilm formation via novel DEAMOX system based on sequencing biofilm batch reactor. **Journal of Bioscience and Bioengineering (In press)**, p. 1–7, 2018.

ZHANG, W.; WERNER, J.J.; AGLER, M.T.; ANGENENT, L.T. Substrate type drives variation in reactor microbiomes of anaerobic digesters. **Bioresource Technology**, v. 151, p. 397–401, 2014.

ZHAO, Y. N.; CHEN, G.; YAO, S. J. Microbial production of 1,3-propanediol from glycerol by encapsulated *Klebsiella pneumoniae*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 32, n. 2, p. 93–99, 2006.

ZHOU, C. H.; BELTRAMINI, J. N.; FAN, Y. X.; LU, G. Q. Chemoselective catalytic conversion of glycerol as a biorenewable source to valuable commodity chemicals. **Chemical Society Reviews**, v. 37, n. 3, p. 527-549, 2008.

ZINDER, S.H. (1993). **Physiological ecology of methanogenesis**. *In*: Methanogenesis: Ecology, Physiology, Biochemistry and Genetics (Ferry, J.G., ed.). New York, Chapman and Hall, pp: 128-206.

APÉNDICE A – RESUMEN EXTENSO EN CASTELLANO

1. INTRODUCCIÓN

La creciente cantidad de residuos orgánicos, sea resultado de la actividad industrial o agrícola, así como su tratamiento y disposición, son cuestiones de debate y que precisan una pronta solución, debido a los impactos ambientales y riesgos a la salud que éstos pueden causar.

El glicerol es un residuo generado en la producción de biodiesel y se estima que se generan alrededor de 100 gramos de glicerol por cada kilo de biodiesel producido. Aunque el glicerol es ampliamente utilizado por la industria como materia prima para obtener una gama de productos, tales como cosméticos, fármacos, aditivos para combustibles, surfactantes, saborizantes, agentes gelatinizantes, solventes, lubricantes, agentes anticongelantes y polímeros; su elevada producción por la industria del biodiesel y las impurezas que contiene han generado un enorme problema medioambiental al que hay que dar una solución.

En Brasil, este residuo ha recibido especial atención debido a la creciente producción de biodiesel. La mezcla de biodiesel junto con diesel de origen fósil se inició en 2004, pero ocurrió sólo de forma experimental. Sin embargo, con la Ley nº 11.097/2005, la adición de biodiesel pasó a ser obligatoria. En 2008, el porcentaje exigido era sólo 2 % y hasta 2014 el CNPE (Consejo Nacional de Política Energética) había definido un porcentaje de 7 % para la mezcla. Con la modificación de la Ley nº 13.033/2014 por la Ley nº 13.263/2016, aún en 2018, ocurrió un aumento para 10 % (ANP, 2016).

Europa ha elegido el biodiesel (a partir de semillas de colza) como el principal combustible líquido renovable. Su producción en 2017 fue 21.119 millones de m³ (*European Biodiesel Board Statistics*, www.ebb-eu.org/stats.php). Alemania es el mayor productor (4 millones de m³), seguido de España con 3,4 millones de m³, también en el mismo año. En lo que se refiere a la producción total global, se espera un aumento desde 34 millones de m³ (producción media para los años 2014-2016) hasta 42 millones de m³ en 2026 (OECD / FAO, 2017).

Dado que la tendencia es al aumento de la producción de biodiesel, la oferta de glicerol puede ser mucho mayor que su demanda por las industrias y, por lo tanto, una parte significativa se quedará sin destino definido. Su eliminación inadecuada puede provocar daños ambientales y es un problema para la industria del biodiesel. Además, el

aprovechamiento del glicerol crudo generalmente está asociado a elevados costos de purificación, y las ventajas de su reutilización como materia prima en las industrias son cuestionables. De esta forma, desarrollar métodos que permitan la obtención de productos con mayor capacidad energética y/o mayor valor añadido en relación al material inicial, son fundamentales.

La utilización del glicerol por medio de procesos biotecnológicos ha sido considerada una alternativa potencial, ya que es posible obtener compuestos con gran interés para el mercado. Algunos trabajos han demostrado el uso de ese residuo como fuente de carbono por varios grupos de microorganismos, tanto en condiciones aerobias como anaerobias. Entre estos, destacan los procesos en condiciones anaerobias por exigir un menor costo de implantación y operación en relación a los aerobios.

Los procesos anaeróbicos para la obtención de productos con capacidad energética han sido estudiados y propuestos principalmente para la producción de metano mediante la digestión anaerobia del glicerol (VIANA *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2015). Sin embargo, también es posible obtener compuestos con mayor valor añadido y que sirva como materia prima para diversas industrias, aumentando la demanda y aprovechamiento del residuo.

Uno de los productos de valor añadido es el 1,3-propanodiol (1,3-PDO), que tiene múltiples aplicaciones: (i) en la producción de polímeros como el politereftalato de trimetileno (PTT), resultado de la reacción entre el 1,3-propanodiol y ácidos tereftálico (ZENG; BIEBL, 2002; KURIAN, 2005; ZENG; SABRA, 2011); el PTT presenta propiedades ventajosas y precio competitivo en relación al politereftalato de etileno (PET) y politereftalato de butileno (PBT) (ZENG; BIEBL, 2002); (ii) como aditivo, para mejorar las propiedades de los disolventes; (iii) en la producción de adhesivos, resinas de poliéster (de baja viscosidad), pinturas, lubricantes, anticongelantes (menor corrosión y toxicidad comparado a los derivados del etileno glicol) y cosméticos; y (iv) para producir biocidas, que generalmente se destinan a procesos de desinfección (como el tratamiento aplicado al reúso de agua) (KAUR *et al.*, 2012; SAXENA *et al.*, 2009; SUN *et al.*, 2018; ZENG; BIEBL, 2002).

Además del 1,3-propanodiol, a partir del glicerol también es posible obtener otros productos de interés como los biocombustibles hidrógeno y etanol (SITTIJUNDA; REUNGSANG, 2012; VARRONE *et al.*, 2013, 2012), así como ácidos orgánicos de cadenas cortas (ácidos acético y propiónico) y medias (ácidos butírico, valérico, caproico, etc.). Los ácidos de cadena media (valérico, capróico, enántico y caprílico) han sido destacados por las

diversas posibilidades de aplicaciones, incluyendo su uso en las industrias de combustibles (JEON *et al.*, 2016).

Teniendo en cuenta lo anterior, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar el uso de glicerol como sustrato en procesos anaerobios para producción de subproductos con valor añadido, como el ácido valérico y 1,3-propanodiol procedentes de las rutas oxidativa y reductiva, respectivamente. Para ese último, su producción fue evaluada mediante la formación de biopelículas en dos tipos de soporte. Siendo así, el estudio se dividió en tres etapas.

En la primera etapa, inicialmente la idea propuesta fue dirigir las reacciones de degradación anaeróbica del glicerol para la formación de ácido valérico. Este ácido tiene su importancia en el mercado, al utilizarse para la producción de fármacos, cosméticos, aditivos alimentarios, lubricantes y sistemas de refrigeración (sustitutos de los CFCs); así como ser destinado para la obtención de ésteres de valerato (BAHRMANN *et al.* 1997; DHANDE *et al.*, 2012). Recientemente su empleo para este fin ha recibido gran atención porque los compuestos provenientes del ácido valérico tienen aplicación directa en la industria de combustibles, pudiendo servir como agentes de mezcla tanto en gasolina como en diesel. Inicialmente se verificó que no había estudios directamente relacionados con la producción biológica de ácido valérico usando glicerol bruto como sustrato, así como ninguna publicación que describiera la extracción en línea de este compuesto. Así, con esta información, el objetivo general de la investigación hecha en esta etapa inicial fue determinar el potencial del glicerol residual para la producción biológica y extracción en línea de ácido valérico utilizando un filtro anaerobio acoplado a un sistema de membranas de fibras huecas.

Ya en la segunda etapa, el objetivo general fue evaluar la producción de 1,3-propanodiol a partir de la degradación anaeróbica de glicerol en reactores del tipo UASB en escala de laboratorio. Puesto que trabajos anteriores del grupo de investigación demostraban el deterioro en la producción de 1,3-PDO trabajando con reactores inoculados con cultivos en suspensión, se propuso la formación y uso de biopelículas en soportes de poliuretano. Por último, en la tercera etapa, con objeto de estudiar si era posible obtener mejores rendimientos, la producción de ese compuesto fue evaluada también con reactor UASB pero con formación de biopelículas en soporte de silicona. De esta manera, las dos etapas incluyeron la determinación de las mejores condiciones para maximizar la producción de 1,3-propanodiol y, también, de la diversidad microbiana inicial (extracción de ADN y secuenciación masiva) y a lo largo de las fases operativas de los biorreactores.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos se dividieron básicamente en tres partes (etapas 1 a 3), como se describe a continuación.

2.1 ETAPA 1

2.1.1 Glicerol crudo

El glicerol crudo fue suministrado por una planta industrial de biodiesel de Petrobras, ubicada en Quixadá, Ceará, Brasil, en la cual los procesos de producción se basaron en la transesterificación de aceite de soja (77 %) y sebo bovino (23 %). El residuo orgánico tenía un pH de 5,5 y su composición en peso fue de 79,1 % de glicerol, 5,3 % de ceniza, 13,6 % de humedad, 2,0 % de materia orgánica (no incluyendo glicerol) y alrededor de 1,0 kg de DQO.kg glicerol⁻¹.

2.1.2 Experimento 1: Ensayos en *batch* para evaluar el efecto de diferentes tipos de inóculo sobre la producción de ácidos de cadena media

Se probaron tres condiciones utilizando glicerol (sustrato) y etanol (donante de electrones). Para la primera prueba (T1), se utilizó un lodo adaptado a la formación de ácido caproico con fermentado de caldo de caña como sustrato (CAVALCANTE, 2016). En la segunda prueba (T2), se utilizó un lodo adaptado para el consumo de glicerol y ácidos primarios. Este inóculo también fue proveniente de un filtro anaerobio (volumen de 13 L con mismas configuraciones y dimensiones) y venía siendo utilizado en investigaciones para la conversión de glicerol y obtención de subproductos (H₂, CH₄ y ácidos de cadena media) (VIANA, 2016). Por último, se pensó una mezcla 1:1 entre los inóculos (T3).

Los experimentos en *batch* se realizaron en frascos Schott (100 mL) con un volumen útil de 60 mL y por triplicado. Se mantuvieron bajo agitación continua (120 rpm) y temperatura de 30 ± 2 °C. Cada frasco recibió un volumen de sustrato que contenía glicerol residual y etanol (10 % de la DQO referente al glicerol), siendo el valor de la DQO total igual a 16 g DQO.L⁻¹. Una cantidad de bicarbonato de sodio (NaHCO₃) equivalente a 1 g/g DQO, fue utilizada en las pruebas para mantener el pH entre 7,0 y 7,5. La relación alimento micro-

organismo fue 2:1. Para inhibir la metanogénesis, se añadió cloroformo (0,05 % v/v) (VIANA et al., 2014). La solución utilizada que contiene macro y micronutrientes está contenida en la Tabla 3.2 (Seção 3). Las pruebas de control se realizaron en los mismos frascos Schott, pero con volumen útil de 30 mL, en las mismas condiciones, pero sin sustrato. En todos los frascos, la purga de oxígeno se hizo con inyección de N₂ (100 %) durante 2 minutos. Después de eso, fueron conectados a bolsas (“gas bags”) con volumen de 1 L para almacenamiento y muestreo de los gases producidos.

2.1.3 Experimento 2: Filtro anaeróbico + sistema de extracción con membranas de fibras huecas

Un filtro anaeróbico, construido en borosilicato, de 13,1 L con diámetro de 10 cm y altura de 135 cm se mantuvo en funcionamiento en condiciones mesofílicas (30 ± 2 °C) durante 114 días. El medio de soporte consistía en piezas corrugadas de tubos de PVC con tamaño, diámetro y área específica iguales a 10 mm, 16 mm y $907 \text{ m}^2 \cdot \text{m}^{-3}$, respectivamente. El biorreactor había sido operado previamente durante tres años como un reactor acidogénico para producir hidrógeno a partir de glicerol crudo (VIANA et al., 2014).

Por lo tanto, la primera fase operativa (F1, día 0 a 59) consistió básicamente en su reactivación y adaptación; la carga orgánica aplicada fue de $4,7 \text{ g DQO} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ y el tiempo de retención hidráulica (TRH) fue de 15 d. En la segunda fase operativa (F2, días 60 a 92), el reactor fue bioaumentado con 4,2 L de lodo procedente de un reactor caprogénico alimentado con jugo de caña de azúcar fermentado ($25 \text{ g SSV} \cdot \text{L}^{-1}$) para mejorar las reacciones para elongamiento de cadena (CAVALCANTE, 2016). La carga orgánica y el TRH fueron $5,0 \text{ g DQO} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ y 14 d, respectivamente. En la fase 3 (F3, días 93 a 114), el biorreactor fue acoplado a un sistema compuesto por dos membrana de fibras huecas para extracción de los ácidos (principalmente los de cadena media) en línea. La carga y el TRH fueron $6,4 \text{ g DQO} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ y 9 d, respectivamente.

El reactor funcionó a un pH entre 5,0 y 5,3 para inhibir la actividad metanogénica utilizando un medidor automático de pH (HI1006-3205, Hanna Instruments, EUA) conectado a una bomba dosificadora (P133-398TI, LMI Milton Roy, Francia) de NaOH (0,1 % v/v). El sustrato se preparó utilizando glicerol crudo (alrededor de $46 \text{ g DQO} \cdot \text{L}^{-1}$) y agregando etanol ($\sim 7 \text{ g DQO} \cdot \text{L}^{-1}$; 15 % del DQO en glicerol) como donante de electrones para las reacciones de elongamiento de cadena (AGLER et al., 2012). Los macro y micronutrientes utilizados, así

como las tasas de producción volumétrica y las tasas de extracción (en base a DQO) se describen en la Tabla 3.2 (Sección 3). Muestras de afluente, efluente y solución alcalina del sistema de extracción en línea se recolectaron diariamente durante el período operativo para determinar la concentración de metabolitos. La producción de biogás se midió con un medidor de gas (TG05/05, Ritter, Alemania).

El sistema de extracción (extracción líquido-líquido con el uso de membrana) estaba compuesto por dos membranas de fibras huecas de polipropileno (LIQUI-CEL[®] 2.5 x 8 G420; Charlotte, EUA). El sistema de extracción en línea se hizo funcionar en dos etapas: (i) extracción de ácidos de cadena media (membrana 1) de la solución acuosa (efluente) a una solución extractiva (volumen de 0,4 L) que contenía aceite mineral y 3 % de óxido de tri-*n*-octilfosfina (TOPO), y (ii) re-extracción de los ácidos de cadena media (membrana 2) de la solución extractiva a una solución alcalina (volumen de 2 L) que contenía 0,5 M de H₃BO₃ y NaOH (50 %) para mantener el pH siempre alrededor de 9. La solución alcalina se cambió por una nueva una vez por semana. La operación de las etapas de extracción y re-extracción fue prácticamente la misma que la descrita por Kucek *et al.* (2016). El aceite mineral, la solución alcalina y el efluente del reactor se reciclaron continuamente a tasas de flujo de 6,7, 14,4 y 116,3 L.d⁻¹, respectivamente.

2.1.4 Análisis cromatográficos

Las concentraciones de metabolitos se determinaron mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC; Shimadzu, Japón) con detección del índice de refracción (RID-10A, Shimadzu, Japón) y columna Aminex HPX-87H (BIORAD, EUA). Las condiciones del método aplicadas a la temperatura del horno, flujo de la fase móvil (H₂SO₄ 5 mM) y volumen de inyección fueron 65 °C, 0,6 mL.min⁻¹ y 20 µL, respectivamente.

Las concentraciones de CH₄, H₂ y CO₂ en el biogás se midieron mediante cromatografía de gases con cromatógrafo C2V-200 micro GC (Thermo Fisher Scientific, Países Bajos), equipado con un detector de conductividad térmica y una columna capilar de acero inoxidable (10 m x 0,5 mm). Las temperaturas de operación fueron 120, 60 y 120 °C para el inyector, horno y detector, respectivamente, con argón como gas de arrastre.

2.1.5 Análisis de biología molecular

2.1.5.1 Extracción de ADN, secuenciación masiva y análisis filogenético

Las muestras de lodo fueron recogidas y almacenadas a -20 °C durante todo el período operacional: (1) del inóculo inicialmente contenido en el biorreactor (muestra S1, recogida el día 29, F1); (2) del lodo caprogénico antes de agregarse al biorreactor que fue utilizado solo con glicerol como sustrato (muestra S2, agregada el día 60, F2); (3) muestra recolectada 32 días después de mezclar los lodos y antes de activar el sistema de membrana (muestra S3, recogida el día 92, F2); y (4) durante la operación con membrana (muestra S4, recogida el día 107, F3).

Se usaron aproximadamente 500 mg de cada muestra para la extracción de ADN utilizando el kit FastDNATM SPIN para suelo y el instrumento FastPrep® (MP Biomedicals, Santa Ana, EUA). La concentración de ADN se determinó utilizando el kit de cuantificación Qubit® dsDNA BR y un fluorómetro Qubit® 2.0 (Life Technologies, EUA). La secuenciación se realizó utilizando el conjunto de cebadores 341F / 806R a partir de muestras de ADN total y mediante una plataforma MySeq V3 (2X300pb) (Illumina, EUA).

Todo el procesamiento de la secuencia se realizó en el paquete Mothur v.1.36.0 (www.mothur.org; SCHLOSS *et al.* (2009)). Se eliminaron las secuencias de menos de 150 pb y las secuencias con valores de base de baja calidad (Phred <25). Las secuencias se alinearon con la versión 123 de la base de datos de alineación de rRNA de SILVA 16S (www.arb-silva.de). Los ruidos de secuencia se eliminaron con la herramienta Pre.cluster en el paquete Mothur y las quimeras introducidas en el proceso de PCR se detectaron y eliminaron utilizando ChimeraUquime.

Las secuencias calificadas se agruparon en unidades taxonómicas operativas (OTU) definidas por un nivel de distancia del 3 % basado en la matriz de distancia y un *bootstrap* superior al 60 %. La clasificación taxonómica se realizó con la base de datos de genes de rRNA SILVA 16S (utilizando un consenso del vecino más cercano y el enfoque de Wang). Los valores de confianza inferiores al 80 % (a nivel de *phylum*) se consideraron no clasificados de acuerdo con Wang *et al.* (2007). Se realizaron análisis estadísticos y gráficos adicionales con el paquete Vegan (OKASANEN *et al.* 2010) para el programa R (<http://www.R-project.org/>).

2.2 ETAPA 2

2.2.1 Experimento 1: Inóculos y producción de 1,3-propanodiol

Estos ensayos fueron hechos para evaluar el efecto de dos tipos de inóculos (C1 y C2) y una mezcla (1:1) de los mismos (C3) sobre la producción de 1,3-propanodiol. Para preparar los cultivos de enriquecimiento se utilizaron botellas de borosilicato (volumen total = 100 mL) con 50 mL (volumen útil) de sustrato (glicerol puro, 15 g.L⁻¹), nutrientes (FLORENCIO *et al.*, 1993; VARRONE *et al.*, 2013), bicarbonato de sodio (1g/g de DQO de glicerol) y pH igual a 7,5.

Estos botellas fueron selladas, autoclavadas (120 °C por 20 min) y, eliminando el oxígeno del espacio de cabeza mediante una mezcla de N₂ (80 %) y CO₂ (20 %). Cada ensayo fue hecho triplicado y tuvieron una duración de 3-4 días. Tras seleccionar los dos mejores cultivos, los ensayos fueron repetidos en las mismas condiciones pero ahora con glicerol crudo.

2.2.2 Experimento 2: Formación de biopelícula en los soportes de poliuretano

Para la formación de biopelículas en los soportes de espumas de poliuretano, el primer paso fue cortar las espumas en cubos con tamaños de 1 cm. A continuación, se lavaron tres veces con agua y autoclavados. Después de eso, se colocaron en dos botellas de borosilicato con volumen total de 1 L y volumen útil igual a 0,7 L conteniendo sustrato y nutrientes en las mismas concentraciones e condiciones de los ensayos anteriores.

Estas botellas fueron nuevamente autoclavadas siendo mantenidas así por 10 días para favorecer el acumulo o deposición de los componentes nutricionales en las fibras del material. Una de las botellas fue inoculada con C1 y la otra con C2. Cada tres días se vaciaron y rápidamente (para evitar contacto prolongado con oxígeno) recibieron una solución autoclavada de sustrato-nutrientes. El procedimiento se repitió dos veces. Después de eso, cada 3 días el efluente era cambiado por una nueva solución de alimentación pero sin recibir los cultivos, para comprobar por medio de concentración de los productos de degradación obtenidos, si los microorganismos estaban fijados en los soportes. Este proceso se repitió tres veces.

2.2.3 Experimento 3: Reactores + soportes de poliuretano con biopelícula

Las botellas con las espumas de poliuretano se utilizaron para inocular dos reactores UASB en escala de laboratorio con 717 mL de volumen útil, llamados R1 (esponjas + cultivo C1) y R2 (esponjas + cultivo C2). Los dos reactores estaban hechos de metacrilato y poseían las mismas dimensiones.

El flujo, el tiempo de retención hidráulico (TRH), la carga, la concentración de metabolitos (por cromatografía líquida de alto rendimiento) y el pH se monitorizaron diariamente. El R1 fue alimentado con glicerol puro durante 95 días. Ya para el R2, en los 102 primeros días de operación (fase F1) se utilizó glicerol puro, mientras que en los días restantes (hasta 165 días), se alimentó con glicerol crudo (fase F2).

Las condiciones operacionales iniciales TRH, COV, pH afluente y efluente aplicadas en R1 fueron $3,0 \pm 0,4$ días, $6,5 \pm 0,8$ g gli.L⁻¹.d⁻¹, 7,5 y $6,8 \pm 0,1$, respectivamente; siendo la carga aumentada hasta $11,5 \pm 0,5$ g gli.L⁻¹.d⁻¹. El reactor R2 funcionó a principio con TRH, COV, pH afluente y pH efluente de $3,0 \pm 0,1$ días, $7,2 \pm 0,2$ g gli.L⁻¹.d⁻¹, 7,5 e $6,5 \pm 0,3$, respectivamente.

2.2.4 Ecología y morfología microbiana: Reactor R2

Para caracterización de la diversidad microbiana, se tomaron muestras del inóculo (C2) y al final de la operación, día 165, tanto de la biomasa en suspensión y como fija en los soportes. El ADN total se extrajo utilizando el kit FastDNATM SPIN para suelo y el instrumento FastPrep[®] (MP Biomedicals, EUA). La secuenciación masiva (Illumina) y análisis filogenética se realizaron de la misma forma como se describió durante la etapa 1. Además, la morfología de las muestras de C2 y final de R2 (biomasa fijada) fueron debidamente preparadas y analizadas por microscopía electrónica de barrido (MEB) en el Servicio Interdepartamental de Investigación (SIIdI – UAM, España).

2.2.5 Determinación de metabolitos

Las concentraciones de metabolitos fueron determinadas por HPLC (1200 Infinity Series, Agilent Technologies, Japón), con cromatógrafo equipado con detector de índice de refracción (RID) y columna MetaCarb 67H 300 x 6,5 mm (Agilent Technologies, Japón). Las

condiciones aplicadas para la temperatura, flujo de fase móvil (H_2SO_4 , 0,01N) y volumen de inyección fueron 40 °C (columna y detector RID), $0,65 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ y $20 \text{ } \mu\text{L}$, respectivamente.

2.3 ETAPA 3

2.3.1 Experimento 1: Formación de biopelícula en soporte de silicona

Mediante estudios previos, se había observado que el cultivo C1 se pegaba bien en tubos de silicona, por lo que fue elegido como inóculo de este tipo de soporte. Para la formación de la biopelícula en este segundo soporte, se utilizó una manguera de silicona (Carl Roth®, Alemania) con grosor, diámetro interno y longitud iguales a 1,5 mm, 4 mm y 2,85 m (respectivamente).

Alrededor de $0,3 \text{ L} \cdot \text{d}^{-1}$ de una solución conteniendo sustrato, nutrientes y el cultivo fue bombeada, utilizando una bomba peristáltica, por una manguera de silicona durante cuatro semanas. Las muestras se recogieron cada tres días en la salida de la manguera y se analizaron mediante cromatografía líquida para determinar la concentración de metabolitos. Para confirmar el desarrollo del cultivo mixto dentro de la misma, se repitieron todos los procedimientos pero sin micro-organismos, solo con sustrato y nutrientes, durante una semana más.

2.3.2 Experimento 2: Reactor + soporte de silicona con biopelícula

La manguera de silicona con la biomasa desarrollada en la pared interna se transfirió y se dispuso en un formato espiral dentro de reactor UASB (R3) con volumen útil de 762 mL (conectado a su entrada). El flujo, el tiempo de retención hidráulico (TRH), la carga, la concentración de metabolitos (por cromatografía líquida de alto rendimiento) y el pH se monitorizaron diariamente. En los 102 primeros días de operación (fase F1) fue utilizado glicerol puro mientras que en los días restantes (hasta 155 días), el glicerol crudo (fase F2).

Inicialmente este reactor funcionó con TRH, COV, pH afluente e pH efluente, cercanos a $4 \pm 1,7$ días, $6 \pm 1,9 \text{ g gli} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 7,5 e $6,3 \pm 0,1$. Posteriormente la COV fue aumentada hasta valores cercanos a $22 \text{ g gli} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ durante la fase F1. Después, para la fase F2, la carga se redujo a la mitad y, a continuación, se incrementó paulatinamente hasta $20 \text{ g gli} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$.

2.3.3 Ecología y morfología microbiana: Reactor R3

Para la caracterización de la diversidad microbiana, se tomaron muestras del inóculo (C1) y del reactor los días 76 (F1) y 155 (F2), tanto de la biomasa en suspensión como de la contenida en la parte interna del soporte. El ADN total fue extraído utilizando el kit FastDNATM SPIN para suelo y el instrumento FastPrep[®] (MP Biomedicals, EUA). La secuenciación masiva (Illumina) y el análisis filogenética se realizaron de la misma forma como se describió durante la etapa 1.

Además, la morfología de las muestras de C1 y de la biomasa en suspensión y fijada relativa a la última fase de operación (F2), fueron debidamente preparadas y analizadas por microscopía electrónica de barrido (MEB) en el Servicio Interdepartamental de Investigación (SIdI – UAM, España).

2.3.4 Determinación de metabolitos

Las concentraciones de metabolitos fueron determinadas por HPLC, según se describió en la Etapa 2.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 ETAPA 1

3.1.1 Experimentos 1 y 2

Los resultados con los inóculos mostraron que la mezcla entre el lodo del biorreactor caprogénico y lo del biorreactor adaptado para el consumo de glicerol y producción de ácidos (principalmente primarios), podría favorecer la producción de compuestos con cadena media. En virtud de ello, la adición de parte del lodo caprogénico fue hecha durante la fase F2 de operación del filtro anaerobio.

Durante la F1 (reactivación/ adaptación) del filtro anaeróbico, se observó que los principales ácidos de cadena corta y media producidos fueron propionato y valerato, respectivamente. Además, no había consumo total de etanol, pudiendo indicar que la formación de los productos de elongamiento podría mejorarse si se consumía totalmente.

De esta manera, después de la adición del lodo caprogénico (en F2), no se detectó etanol en el efluente, sugiriendo que la cantidad agregada en la alimentación y la pequeña cantidad producida por fermentación, fueron consumidas. En cambio, durante ese período, se observaron mayores productividades para butirato y caproato comparadas a las de F1, siendo atribuido principalmente a la actividad de microorganismos presentes inicialmente en el lodo caprogénico (adaptado para producción de butirato y caproato a partir de fermentado de caldo de caldo de la caña, CAVALCANTE, 2016). Además, estos microorganismos también pueden haber sido responsables de la mayor producción de 1,3-PDO en este mismo período, ya que muchos de estos (principalmente varias especies de *Clostridium*) pueden generar productos mediante las dos vías de conversión del glicerol (SAXENA *et al.*, 2009; SUN *et al.*, 2018).

La mayor producción de valerato ciertamente estaba relacionada a la mayor disponibilidad de propionato. En este caso, la microbiota probablemente siguió el camino más favorable energéticamente para mantener el funcionamiento del sistema, eligiendo, por lo tanto, el camino para la producción de productos de elongación con cadena impar. Estudios como los de Bornstein y Barker (1948), mostraron que microorganismos involucrados en la formación de productos de elongación con cadenas pares también pueden formar compuestos con cadenas impares. A partir de un cultivo de *Clostridium kluyveri* y usando una mezcla entre etanol (donante de electrones) y acetato, obtuvieron principalmente caproato. Mientras que con el mismo cultivo, al utilizar etanol y propionato, el principal compuesto de cadena media producida fue el valerato.

El uso del sistema de membranas para extracción continua de los ácidos producidos (principalmente los de cadena media, debido al uso del TOPO), posiblemente influyó el sentido de las reacciones, favoreciendo la producción de los ácidos (ruta oxidativa) y perjudicando la producción de 1,3-PDO (ruta reductiva). Esta disminución significativa en la producción de 1,3-PDO (de 0,52 a 0,29 g DQO.L⁻¹.d⁻¹) es bastante interesante cuando el objetivo principal es la conversión del glicerol en subproductos de la vía oxidativa. Con eso, durante la F3, la productividad de propionato aumentó, respecto a la F2, de 0,63 a 1,75 g DQO.L⁻¹.d⁻¹ y la de valerato de 0,86 a 1,81 g DQO.L⁻¹.d⁻¹.

En general, las tasas de extracción de valerato presentaron valores entre 5 y 20 g DQO.m⁻².d⁻¹, con valores medio y máximo de 12,9 y 30 g DQO.m⁻².d⁻¹, respectivamente. Este valor máximo fue mayor que muchos reportados sobre la producción y extracción de caproato usando el mismo sistema de extracción. En la literatura, se encuentran tasas de extracción

entre 1 y 20 g DQO.m⁻².d⁻¹ con relaciones área de membrana/ volumen útil (A/V) entre 311 y 2000 (GE *et al.*, 2015; KUCEK *et al.*, 2016; KUCEK; NGUYEN; ANGENENT, 2016; KUCEK; SPIRITO; ANGENENT, 2016), que son mayores al utilizado en el presente estudio (A/V = 109). Esta comparación entre los datos de extracción para valerato (presente estudio) y caproato (literatura) fue hecha debido la ausencia de datos para la extracción de valerato, y también, porque hasta ahora el caproato ha sido el ácido de cadena media más estudiado.

Para evitar oscilaciones en la tasa de extracción, es importante mantener el buen funcionamiento del sistema, evitando (i) la acumulación de biomasa en el sistema de filtros (antes de las membranas), para que no haya formación de biogás dentro de las líneas (tuberías); (ii) que el pH da solución alcalina quede por debajo de 9, pues de esta forma, la separación de los ácidos de la fase orgánica a la acuosa podría ser desfavorecida.

Es importante destacar también que la obstrucción del sistema de filtros y la acumulación de gas en las conducciones también pueden haber perjudicado el proceso de extracción y resultado en las oscilaciones observadas para la tasa de extracción. Debido a ello, incluso por cortos intervalos de tiempo, a menudo el funcionamiento del sistema de membranas tuvo que ser interrumpido para el mantenimiento. Otro punto que necesita ser mejor analizado en trabajos futuros es la afinidad entre el TOPO y el valerato. Este agente extractor ha sido utilizado en procesos de extracción envolviendo compuestos con cadenas mayores (mayor cadena, mayor afinidad entre ellos). Entonces, la extracción del valerato, por tener una cadena más corta en comparación al caproato y caprilato, por ejemplo, también puede haber sido afectada.

3.1.2 Ecología microbiana

Con respecto a la biodiversidad, todas las muestras presentaron una gran diversidad de microorganismos. Los pertenecientes al filo *Firmicutes* fueron dominantes durante todo el experimento (con el 50 % a 85 % de todas las secuencias confiables), como se encontró de forma similar por Jankowska *et al.* (2018) en su estudio con conversión de residuos orgánicos y producción de ácidos.

En términos de familia, las muestras fueron dominadas por grupos distintos. En S1, sólo tres familias representaban el 73 % de las secuencias clasificadas en ese nivel: *Veillonellaceae*, *Ruminococcaceae* y *Enterobacteriaceae*. En S2 (lodo caprogénico añadido), hubo predominancia de la familia *Clostridiaceae*, seguida por otras con valores entre 3 y 9 %

de las secuencias confiables, como: *Lachnospiraceae*, *Planococcaceae*, *Ruminococcaceae*, *Peptostreptococcaceae* (dentro del orden *Clostridiales*, *Firmicutes*), *Bacilli* (orden *Bacillales*, *Firmicutes*), *Porphyromonadaceae* (*Bacteroidetes*) y *Propionibacteriaceae* (*Actinobacteria*).

Después de un mes de operación, el lodo presentó un patrón diferente (muestra S3). La mayoría de las familias presentes en el lodo caprogénico (S2) pueden no haberse adaptado bien a las condiciones operativas, no resistiendo o permaneciendo inactivas. De esta manera, el patrón de la comunidad bacteriana después de la mezcla de los inóculos, se asemejó a la composición del inóculo (S1), aunque con diferentes contribuciones de cada familia a la población.

La comunidad bacteriana cambió poco después de la introducción del sistema de extracción con membranas (muestra S4). El cambio más significativo fue la desaparición de miembros de la familia *Rikenellaceae* y el notable aumento de los pertenecientes a la *Peptostreptococcaceae*. Los microorganismos de la familia *Rikenellaceae* pueden producir succinato o propionato, dependiendo del género en cuestión, pudiendo estar asociados al aumento en la producción de propionato durante la F3 (comparado a las F1 y F2).

Con respecto a los géneros, llamala atención el bajo número de secuencias identificadas en ese nivel taxonómico para el inóculo (S1). Sólo las OTU pertenecientes a los géneros *Clostridium*, *Megasphaera* y *Mitsuokella* (25 % de las lecturas), pueden asignarse con una cobertura superior al 2 % de las lecturas taxonómicas confiables asignadas. Algo similar, aunque en menor medida, se produjo para las otras tres muestras. El lodo caprogénico (S2) presentó mayor diversidad, como muestra el índice de Simpson. Sin embargo, varios géneros, como *Anaerobacter*, *Bacillus*, *Dysgonomonas*, *Lysinibacillus*, *Parabacteroides* y *Propionibacterium*, no fueron capaces de mantenerse en las condiciones del biorreactor alimentado con glicerol.

Después de tres meses de operación (muestra S3), el género más perceptible fue *Mitsuokella* (30,6 % de las lecturas) dentro de la familia *Veillonellaceae*. Los miembros de este género son obligatoriamente anaeróbicos, con metabolismo fermentativo, y son capaces de utilizar una variedad de carbohidratos. Con glucosa, son capaces de producir lactato, acetato y succinato como productos finales de la fermentación. Estos microorganismos pueden estar relacionados con el aumento de la concentración de ácido acético observado en las fases F2 y F3) (MARCHANDIN; JUVONEN; HAIKARA, 2009). El acoplamiento del sistema de membranas para la extracción selectiva de ácidos causó cambios en la población

bacteriana (muestra S4). El cambio más claro fue el notable aumento (hasta el 23,4 % del total de secuencias) del género *Megasphaera*, perteneciente a la familia *Veillonellaceae*.

La secuencia de consenso de la OTU 5, afiliada a *Megasphaera* sp., posee un 99 % de identidad con *M. elsdenii* (cepa DSM 20460 ATCC 25940, ref. NCBI CP027570). *M. elsdenii* realiza la fermentación de lactato con producción de butirato y caproato como productos principales, y de valerato, acetato y propionato en menor cantidad. El alto número de OTU 5 podría explicar la falta de lactato, principal subproducto de la fermentación de *Mitsuokella*, en el biorreactor. Además, también se ha reportado que algunas cepas de *M. elsdenii* produjeron valerato en cantidades más altas que el caproato a partir de glucosa (MAROUNEK, FLIEGROVA, BARTOS, 1989).

El creciente número de *Megasphaera* ocurrió en paralelo con el aumento en la producción de valerato. Por eso, en este trabajo, *M. elsdenii* parece haber sido el microorganismo clave para la producción de valerato. De manera similar al reportado por Bornstein y Barker (1948) con *Clostridium kluyveri*, estos microorganismos pueden ser utilizados para la formación de los productos de elongación tanto de compuestos con cadenas pares como impares.

Mediante los resultados obtenidos durante la etapa 1, el glicerol se mostró como un buen sustrato para la producción de valerato (cadena impar) ante las condiciones aplicadas y la microbiota presente. Además, es importante destacar que el glicerol también puede ser un recurso valioso para la producción de productos con cadenas pares (trabajos futuros).

3.2 ETAPA 2

3.2.1 Desempeño de los inóculos (C1, C2 y C3)

Los inóculos C1 y C2 presentaron buenos rendimientos de 1,3-PDO con glicerol puro y crudo. Sin embargo, C1 presentó mayores rendimientos con glicerol crudo (0,54 mol.mol gli^{-1}) con pH final igual a 7, mientras que C2 presentó valores muy cercanos tanto con glicerol puro (0,46 mol.mol gli^{-1}) como crudo (0,48 mol.mol gli^{-1}), ambos con pH en torno a 6,5. Como la mezcla entre ellos (C3) no presentó resultados más relevantes, para los experimentos con formación de biopelícula, sólo C1 y C2 fueron evaluados. Para todos los inóculos, los rendimientos de los demás subproductos fueron inferiores a 0,3 mol.mol gli^{-1} (ácidos) y 0,2 mol.mol gli^{-1} (etanol).

3.2.2 Formación de biopelícula en los soportes de poliuretano

Durante el proceso de formación de biopelícula en los soportes, el rendimiento de 1,3-PDO por glicerol consumido (cerca de $0,5 \text{ mol.mol gli}^{-1}$) fue aumentando, hasta valores próximos a $0,6 \text{ mol.mol gli}^{-1}$, indicando el crecimiento y adherencia de los microorganismos en el material soporte.

Al final de los experimentos, tanto para C1 como C2 fue posible notar la producción de biogás en los poros del material soporte, también confirmando actividad de microorganismos distribuidos por el interior de los mismos. Con respecto a los ácidos y etanol formados, los resultados fueron similares a los obtenidos y descritos también durante las pruebas en *batch* para C1 y C2. Es probable que debido a eso, el pH efluente medido al final de cada pase/cambio permaneció cerca de 7,0 a C1 y 6,5 para C2.

3.2.3 Desempeño de los reactores R1 y R2

Los reactores R1 y R2, a diferencia del comportamiento presentado por los inóculos (C1 y C2 en *batch*), presentaron un aumento en la producción de ácidos al inicio de la operación. Con R1, se obtuvo una producción elevada y prácticamente equivalente entre 1,3-PDO y ácidos, siendo estos últimos, principalmente acetato, propionato y butirato. La disminución del TRH (día 23 a 36) de 3,3 a 2,3 días parece haber contribuido aún más para el aumento de estos compuestos (de 0,32 a 0,55, con un valor máximo de 0,64 mol de ácidos totales.mol gli⁻¹ entre los días 20 y 30).

Por lo que respecta a R1, incluso usando el pH afluente entre 9 y 10, no se observó ningún efecto positivo en relación a la producción de 1,3-PDO o la disminución de ácidos totales. A partir del día 20, la producción de ácidos pasó a ser mayor que la de 1,3-PDO, manteniéndose así hasta el final de la operación. Debido a eso, la operación con R1 duró sólo 95 días y se decidió no utilizar glicerol crudo. En consecuencia, el mayor rendimiento de 1,3-PDO obtenido con R1 fue $0,44 \text{ mol.mol gli}^{-1}$ (entre los días 42 y 55) con carga orgánica de $7 \text{ g gli.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, consumo de glicerol de 94,4 % y pH efluente próximo a 5.

En contraste, en el reactor R2 la producción de ácidos ($\sim 0,5 \text{ mol.mol gli}^{-1}$ a partir del 8° día), pareció haber sido desfavorecida con el aumento del pH afluente (adición de NaOH). Por lo tanto, el pH afluente se mantuvo cerca de 9,5 durante la mayor parte de la operación. A diferencia de R1, durante la fase F1 del reactor R2, se obtuvieron valores elevados para el

rendimiento de 1,3-PDO. En este caso, usando glicerol puro, los mayores rendimientos se verificaron entre los días 67 y 77, siendo el valor medio igual a $0,51 \text{ mol.mol gli}^{-1}$, valor bastante satisfactorio y de acuerdo con algunos pocos trabajos disponibles hechos con cultivos mixtos y sistemas continuos, también con glicerol puro (GALLARDO *et al.* 2014; NAKAZAWA *et al.*, 2017).

Durante la fase F2 (glicerol crudo) en el reactor R2, cada cambio en la carga aplicada iba aparejada con una disminución en el rendimiento de 1,3-PDO. De esta manera, el rendimiento medio máximo de 1,3-PDO ($0,41 \text{ mol.mol gli}^{-1}$) fue obtenido durante los 16 primeros días de la operación en pH efluente próximo a 6. Al aumentar la carga a valores cercanos a $15 \text{ g gli.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, el consumo de glicerol cayó significativamente (de 95 a 74 %), marcando el final de la operación. En cuanto a la tasa de producción volumétrica de 1,3-PDO, R1 presentó menor valor ($2,42 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, F1) comparado a los resultados de R2 tanto con glicerol puro ($3,83 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, F1) como crudo ($3,19 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, F2). A partir de estos resultados, en R1 durante toda la operación (95 días) la productividad de los ácidos producidos ($2,14 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) fue bastante cercana a la de 1,3-PDO, reforzando su potencial para producir ácidos en comparación con R2.

Por lo tanto, considerando que el rendimiento teórico máximo es $0,72 \text{ mol.mol gli}^{-1}$ (ZENG, 1996), se puede decir que los resultados de R2 en la F1 ($0,51 \text{ mol.mol gli}^{-1}$), con cultivos mixtos fueron bastante satisfactorios. Además, los reactores fueron operados con medio nutricional mínimo lo que está relacionado a menores costos con reactivos, si se aplica a gran escala. Incluso el R1 con menor desempeño en relación a la producción de 1,3-PDO ($0,44 \text{ mol.mol gli}^{-1}$, día 42 ao 55) y R2 con glicerol crudo ($0,41 \text{ mol.mol gli}^{-1}$), presentaron resultados cercanos a otros trabajos utilizando cultivos mixtos ($0,43 \text{ mol.mol gli}^{-1}$, NAKAZAWA *et al.*, 2017) o cultivos puros de *Lactobacillus reuteri* (DSM 20016) (RICCI *et al.*, 2015), *Hafnia alvei* (AD 27) y *Klebsiella pneumoniae* (JP 217) (DROZDZYŃSKA *et al.*, 2014).

3.2.4 Ecología microbiana y morfología del reactor R2

A pesar de los buenos rendimientos de 1,3-PDO obtenidos con R2 usando glicerol puro ($0,51 \text{ mol.mol gli}^{-1}$, F1), para evitar abrir el reactor para recoger las muestras, lo que podría comprometer el funcionamiento del sistema por el contacto con oxígeno, sólo se tomaron muestras al final de la operación (F2) para caracterización microbiológica. Además,

como R1 no presentó resultados relevantes en relación a la producción de ese compuesto, se consideró que no valía la pena gastar tiempo y recursos para analizar la diversidad y morfología de la microbiota.

Sólo *Firmicutes*, *Proteobacteria* y *Bacteroidetes* cubrieron la mayoría de las secuencias totales clasificadas a nivel de filo. A pesar de que los filos abundantes son los mismos, la estructura de la comunidad microbiana cambió del inóculo en relación a las muestras del reactor. La mayoría de las lecturas presentes en el inóculo pueden ser afiliadas a familias dentro del filo *Firmicutes*, es decir, *Clostridiaceae*, *Familia XI_Incertae Sedis*, *Ruminococcaceae*, *Veillonellaceae* (orden *Clostridiales*) y *Planococcaceae* (orden *Bacillales*), que representan el 58 % del total de lecturas confiadamente atribuidas a nivel familiar. Las familias *Enterobacteriaceae* (*Proteobacteria*), *Porphyromonadaceae* (*Bacteroidetes*) y *Coriobacteriaceae* (*Actinobacteria*) también estaban presentes.

Los miembros de todas estas familias citadas son anaerobios fermentativos. Un cambio drástico ocurrió después de 100 días de operación del reactor. Los miembros de las familias *Coriobacteriaceae* (básicamente el género *Eggerthella*), *Familia XI_Incertae Sedis* (compuesta principalmente por el género *Sporanaerobacter*), *Planococaceae* (género *Kurthia*) y *Porphyromonadaceae* (género *Proteiniphilum* y otras secuencias no clasificadas a este nivel) probablemente no se adaptaron a las condiciones aplicadas al reactor y, por ello, desaparecieron o se volvieron muy minoritarias. Es importante recordar que el inóculo viene de un filtro anaerobio con la biomasa adherida a un soporte de PVC (conductos corrugados).

La biomasa suspendida en el reactor fue dominada por la familia *Enterobacteriaceae* (47 %). Desafortunadamente, la mayoría de las secuencias afiliadas a esta familia no pueden atribuirse confiablemente a nivel de género. En cualquier caso, varias especies dentro de la familia *Enterobacteriaceae*, como *Klebsiella pneumoniae* (DROZDZYŃSKA *et al.*, 2014, LEE *et al.*, 2018, SAXENA *et al.*, 2009), *Escherichia coli* (PRZYSTAŁOWSKA *et al.*, 2015), *Hafnia alvei* y *Citrobacter freundii* (DROZDZYŃSKA *et al.*, 2014), están involucradas en la formación de 1,3-PDO a través de la fermentación de glicerol.

Todas las secuencias asociadas a la familia *Lactobacillaceae*, también fermentadores de glicerol, se atribuyeron al género *Lactobacillus*, que a su vez crecieron hasta el 4,7 % en las secuencias de la muestra de biomasa suspendida. Se ha reportado que las especies pertenecientes a este género como *Lactobacillus brevis* (VIVEK, PANDEY, BINOD, 2016a) y *L. reuteri* (RICCI *et al.*, 2015) *L. buchneri*, *L. diolivorans*, *L. panis* (SUN *et al.*, 2018), son buenos productores de 1,3-PDO a partir del glicerol.

Las familias *Ruminococcaceae* y *Bacteroidaceae* (compuesta principalmente por el género *Bacteroides*) también aumentaron acentuadamente a partir del inóculo. Los miembros de estas dos familias son bien conocidos por ser anaerobios estrictos y fermentadores de azúcar y/ o proteínas; aunque sus papeles como productores de 1,3-PDO del glicerol no han sido reportados. Sin embargo, se reportó que miembros del orden *Bacteroidales* fueron dominantes en digestores alimentados con residuos ricos en glicerol para producción de biogás (FERGUSON, COULON, VILLA, 2018); *Ercella succinigenes*, de la familia *Ruminococcaceae*, es capaz de fermentar el glicerol (VAN GELER *et al.*, 2014); y *Ruminococcus* spp. se identificaron como consumidores de glicerol (ENGELS *et al.*, 2016).

En cuanto a la biomasa adherida, la información más relevante fue la disminución drástica de la familia *Enterobacteriaceae* (hasta el 7,1 %) y el aumento concomitante de la familia *Ruminococcaceae* (hasta el 40 %). Desgraciadamente, la mayoría de las lecturas no se pueden asignar a nivel de género. En cualquier caso, el número de secuencias incluidas en las familias *Enterobacteriaceae*, *Clostridiaceae* y *Lactobacillaceae*, que incluyen los géneros descritos como productores de 1,3-PDO a partir de glicerol, fueron del 67 % en la biomasa en suspensión frente al 35 % de la biomasa adherida al soporte de poliuretano. Debido a eso, es legítimo suponer que la mayor parte del 1,3-PDO generado en el reactor pueda ser atribuida a la biomasa suspendida, donde sólo el género *Clostridium* se destaca (15 %) como productor de 1,3-PDO.

A respecto de la morfología, por las imágenes de MEV de muestras del inóculo C2 y biomasa adherida, fue posible notar el crecimiento microbiano a lo largo de la operación del reactor por la comparación entre la biomasa inicial y final. Además, ocurrió dominancia de microorganismos en forma bacilar, en concordancia con la morfología de miembros de los géneros *Clostridium*, *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Dysgonomonas* (bacilos o también, cocobacilos), *Delftia*, entre otros; identificados con la secuenciación masiva de las muestras. También fue verificada una buena integridad de la estructura celular a lo largo de la operación con el reactor.

3.3 ETAPA 3

3.3.1 Experimento 1: Formación de biopelícula en soporte de silicona

Durante la etapa inicial para la formación de la biopelícula, el consumo de glicerol se situó entre el 82 y el 90 %, mientras que el rendimiento de 1,3-PDO varió entre 0,42 a 0,50

mol.mol gli⁻¹. En la última semana (sólo con sustrato y medio nutricional, sin inóculo), el rendimiento fue prácticamente el mismo (entre 0,44 y 0,51 mol.mol gli⁻¹), pero con consumo de glicerol subió a 90 y 95 %, lo que se atribuyó al crecimiento microbiano a lo largo del tiempo total de experimento. Por lo tanto, el rendimiento de 1,3-PDO obtenido durante esta última semana, permite suponer la existencia de microorganismos fijados a la pared interna de la manguera de silicona.

El rendimiento medio obtenido para 1,3-PDO (0,48 mol.mol gli⁻¹) fue ligeramente mayor al valor obtenido en *batch*. Esto puede haber ocurrido porque hay una menor pérdida de microorganismos del sistema cuando estos se adhieren en algún material soporte. Y, considerando un tiempo mayor que una semana, el crecimiento microbiano podría aumentar aún más el consumo y la formación de los subproductos, en conformidad con el expuesto por la literatura (GUNGORMUSLER; GONEN, AZBAR, 2013; SUN *et al.*, 2018).

Estos resultados, tanto durante las cuatro semanas iniciales (con adición de inóculo) como durante la semana siguiente (sin inóculo), presentaron comportamientos similares al inóculo original C1, incluyendo menor rendimiento en ácidos formados (~ 0,2 mol.mol gli⁻¹) y etanol (~ 0,1 mol.mol gli⁻¹). Pero, a diferencia de los valores obtenidos en *batch*, además del acetato, el butirato también estaba entre los principales carboxilatos producidos. Esto puede justificar el pH efluente (entre 6,0 y 6,5) un poco más abajo que el valor encontrado durante las pruebas con el inóculo C1 (pH igual 7).

3.3.1 Experimento 2: Desempeño del reactor R3

Inicialmente, los rendimientos de los productos (1,3-PDO y demás metabolitos) fueron cercanos a los obtenidos y descritos durante la etapa de formación de biopelícula en el interior de la manguera de silicona (0,5 mol.mol gli⁻¹). Sin embargo, después de eso, la relación 1,3-PDO disminuyó, pudiendo estar relacionada con el contacto inicial con oxígeno durante el montaje del sistema.

Al mismo tiempo, se observó un aumento en la producción de etanol (de 0,1 a 0,2 mol.mol gli⁻¹) durante los quince primeros días. Como la salida de la manguera tenía una pequeña curvatura, parte del biogás producido fue retenido dentro de la misma. El aumento de etanol junto con la producción prácticamente constante de acetato, indica que el biogás retenido puede haber desfavorecido la oxidación del etanol (ANGENENT *et al.*, 2016).

Después de 15 días, fue posible notar visualmente la formación de una biopelícula también en la pared externa de la manguera de silicona, pudiendo justificar la disminución de etanol y aumento en la producción de acetato y de 1,3-PDO; que hasta entonces, estaban siendo producidos principalmente por los microorganismos adheridos en el interior de la manguera.

Posteriormente, con el aumento de la carga (hasta 12 g gli.L⁻¹.d⁻¹) y disminución del TRH a 2 días, se verificó un aumento en el rendimiento de 1,3-PDO de 0,49 (día 33) para un valor máximo de 0,61 mol.mol gli⁻¹ (día 36). Ese valor es muy cercano al rendimiento máximo reportado por Varrone *et al.* (2017) usando un reactor con tanque agitado tipo CSTR, inoculado con lodo anaeróbico enriquecido (0,63 mol.mol gli⁻¹). Al mismo tiempo, el rendimiento medio de los ácidos formados disminuyó a 0,3 mol.mol gli⁻¹ y permaneció cerca de ese valor hasta el final de la F1 (día 102).

Después de aumentar la carga a 18 g gli.L⁻¹.d⁻¹ (día 65 a 76) y disminuir el TRH a 1,5 días, el rendimiento de 1,3-PDO volvió a aumentar. Durante ese período, el rendimiento medio de 1,3-PDO presentó el valor más alto de los obtenidos durante la F1 (0,54 mol.mol gli⁻¹), con pH efluente en 5,4 y usando una solución de alimentación sin adición de reactivos (pH afluente de 7,5). El acetato fue el principal ácido producido, representando 0,2 mol.mol gli⁻¹ de 0,3 mol.mol gli⁻¹.

En consecuencia, se impuso una sobrecarga de glicerol (~ 25 g gli.L⁻¹.d⁻¹) y, como consecuencia, su consumo se redujo al 80,1 %, así como el rendimiento de 1,3-PDO, (0,35 mol.mol gli⁻¹). Después de eso, entre los días 84 y 102, la carga fue disminuida y mantenida en 22 g gli.L⁻¹.d⁻¹. Gradualmente, el rendimiento de 1,3-PDO fue recuperado. A partir de ese momento, se decidió evaluar el rendimiento del reactor usando ahora glicerol crudo (fase F2).

Con glicerol crudo, la producción de ácidos aumentó comparada a la cantidad observada durante la F1, lo que puede haber ocurrido debido a su composición, que normalmente ya presenta una parcela de ácidos grasos volátiles (HU *et al.*, 2012).

A partir del día 114, debido a problemas operacionales, ocurrió otra sobrecarga en el reactor, de 11 a 18 g gli.L⁻¹.d⁻¹. Por lo tanto, se disminuyó la carga a valores cercanos a 16,5 g gli.L⁻¹.d⁻¹ y, con el tiempo, el sistema se fue recuperando y adaptándose a esta última condición. Al aumentar un poco más la carga, ahora para 20 g gli.L⁻¹.d⁻¹, el reactor continuó presentando los mayores rendimientos para 1,3-PDO durante la F2, con valores entre 0,48 y 0,50 mol.mol gli⁻¹. Los valores de pH afluente y efluente óptimos fueron 8 y 5, respectivamente.

En términos de costos, R3 proporcionó mayores rendimientos sin la necesidad de agregar reactivos (NaOH) en la solución afluente, que naturalmente ya presentaba pH de 7,5. Otra ventaja interesante fue la mayor productividad de 1,3-PDO usando glicerol crudo (5,21 g.L⁻¹.d⁻¹) en relación al puro (4,63 g.L⁻¹.d⁻¹). Mayores productividades usando glicerol crudo no es algo común, pero puede ocurrir dependiendo de los microorganismos dominantes involucrados en la producción de 1,3-PDO.

Jun *et al.* (2010), también obtuvieron mayor productividad con glicerol crudo y atribuyeron sus resultados al hecho de que algunas especies de *Clostridium* son inhibidas con el uso de glicerol crudo, lo que no sucede cuando *K. pneumoniae* es la especie responsable por la producción de 1,3-PDO. Además de estas ventajas, R1 también reaccionó bien al aumento de la carga aplicada (prácticamente mismo valor utilizado al final de la F1) con glicerol crudo durante los 30 días finales de la operación.

Sin embargo, como el uso a gran escala con cultivos puros está asociado a varias exigencias operativas como: (i) medios nutricionales específicos; (ii) nuevas fuentes de sustrato como ocurre en la co-fermentación; (iii) mantener el medio libre de otros microorganismos, lo que es bastante complicado ya que el glicerol crudo no es un sustrato estéril y (iv) muchas cepas son patógenas y de difícil acceso; la valorización de residuos mediante el uso de cultivos mixtos se ha mostrado bastante atractiva. Esto sucede porque el empleo de cultivos microbianos mixtos implica en: (i) mayor facilidad de control operacional; (ii) elevada diversidad microbiana capaz de degradar sustratos crudos (no estériles) y (iii) menores costos.

3.2.4 Ecología microbiana y morfología del reactor R3

Los estimadores de cobertura, diversidad y uniformidad fueron calculados y indicaron una mayor riqueza (diversidad) del reactor alimentado con glicerol crudo (biomasas suspendida y adherida) en comparación con el inóculo (C1) y, también, glicerol puro (biomasas suspendida y adherida).

Con respecto al nivel de filo, *Firmicutes* fue dominante en todas las muestras del reactor (entre 66 y 98 %); esta dominación se mantuvo en el nivel de orden (*Clostridiales*) y familia (*Clostridiaceae*). Después de 100 días de operación, la población del reactor ya estaba aclimatada al glicerol puro. Otros filos como *Bacteroidetes*, que tenían presencia significativa sólo en el inóculo (36 %), disminuyeron o incluso desaparecieron del reactor.

Las familias *Bacteroidaceae*, *Lachnospiraceae* y *Veillonellaceae*, responsables del 48 % de las secuencias en el inóculo, también disminuyeron acentuadamente o incluso desaparecieron en el reactor. Casi todas las bacterias adheridas a la pared interna de la manguera de silicona pertenecían a la familia *Clostridiaceae* (98 %), mientras que una mayor diversidad se observó en la biomasa suspendida. Se ha documentado bien que los géneros pertenecientes a estas tres familias son responsables por la conversión del glicerol en 1,3-PDO bajo condiciones anaeróbicas (LEE *et al.*, 2015; SIVASANKARAN; GOVINDARAJ; MANI, 2016; YANG *et al.*, 2018). El cambio del glicerol puro a lo crudo provocó un efecto drástico en las poblaciones del reactor. Aunque *Clostridiaceae* siguió siendo la familia mayoritaria, miembros de las familias *Enterobacteriaceae* (17 %) y *Lactobacillaceae* (9 %) también aparecieron en el biopelícula (parte interna del soporte).

La mayoría de las lecturas de 16S rRNA fue taxonómicamente confiable y atribuida al nivel de género. Casi todas las secuencias recuperadas en la biopelícula formada dentro de la silicona después de 100 días de operación con glicerol puro, fueron afiliadas al género *Clostridium*. Después del cambio a glicerol crudo, *Klebsiella* (17 %) y, en menor medida, *Lactobacillus* (9,7 %), también fueron detectados. *K. pneumoniae* (DROZDZYŃSKA *et al.*, 2014; LEE *et al.*, 2018) e *Lactobacillus* (RICCI *et al.*, 2015; VIVEK; PANDEY; BINOD, 2016a) bacterias conocidas involucradas en la fermentación del glicerol a 1,3-PDO.

En cuanto a la biomasa suspendida, después de alimentar el reactor con glicerol puro, bacterias entéricas y *Lactobacillus* parecían estar involucrados en la conversión del glicerol. Después de cambiar a glicerol crudo, *Lactobacillus* y *Clostridium* se hicieron co-dominantes. Además, *Pseudomonas*, *Dialister* y algunos géneros no clasificados afiliados a las familias *Veillonellaceae* y *Ruminococcaceae* (orden *Clostridiales*) también fueron detectados.

El análisis intra-género reveló aspectos interesantes. Al analizar las secuencias de consenso de las diferentes OTU atribuidas al mismo género, fue posible acompañar la evolución de las diferentes especies dependiendo de la alimentación (glicerol puro o crudo) y del estado de la biomasa (fijada o suspendida). El foco fue *Clostridium*, uno de los géneros más representativos y estudiados involucrados en la conversión de glicerol en 1,3-PDO (CHATZIFRAGKOU *et al.*, 2011; FORSBERG, 1987; LEE *et al.*, 2015; LUERS *et al.*, 1997).

Las secuencias retiradas del inóculo (C1) se asignaron a *C. beijerinckii* (22,2 %) y *C. sphenoides* (8,2 %). El número de *C. beijerinckii* permaneció prácticamente inalterado después de la alimentación con glicerol puro (21,3 % y 24,4 % en la biomasa adherida y

suspendida, respectivamente). Sin embargo, *C. pasteurianum* se mostró con elevada dominancia en la biopelícula (75,9 %) y co-dominante con *C. beijerinckii* (24,4 %) en la biomasa suspendida, donde el 9,4 % de las secuencias se asocian a *C. autoethanogenum*/ *C. ljungdahlii*, donde no es posible asignar de forma confiable la secuencia cualquiera de las dos especies. Tanto *C. beijerinckii* como la *C. pasteurianum* ya fueron citados como responsables directos por la producción de 1,3-PDO (JOHNSON, REHMANN, 2016, WISCHRAL *et al.*, 2016).

Se ha descrito que el glicerol crudo derivado del biodiesel es tóxico para *C. pasteurianum* y un pretratamiento fue necesario para su conversión en butanol y 1,3-PDO (JENSEN *et al.*, 2012). Jun *et al.* (2010) descubrieron que *K. pneumoniae* DSM 4799 era capaz de usar el glicerol crudo como la única fuente de carbono para la producción de 1,3-PDO, a diferencia de varias especies de *Clostridium* productoras de 1,3-PDO que eran significativamente inhibido. Por lo tanto, las impurezas contenidas en el glicerol crudo utilizado pueden haber ejercido un efecto fuertemente inhibidor sobre *C. beijerinckii* y, en menor grado, sobre *C. pasteurianum*.

De hecho, parte de las poblaciones de *Clostridium* fue sustituida por *Klebsiella pneumoniae* (17,3 %) y diferentes especies de *Lactobacillus* (*L. casei*/ *L. paracasei*, *L. coryniformis*, *L. paracbuchberi*, que juntos compusieron el 9,7 % de las lecturas) en la biomasa adherida y *L. casei*/*L. paracasei* (26,5 %) en la biomasa suspendida. Como se mencionó anteriormente, tanto *Klebsiella* como *Lactobacillus* realizan la conversión de glicerol en 1,3-PDO. Y eso es lo suficientemente interesante, ya que la mayoría de los trabajos de investigación se han centrado en la fermentación de 1,3-PDO a partir de glicerol usando *K. pneumoniae* y *C. butyricum* (DIETZ; ZENG, 2013). En el presente estudio, no se recuperó ninguna secuencia afiliada a esta última.

4. CONCLUSIONES

- A partir de los resultados obtenidos, es posible concluir que el glicerol crudo puede ser utilizado en procesos biológicos para la obtención de subproductos tanto de la ruta oxidativa (ácidos, principalmente valerato) como reductiva (1,3-PDO).
- La producción de valerato a partir del glicerol puede ser una alternativa bastante prometedora en comparación con los métodos convencionales. Además, el sistema de

extracción continua favoreció la producción de ácidos los cuales pueden ser interesantes desde un punto de vista económico.

- La eficiencia de extracción fue satisfactoria (alrededor del 54 %), pero mejorable. Esto puede haber ocurrido debido a algunos factores como: (i) acumulación de biomasa en los filtros; (ii) pH de la solución alcalina por debajo de 9 debido a problemas en la dosificación de NaOH, y (iii) baja afinidad entre TOPO (agente extractor) y el valerato.
- Con el uso del sistema continuo de extracción, fue visible el aumento de *Megasphaera elsdenii*, en paralelo con el aumento en la producción de valerato (de 0,86 a 1,81 g DQO. L⁻¹.d⁻¹), sugiriendo que esa bacteria es esencial para la producción de este subproducto.
- Con relación a la producción de 1,3-PDO a partir de reactores UASB conteniendo biopelículas, fueron obtenidos rendimientos cerca de 0,5 mol.mol gli⁻¹ con los inóculos en *batch*, muy próximos a los alcanzados en los ensayos de formación de biopelículas.
- De manera similar, la producción de 1,3-PDO se mostró viable utilizando de reactores tipo UASB junto con materiales soportes que contenían las biopelículas. Los rendimientos de 1,3-PDO obtenidos con el reactor con la biomasa adherida a un soporte de silicona fueron muy prometedores (0,54 y 0,48 mol.mol gli⁻¹ con glicerol puro y crudo, respectivamente), considerando el rendimiento teórico (0,72 mol.mol gli⁻¹) y comparando con los pocos datos disponibles en la literatura para cultivos mixtos y sistemas continuos.
- Incluso el reactor inoculado con la biomasa formando en esponjas de poliuretano alcanzó un rendimiento medio de 1,3-PDO cercano al presentado por el que utilizaba soporte de silicona con glicerol puro (~ 0,5 mol.mol gli⁻¹).
- El reactor con soporte de silicona presentó mejor desempeño pues permitió una (i) mayor carga aplicada tanto con glicerol puro como crudo; (ii) menor TDH y (iii) menor valor para pH afluente, dispensando la adición de reactivos para corrección de pH.
- Los miembros del género *Clostridium* desempeñaron el papel principal en la producción de 1,3-PDO. Sin embargo, el glicerol bruto ejerce una inhibición parcial (*C. pasteurianum*) o total (*C. beijerinckii*) sobre las mismas, por lo que en un reactor alimentado con glicerol bruto una parte importante del 1,3-PDO debe ser atribuida a la presencia de *Klebsiella* y *Lactobacillus*.

APÊNDICE B – RESUMO DAS CONDIÇÕES OPERACIONAIS APLICADAS AOS REATORES R1, R2 E R3

Tabela B1 - Condições operacionais aplicadas e desempenho do reator R1 em termos de consumo de glicerol, rendimento e produtividade de 1,3-PDO com glicerol puro

Fase	Tempo (d)	Carga (g-gli.L ⁻¹ .d ⁻¹)	TDH (d)	pH _{afluente}	pH _{efluente}	Consumo de glicerol (%)	1,3-PDO
							Rendimento (mol.mol-gli ⁻¹)
F1	1 – 5 ^a	6,48 ± 0,86	3,17 ± 0,36	7,52 ± 0,01	6,72 ± 0,07	99,62 ± 0,31	0,48 ± 0,01
	6 – 16 ^a	6,58 ± 0,27	3,20 ± 0,15	8,51 ± 0,02	6,50 ± 0,01	99,76 ± 0,16	0,42 ± 0,02
	17 – 21 ^b	6,27 ± 0,19	3,28 ± 0,10	7,53 ± 0,02	6,23 ± 0,38	99,70 ± 0,09	0,42 ± 0,03
	22 – 41 ^b	5,76 ± 0,38	2,30 ± 0,16	8,90 ± 0,24	5,27 ± 0,30	97,52 ± 1,32	0,35 ± 0,03
	42 – 55	6,99 ± 0,30	3,01 ± 0,15	9,00 ± 0,04	5,26 ± 0,21	94,40 ± 0,94	0,44 ± 0,01
	56 – 66	8,62 ± 0,60	2,97 ± 0,20	9,04 ± 0,03	4,93 ± 0,12	92,44 ± 1,83	0,40 ± 0,01
	67 – 74	10,71 ± 0,64	2,81 ± 0,16	9,12 ± 0,04	5,10 ± 0,05	93,61 ± 0,86	0,36 ± 0,02
	75 – 95	11,40 ± 0,37	2,64 ± 0,10	9,67 ± 0,40	4,90 ± 0,08	89,40 ± 3,47	0,33 ± 0,01

^a Praticamente mesma carga e TDH mas pH afluente distintos.

^b Praticamente mesma carga, mas TDH e pH afluente distintos. Nesse intervalo, o pH afluente foi alterado depois do TDH, em decorrência do aumento da produção de ácidos e, como consequência, diminuição do pH efluente.

Fonte: A autora (2019).

Tabela B2 - Condições operacionais aplicadas e desempenho do reator R2 em termos de consumo de glicerol, rendimento e produtividade de 1,3-PDO com glicerol puro (F1) e bruto (F2)

Fase	Tempo (d)	Carga (g-gli.L ⁻¹ .d ⁻¹)	TDH (d)	pH _{afluente}	pH _{efluente}	Consumo de glicerol (%)	1,3-PDO
							Rendimento (mol.mol-gli ⁻¹)
F1	1 – 5 ^a	7,20 ± 0,20	2,86 ± 0,08	7,55 ± 0,03	6,00 ± 0,31	96,27 ± 3,59	0,52 ± 0,02
	6 – 15 ^a	7,25 ± 0,15	2,93 ± 0,06	9,21 ± 0,49	5,96 ± 0,09	92,65 ± 1,03	0,45 ± 0,05
	16 – 26 ^a	7,22 ± 0,27	2,97 ± 0,12	10,01 ± 0,01	6,53 ± 0,35	98,54 ± 1,46	0,45 ± 0,03
	27 – 36 ^a	6,94 ± 0,32	2,93 ± 0,12	9,47 ± 0,02	6,67 ± 0,30	99,59 ± 0,36	0,48 ± 0,02
	37 – 54	9,01 ± 0,21	2,87 ± 0,07	9,48 ± 0,01	6,26 ± 0,22	94,79 ± 2,04	0,44 ± 0,02
	55 – 66	10,93 ± 0,30	2,76 ± 0,08	9,46 ± 0,02	5,97 ± 0,19	95,77 ± 4,11	0,48 ± 0,02
	67 – 77	13,57 ± 0,26	2,68 ± 0,05	9,50 ± 0,01	5,81 ± 0,19	93,41 ± 5,35	0,51 ± 0,04
	78 – 102	15,47 ± 0,28	2,64 ± 0,05	9,93 ± 0,27	5,52 ± 0,08	93,19 ± 4,26	0,46 ± 0,05
F2	103 – 119	8,31 ± 0,32	2,69 ± 0,11	9,51 ± 0,25	6,20 ± 0,12	99,97 ± 0,02	0,41 ± 0,03
	120 – 141	10,44 ± 0,38	2,72 ± 0,04	9,51 ± 0,01	5,66 ± 0,39	99,54 ± 0,46	0,38 ± 0,03
	142 – 151	12,04 ± 0,01	2,63 ± 0,01	9,49 ± 0,02	5,11 ± 0,11	96,90 ± 1,82	0,34 ± 0,04
	152 – 158	12,87 ± 0,05	2,61 ± 0,01	9,53 ± 0,01	5,10 ± 0,15	96,58 ± 1,12	0,32 ± 0,04
	159 – 165	14,85 ± 0,15	2,48 ± 0,02	9,59 ± 0,02	5,05 ± 0,10	82,04 ± 9,27	0,36 ± 0,03

^a Praticamente mesma carga e TDH mas pH afluente distintos. **Fonte:** A autora (2019).

**APÊNDICE B – RESUMO DAS CONDIÇÕES OPERACIONAIS APLICADAS AOS
REATORES R1, R2 E R3 (CONTINUAÇÃO)**

Tabela B3 - Condições operacionais aplicadas e desempenho do reator R3 em termos de consumo de glicerol, rendimento e produtividade de 1,3-PDO com glicerol puro (F1) e bruto (F2)

Fase	Tempo (d)	Carga (g-gli.L ⁻¹ .d ⁻¹)	TDH (d)	pH _{afluente}	pH _{efluente}	Consumo de glicerol (%)	1,3-PDO
							Rendimento (mol.mol-gli ⁻¹)
F1	1 – 5	5,81 ± 1,89	3,92 ± 1,69	7,50 ± 0,01	6,45 ± 0,11	98,60 ± 1,15	0,45 ± 0,05
	6 – 21 ^a	8,00 ± 1,72	2,78 ± 0,58	8,50 ± 0,01	6,40 ± 0,40	99,25 ± 0,73	0,36 ± 0,04
	22 – 33 ^a	8,00 ± 2,11	2,71 ± 0,65	7,53 ± 0,09	5,13 ± 0,21	97,89 ± 1,80	0,45 ± 0,04
	34 – 53	12,13 ± 0,85	1,74 ± 0,13	7,63 ± 0,07	5,73 ± 0,21	97,06 ± 2,84	0,50 ± 0,06
	54 – 64	14,15 ± 0,29	1,84 ± 0,11	7,53 ± 0,02	5,00 ± 0,10	93,54 ± 3,66	0,44 ± 0,04
	65 – 76	17,94 ± 1,10	1,52 ± 0,11	7,55 ± 0,11	5,43 ± 0,15	94,18 ± 2,23	0,54 ± 0,02
	77 – 83	25,02 ± 3,39	1,22 ± 0,15	7,83 ± 0,04	5,00 ± 0,06	80,69 ± 4,60	0,42 ± 0,05
	84 – 102	22,01 ± 0,55	1,38 ± 0,04	8,67 ± 0,15	4,89 ± 0,05	84,02 ± 4,36	0,41 ± 0,04
F2	103 – 113	11,09 ± 0,11	1,40 ± 0,02	9,04 ± 0,26	5,38 ± 0,23	93,31 ± 1,14	0,44 ± 0,03
	114 – 124	18,25 ± 0,52	1,45 ± 0,04	8,67 ± 0,43	5,28 ± 0,11	92,53 ± 4,87	0,37 ± 0,01
	125 – 144	16,36 ± 0,68	1,55 ± 0,11	7,98 ± 0,05	4,87 ± 0,12	90,64 ± 4,00	0,48 ± 0,04
	145 – 155	19,98 ± 0,97	1,30 ± 0,02	8,05 ± 0,16	4,93 ± 0,16	92,84 ± 4,40	0,48 ± 0,01

^a Praticamente mesma carga e TDH mas pH afluente distintos. **Fonte:** A autora (2019).