

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
ENGENHARIA AMBIENTAL

AVALIAÇÃO DA POTENCIALIDADE DE PRODUÇÃO DE
HIDROGÊNIO E AGV's A PARTIR DE EFLUENTES
INDUSTRIAIS E DOMÉSTICOS UTILIZANDO
DIFERENTES INÓCULOS

Aluno: José Augusto Bolzan Agnelli

Orientador: Prof. Dr. Marlei Barboza Passoto

Monografia apresentada ao curso de
graduação em Engenharia Ambiental da
Escola de Engenharia de São Carlos da
Universidade de São Paulo.

São Carlos, SP

2010

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento
da Informação do Serviço de Biblioteca – EESC/USP

A271a Agnelli, José Augusto Bolzan
Avaliação da potencialidade de produção de hidrogênio e AGV's a partir de efluentes industriais e domésticos utilizando diferentes inóculos / José Augusto Bolzan Agnelli ; orientador Marlei Barboza Pasotto. -- São Carlos, 2010.

Monografia (Graduação em Engenharia Ambiental) --
Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade
de São Paulo, 2010.

1. Hidrogênio - produção. 2. Reatores anaeróbios.
3. Tratamento biológico de águas residuárias. 4. Ácidos graxos. I. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Candidato: José Augusto Bolzan Agnelli

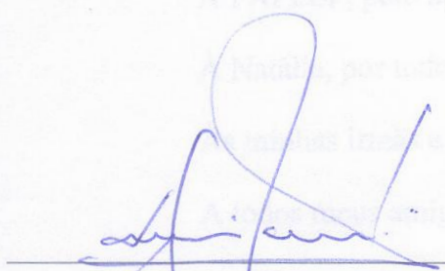
Monografia defendida e aprovada em: 08/10/2010 pela Comissão Julgadora:



Prof. Dr. Marlei Barboza Pasotto



Prof. Dr. Murilo D. M. Innocentini



Prof. Dr. Eugenio Foresti



Prof. Dr. Marcelo Zaiat

Coordenador da Disciplina 1800091- Trabalho de Graduação

Agradecimentos

À minha mãe, por todo apoio e carinho durante toda minha vida, me ajudando muito em tudo que precisei.

Ao meu pai, por todo carinho e pela ajuda imensa em toda minha graduação.

Ao professor Marlei Barboza, pela orientação em todo meu período de iniciação científica.

Ao doutorando Guilherme Peixoto, por toda ajuda, companheirismo e amizade durante o meu trabalho e minha vida acadêmica.

Ao professor Murilo Daniel de Mello Innocentini por toda atenção e ajuda durante o trabalho.

À Janja, Jorge, Carol, Regiane, Gustavo, Pillar, e todo pessoal do LPB, pela colaboração, ajuda e paciência durante o trabalho.

Ao professor Marcelo Zait, por toda atenção e também orientação.

À FAPESP, pelo apoio financeiro durante a Iniciação Científica.

À Natália, por todo amor, carinho e apoio em todos os momentos.

Às minhas irmãs e para a minha família em geral.

A todos meus amigos de graduação, persoras e agregados.

A todos, que de alguma forma me ajudaram durante o trabalho.

Resumo

Agnelli, J. A. B. *Avaliação da potencialidade de produção de hidrogênio e AGV's a partir de efluentes industriais e domésticos utilizando diferentes inóculos* – Monografia (Trabalho de Graduação) - Escola de Engenharia de São Carlos, Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, 2010.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a potencialidade da produção de hidrogênio a partir de efluentes industriais e domésticos, em reator anaeróbico operando em batelada, utilizando-se dois tipos de inóculo, sendo um de reator anaeróbico produtor de hidrogênio (Inóculo I) e outro com uma cultura de microrganismos utilizados na indústria de laticínios (Inóculo II). Os efluentes testados foram vinhaça, glicerol, esgoto sanitário e uma solução sintética de sacarose. Além disso, a avaliação da produção de ácidos graxos voláteis também foi observada de forma detalhada. Como ensaio complementar foi realizada uma etapa metanogênica posterior a alguns ensaios com o Inóculo I. Os resultados mostraram que, para o **Inóculo I**, a vinhaça e a solução de sacarose têm o maior potencial de produção de hidrogênio, possivelmente devido à grande quantidade de carboidratos em suas composições. A produção específica máxima e o rendimento da produção de hidrogênio para a sacarose chegaram a valores de 109 mL H₂/g SSV e 106 mL H₂/g DQO, respectivamente. A vinhaça apresentou produção específica máxima de 30,9 mL H₂/g SSV e um alto valor de rendimento de 262,5 mL H₂/g DQO. Sobre a produção de ácidos e álcoois, a vinhaça produziu principalmente os ácidos acético (28,1 mg/L), propiônico (61,5 mg/L) e butírico (17,1 mg/L) e também etanol (18,8 mg/L) e n-butanol (23,5 mg/L). Esgoto sanitário produziu principalmente os ácidos láctico (51,7 mg/L), butírico (20,7 mg/L) e propiônico (25,5 mg/L) e o glicerol produziu principalmente os ácidos acético (23,6 mg/L), málico (18,5 mg/L), propiônico (58,3 mg/L) e láctico (92,8 mg/L), além do n-butanol (24,1 mg/L). Para o **Inóculo II** o glicerol resultou nos maiores valores para produção específica máxima de hidrogênio, com 76 mL H₂/g SSV e um rendimento de 56,1 mL H₂/g DQO. A sacarose forneceu o maior valor de rendimento, com aproximadamente 91 mL H₂/g DQO e uma produção específica máxima de 66 mL H₂/g SSV. Sobre a produção de

ácidos e álcoois, a vinhaça produziu principalmente os ácidos acético (88,6 mg/L), propiônico (68 mg/L) e butírico (39,9 mg/L), e a sacarose produziu principalmente ácido acético (38,7 mg/L), etanol (47,6 mg/L) e n-butanol (23,5 mg/L). Esgoto sanitário produziu principalmente os ácidos acético (64,6 mg/L) e caprótico (44,3 mg/L), e o glicerol produziu principalmente ácido succínico (52,7 mg/L) e etanol (63,6 mg/L). Com relação à produção sequencial de hidrogênio e metano, a interação entre as fases acidogênica e metanogênica ocorreu em todos os sistemas, com produtos da primeira fase sendo utilizados na segunda fase. O glicerol, com produção específica máxima de 83,1 mL CH₄/g SSV e rendimento de 114 mL CH₄/g DQO, e a vinhaça, com produção específica máxima de 65,8 mL CH₄/g SSV e rendimento de 81,4 mL CH₄/g DQO, apresentaram os maiores potenciais de aplicação.

Palavras-chave: hidrogênio; reator em batelada; tratamento biológico de efluentes, ácidos graxos voláteis (AGV's).

Abstract

Agnelli, J. A. B. *Evaluation of the potenciality of producing hydrogen and VFA's from industrial and domestic effluents using different inocula* - Monograph (Undergraduate Work) - School of Engineering of Sao Carlos, Department of Hydraulics and Sanitation, University of São Paulo, 2010.

This study aimed to evaluate the potenciability of producing hydrogen from industrial and domestic effluents in anaerobic reactor operating in batch, using two types of inoculum, one from an anaerobic reactor producing hydrogen (inoculum I) and another with a culture of microorganisms used in the dairy industry (inoculum II). The effluents used were vinasse, glycerol, domestic sewage and a synthetic solution of sucrose. Furthermore, evaluation of production of volatile fatty acids was also observed in detail. As additional test was realized a methanogenic step after the acidogenic tests with the inoculum I. The results showed that for the **inoculum I**, vinasse and sucrose solution have the greatest potential for hydrogen production, possibly due to the large amount of carbohydrates in their compositions. The specific production and maximum yield of hydrogen for sucrose reached values of 109 mL H₂ / g VSS and 106 mL H₂ / g COD, respectively. The vinasse showed maximum specific production of 30.9 mL H₂ / g of VSS and a high yield value of 262.5 mL H₂ / g COD. About the production of acids and alcohols, vinasse produced especially the acetic acid (28.1 mg / L), propionic acid (61.5 mg / L) and butyric acid (17.1 mg / L) and also ethanol (18.8 mg / L) and n-butanol (23.5 mg / L). Domestic sewage produced specially lactic acid (51.7 mg / L), butyric acid (20.7 mg / L) and propionic acid (25.5 mg / L) and glycerol produced acetic acid (23.6 mg / L), malic acid (18.5 mg / L), propionic acid (58.3 mg / L) and lactic acid (92.8 mg / L), addition of n-butanol (24.1 mg / L). For the **inoculum II**, glycerol resulted on the highest values for maximum specific hydrogen production with 76 mL H₂ / g VSS and a yield of 56.1 mL H₂ / g COD. The sucrose gave the highest yield with approximately 91 mL H₂ / g COD and maximum specific production of hydrogen of 66 mL H₂ / g VSS. About the production of acids and alcohols, vinasse produced especially the acetic acid (88.6 mg / L), propionic acid (68 mg / L) and butyric acid (39.9 mg / L) and sucrose produced

specialy acetic acid (38, 7 mg / L), ethanol (47.6 mg / L) and n-butanol (23.5 mg / L). Domestic sewage produced acetic acid (64.6 mg / L), caproic acid (44.3 mg / L) and glycerol produced specialy succinic acid (52.7 mg / L) and ethanol (63.6 mg / L). Regarding the sequential production of hydrogen and methane, the interaction between the acidogenic and methanogenic phases occurred in all systems, with first stage products being used in the second phase. Glycerol, with maximum specific production of 83,1 mL CH₄ / g VSS and yield 114 mL CH₄ / g COD, and vinasse, with maximum specific production of 65.8 mL CH₄ / g VSS and yield 81.4 mL CH₄ / g COD, showed greater potential for application.

Key words: hydrogen; batch reactor; biologic treatment of effluents; volatile fatty acids (VFA's)

Lista de figuras

Figura 3.1.	Bioquímica da digestão anaeróbia (CHERNICHARO, 2007).....	6
Figura 3.2.	Estrutura dos grãos de Kefir (“Kefir de água”)	17
Figura 4.1.	Fluxograma ilustrativo referente ao desenvolvimento do projeto	21
Figura 4.2.	Centrifuga utilizada para concentrar o Inóculo 1.....	23
Figura 4.3.	Inóculo I concentrado	23
Figura 4.4.	Estufa utilizada nas análises	24
Figura 4.5.	Mufla utilizada nas análises.....	24
Figura 4.6.	Miniestação. Destaque para o tanque de armazenamento de esgoto, onde foi feita a coleta	25
Figura 4.7.	Fotos dos frascos sendo fluxionados com gás Argônio, possibilitando sua anaerobiose	27
Figura 4.8.	Cromatógrafo GC Shimadzu, utilizado na análise de álcoois e ácidos. Destaque para o local onde as amostras são armazenadas.....	29
Figura 4.9.	Cromatógrafo GC-Shimadzu, utilizado na análise de hidrogênio e de outros gases. Destaque para o local onde é efetuada a injeção do gás.....	29
Figura 4.10.	Conjunto Shimadzu de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) ...	29
Figura 4.11.	Esquema do reator em batelada	30
Figura 5.1.	Fluxograma do trabalho com o destaque para a fase tratada no tópico 5.1. .	32
Figura 5.2.	Concentração de carboidratos dada em termos de sacarose	32
Figura 5.3.	Concentração de carboidratos dada em termos de Esgoto Sanitário	33
Figura 5.4.	Variação da DQO durante os ensaios	33
Figura 5.5.	Variação temporal da concentração de Hidrogênio	34
Figura 5.6.	Variação temporal da concentração de Dióxido de Carbono.....	34
Figura 5.7.	Fluxograma do trabalho com o destaque para a fase tratada no tópico 5.2. .	36
Figura 5.8.	Concentração de carboidratos dada em termos de sacarose	37
Figura 5.9.	Concentração de matéria orgânica medida como mg/L de DQO	37
Figura 5.10.	Carbono orgânico total (mg/L)	38
Figura 5.11.	Produção de Hidrogênio (mL)	38
Figura 5.12.	Produção de Gás Carbônico (mL)	39
Figura 5.13.	Produção de ácidos e de álcoois (mg/L) - Glicerol A.....	39
Figura 5.14.	Produção de ácidos e de álcoois (mg/L) – Glicerol B	40
Figura 5.15.	Produção de ácidos e de álcoois (mg/L) – Esgoto* A	41
Figura 5.16.	Produção de ácidos e de álcoois (mg/L) – Esgoto* B	41

Figura 5.17.	Produção de ácidos e de álcoois (mg/L) – Vinhaça A.....	42
Figura 5.18.	Produção de ácidos e de álcoois (mg/L) – Vinhaça B	43
Figura 5.19.	Variação temporal da concentração de ácidos Málico e Lático para a duplicata realizada com vinhaça	44
Figura 5.20.	Microscopia com aumento de 2.000 vezes – Glicerol – Inóculo I.....	46
Figura 5.21.	Microscopia com aumento de 2.000 vezes – Vinhaça – Inóculo I	46
Figura 5.22.	Microscopia com aumento de 2.000 vezes – Esgoto Sanitário – Inóculo I.....	46
Figura 5.23.	Fluxograma do trabalho com o destaque para a fase tratada no tópico 5.3....	47
Figura 5.24.	Concentração de carboidratos dada em termos de sacarose – Vinhaça e Sacarose	47
Figura 5.25.	Concentração de carboidratos dada em termos de sacarose – Glicerol e Esgoto Sanitário.....	48
Figura 5.26.	Concentração de matéria orgânica medida como mg/L de DQO – Glicerol e Vinhaça	48
Figura 5.27.	Concentração de matéria orgânica medida como mg/L de DQO – Esgoto Sanitário e Sacarose	49
Figura 5.28.	Produção de Hidrogênio (mL) – Esgoto Sanitário e Sacarose.....	49
Figura 5.29.	Produção de Hidrogênio (mL) – Glicerol e Vinhaça	50
Figura 5.30.	Produção de Dióxido de Carbono (mL) – Esgoto Sanitário e Sacarose	50
Figura 5.31.	Produção de Dióxido de Carbono (mL) – Glicerol e Vinhaça.....	51
Figura 5.32.	Produção de ácidos e de álcoois (mg/L) – Glicerol A	51
Figura 5.33.	Produção de ácidos e de álcoois (mg/L) – Glicerol B	52
Figura 5.34.	Produção de ácidos e de álcoois (mg/L) – Esgoto* A	53
Figura 5.35.	Produção de ácidos e de álcoois (mg/L) – Esgoto* B	53
Figura 5.36.	Produção de ácidos e de álcoois (mg/L) – Vinhaça A	54
Figura 5.37.	Produção de ácidos e de álcoois (mg/L) – Vinhaça B	55
Figura 5.38.	Concentração dos ácidos málico e lático para os ensaios com a Vinhaça e o inóculo II.....	56
Figura 5.39.	Produção de ácidos e de álcoois (mg/L) – Sacarose A	57
Figura 5.40.	Produção de ácidos e de álcoois (mg/L) – Sacarose B	57
Figura 5.41	Microscopia com aumento de 2.000 vezes	59
Figura 5.42.	Microscopia com aumento de 2.000 vezes	59
Figura 5.43.	Microscopia com aumento de 2.000 vezes – Vinhaça – Inóculo II	59
Figura 5.44.	Microscopia com aumento de 2.000 vezes – Esgoto Sanitário – Inóculo II	60
Figura 5.45.	Microscopia com aumento de 2.000 vezes – Vinhaça – Inóculo II – Coloração de Gram (Avermelhado- Gram Negativo e Roxo- Gram Positivas).....	61
Figura 5.46.	Microscopia com aumento de 2.000 vezes – Glicerol – Inóculo II – Coloração de Gram (Avermelhado- Gram Negativo e Roxo- Gram Positivas).....	61

Figura 5.47.	Fluxograma do trabalho com o destaque para a fase tratada no tópico 5.4. .62
Figura 5.48	Produção de Hidrogênio. Comparação entre os inóculos. (Δ) Inóculo I e (\square) Inóculo II 63
Figura 5.49.	Fluxograma do trabalho com o destaque para a fase tratada no tópico 5.5. .65
Figura 5.50	Concentração de carboidratos dada em termos de sacarose 66
Figura 5.51	Variação temporal da DQO 66
Figura 5.52	Gráfico da produção de metano 67
Figura 5.53	Geração de ácidos e álcoois (Glicerol A) 68
Figura 5.54	Geração de ácidos e álcoois (Vinhaça A) 69
Figura 5.55.	Geração de ácidos e álcoois (Esgoto Sanitário A) 69

Lista de tabelas

Tabela 3.1.	Composição média da vinhaça conforme diversos tipos de mostos e referências bibliográficas	10
Tabela 3.2.	Características físico-químicas da vinhaça segundo a origem do mosto.	11
Tabela 3.3.	Propriedades físico-químicas do glicerol	15
Tabela 4.1.	Composição do Meio nutriente utilizado e sua respectiva concentração no reator (adaptação do meio Del Nery, 1987)	22
Tabela 4.2.	Quantidade de sólidos presentes no Inóculo I concentrado.....	23
Tabela 4.3.	Quantidade de sólidos presentes no Inóculo Metanogênico concentrado	24
Tabela 4.4.	Caracterização dos efluentes utilizados.....	26
Tabela 5.1.	Valores para a análise de sólidos – Inóculo I.....	36
Tabela 5.2.	Concentrações iniciais, máximas e os tempos dos picos de produção de todos os ácidos e álcoois analisados; Dados para o Glicerol A e Glicerol B	40
Tabela 5.3.	Concentrações iniciais, máximas e os tempos dos picos de produção de todos os ácidos e álcoois analisados; Dados para o Esgoto* A e Esgoto* B	42
Tabela 5.4.	Concentrações iniciais, máximas e os tempos dos picos de produção de todos os ácidos e álcoois analisados; Dados para a Vinhaça A e Vinhaça B.....	43
Tabela 5.5.	Análise de sólidos- inóculo I.....	45
Tabela 5.6.	Concentrações iniciais, máximas e os tempos dos picos de produção de todos os ácidos e álcoois analisados; Dados para a Glicerol A e Glicerol B	52
Tabela 5.7.	Concentrações iniciais, máximas e os tempos dos picos de produção de todos os ácidos e álcoois analisados; Dados para a Esgoto* A e Esgoto* B	54
Tabela 5.8.	Concentrações iniciais, máximas e os tempos dos picos de produção de todos os ácidos e álcoois analisados; Dados para a Vinhaça A e Vinhaça B.....	55
Tabela 5.9.	Concentrações iniciais, máximas e os tempos dos picos de produção de todos os ácidos e álcoois analisados; Dados para a Sacarose A e Sacarose B	58
Tabela 5.10.	Concentração inicial de biomassa – Inóculo II	58
Tabela 5.11.	Valores de produção específica máxima (P_{max}), rendimento (Y) e quantidade inicial de biomassa (C_x) – Hidrogênio para os dois inóculos	64
Tabela 5.12.	Concentração de biomassa (C_x), produção específica máxima (P_{max}) e rendimento para a geração de metano	67

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. OBJETIVO GERAL	3
2.2. OBJETIVOS COMPLEMENTARES.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1. BIOQUÍMICA DA DIGESTÃO ANAERÓBIA	5
3.1.1. <i>Bactérias Hidrolíticas</i>	7
3.1.2. <i>Bactérias Acidogênicas</i>	7
3.1.3. <i>Bactérias Acetogênicas</i>	8
3.1.4. <i>Bactérias Metanogênicas</i>	8
3.1.5. <i>Bactérias Metanogênicas Acetoclásticas</i>	8
3.2. VINHAÇA	9
3.3. GLICEROL	14
3.4. INÓCULO I	16
3.5. INÓCULO II – Grãos de Kefir	16
3.6. PRODUÇÃO BIOLÓGICA DE HIDROGÊNIO (H ₂) E FATORES ASSOCIADOS	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1. Preparação do Meio Nutriente	22
4.2. Caracterização do Inóculo I.....	23
4.3. Caracterização do Inóculo Metanogênico.....	24
4.4. Caracterização do Inóculo II (Grãos de Kefir).....	24
4.5. Caracterização dos Efluentes	25
4.5.1. <i>Solução de Sacarose</i>	25
4.5.2. <i>Esgoto Sanitário</i>	25
4.5.3. <i>Vinhaça</i>	26
4.5.4. <i>Glicerol</i>	26
4.6. Preparação das Bateladas – Fase Acidogênica.....	27
4.7. Preparação das Bateladas – Fase Metanogênica	28
4.8. Métodos Analíticos	28

4.9. Procedimento Experimental	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
5.1. Bateladas com Inóculo I – Sacarose e Esgoto Sanitário – Fase Acidogênica	32
5.2. Bateladas com Inóculo I – Esgoto Sanitário*, Vinhaça e Glicerol – Fase Acidogênica	36
5.3. Bateladas com Inóculo II – Sacarose, Esgoto, Esgoto Sanitário*, Vinhaça e Glicerol – Fase Acidogênica	47
5.4. Comparação entre o Inóculo I e o Inóculo II – Fase Acidogênica.....	62
5.5. Bateladas Inóculo Metanogênico – Esgoto Sanitário*, Vinhaça e Glicerol – Fase Metanogênica.....	65
6. CONCLUSÕES	71
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	73
8. BIBLIOGRAFIA.....	75

1. INTRODUÇÃO

Atualmente tem sido constatada a relação entre o aquecimento global e o aumento da emissão de gases produzidos pela queima de recursos combustíveis. (GOLDEMBERG, 1992). A principal parcela destes gases, cerca de 57%, deriva da produção e uso de energia, sendo esta originada principalmente na queima de combustíveis fósseis, responsáveis por cerca de 80% do suprimento da demanda energética mundial (DAS *et al.*, 2001).

Para controle dessa poluição, bem como o enfrentamento da degradação dos recursos naturais, há necessidade de criação de estratégias que motivem empresas a investirem em ações cujo resultado final seja a diminuição de impacto ao meio ambiente. A transformação de resíduos, através da aplicação de processos físicos, físico-químicos ou bioquímicos, tem se mostrado promissora no que concerne à motivação de investimentos no setor.

No entanto, para os tratamentos de efluentes industriais, grande parte dos sistemas é predominantemente motivada pelo rigor da legislação ambiental em vigor, sendo que este tipo de reaproveitamento é incipiente e ainda restrito ao ambiente científico/acadêmico. À medida que se avançar nas pesquisas de modo a se disponibilizar ao setor produtivo tecnologias que permitam, a partir de um resíduo, se obter produtos que apresentem um valor agregado, podendo minimizar os custos das instalações, os números voltados a este setor devem aumentar substancialmente.

O hidrogênio obtido a partir de matérias-primas renováveis constitui uma alternativa energética bastante promissora, sendo quatro os processos básicos para sua produção a partir de fontes primárias de energia não-fósseis: (i) eletrólise da água; (ii) processos termoquímicos; (iii) processos radiolíticos e (iv) processos biológicos (LAY *et al.*, 1999).

A obtenção de hidrogênio por via biológica pode ocorrer por meio de dois processos: fotossintético e fermentativo, sendo a fermentação tecnicamente mais simples e a que apresenta vantagens como as altas velocidades de produção de hidrogênio e os baixos custos da tecnologia fermentativa.

Em processos biológicos fermentativos, há a produção de ácidos orgânicos

concomitantemente com hidrogênio (LEITE *et al.*, 2008). Justamente neste aspecto, os processos de tratamento de efluentes suscitam interesse, pois além de um possível aproveitamento do hidrogênio gerado, os ácidos orgânicos voláteis (AGV`s) também podem ser aproveitados, sendo eles extraídos através de processos de troca iônica em colunas de leito fixo (MALVESTIO *et al.*, 2010), por exemplo.

Dessa forma, este trabalho buscou avaliar o potencial de geração principalmente de hidrogênio a partir de águas residuárias industriais (vinhaça e glicerol) e domésticas (esgoto sanitário), em reatores anaeróbios em batelada, utilizando-se dois tipos de inóculo, sendo um de reator anaeróbio produtor de hidrogênio e outro com uma cultura de microrganismos utilizados na indústria de laticínios. A composição do biogás e a geração de ácidos foram avaliadas em todas as condições testadas.

Esse trabalho se justifica, portanto, pelo fato do hidrogênio obtido por processos biológicos a partir de águas residuárias apresentar-se como uma alternativa no âmbito energético, ambiental e econômico, uma vez que a sua aplicação em célula de combustível gera energia elétrica, tendo como produtos finais somente calor e água. Além disso, as matérias-primas a serem utilizadas em sua geração, no caso, vinhaça, glicerol e esgoto sanitário, encontram-se disponíveis e podem ser revalorizadas por meio da geração de hidrogênio e AGV`s.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Em vista desta breve exposição, este projeto tem por objetivo estudar a produção de hidrogênio e ácidos graxos voláteis (AGV's) a partir de águas residuárias industriais e domésticas, em reator anaeróbio operando em batelada, utilizando-se dois tipos de inóculo, sendo um de reator anaeróbio produtor de hidrogênio e outro com uma cultura de microrganismos utilizados na indústria de laticínios (Grãos de Kefir).

2.2. OBJETIVOS COMPLEMENTARES

Os objetivos complementares do trabalho são:

- Avaliar o consumo de substrato e produção de gás e/ou ácidos.
- Avaliar a atividade acidogênica em reator batelada, a partir de dois diferentes inóculos obtidos de diferentes fontes.
- Avaliar de forma simplificada, ao final da fermentação, a predominância de microrganismos submetidos a resíduos industriais e domésticos.
- Avaliar a potencialidade de produção de metano a partir dos produtos da fermentação.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. BIOQUÍMICA DA DIGESTÃO ANAERÓBIA

Para os processos aneróbios, tem-se a cinética microbiana, a energia envolvida no metabolismo e a especificidade do substrato, bem descritas por HARPER e POHLAND (1986). São nove os estágios apresentados pelos autores, onde interagem grupos específicos de microrganismos, sendo:

1. Hidrólise de polímeros orgânicos a monômeros, como açúcares, ácidos orgânicos e aminoácidos;
2. Conversão de monômeros orgânicos a hidrogênio, bicarbonato, ácidos acético, propiônico e butírico, e outros produtos orgânicos como etanol e ácido láctico;
3. Oxidação de produtos orgânicos reduzidos a hidrogênio, bicarbonato e ácido acético pelas bactérias acetogênicas produtora de hidrogênio (BAPH);
4. Respiração homoacetogênica, consumindo bicarbonato, pelas bactérias homoacetogênicas;
5. Oxidação de produtos orgânicos reduzidos a acetato pelas bactérias redutoras de nitrato (BRN) e pelas bactérias redutoras de sulfato (BRS);
6. Oxidação de acetato a bicarbonato pelas BRN e BRS;
7. Oxidação de hidrogênio pelas BRN e BRS;
8. Fermentação metanogênica acetoclástica;
9. Respiração metanogênica do hidrogênio.

Na digestão anaeróbia é importante conhecer a ação das bactérias produtoras de hidrogênio, as acidogênicas, e as bactérias consumidoras de hidrogênio, principalmente as metanogênicas. O balanceamento das reações pode ou não resultar em acúmulo dos ácidos, especialmente o propiônico e o butírico. Isso dependeria, naturalmente, do destino do hidrogênio. De acordo com LEITE (1999), o comportamento do sistema, quanto ao pH e alcalinidade, depende mais desses fatores internos. A manutenção do equilíbrio do sistema depende da remoção contínua do hidrogênio, assegurando assim, a produção de ácido acético que alimenta o grupo das bactérias metanogênicas acetoclásticas.

HARPER e POHLAND (1986) fazem uma discussão quanto a distúrbios no processo e conseqüente acúmulo de hidrogênio. Segundo os autores, uma via alternativa de disposição de elétron é ativada e o piruvato é transformado em propionato, lactato e etanol e/ou o acetil-Co-enzima A é transformado em ácido butírico, ao contrário do que ocorreria em condição normal, onde acetil-Coenzima A é convertido em ácido. Assim, conclui-se que o papel do hidrogênio é vital em sistemas anaeróbios e o monitoramento do biogás tem importância marcante. O efeito regulatório do hidrogênio sobre as bactérias acetogênicas e arqueas metanogênicas é interpretado através de cálculos termodinâmicos que indicam as pressões parciais do hidrogênio favoráveis à oxidação dos ácidos propiônico a acético abaixo de 10^{-4} atm. Para a conversão de butírico a acético a pressão parcial deve ser de 10^{-3} atm ou menor. A Figura 3.1. mostra um esquema da bioquímica envolvida na digestão anaeróbia.

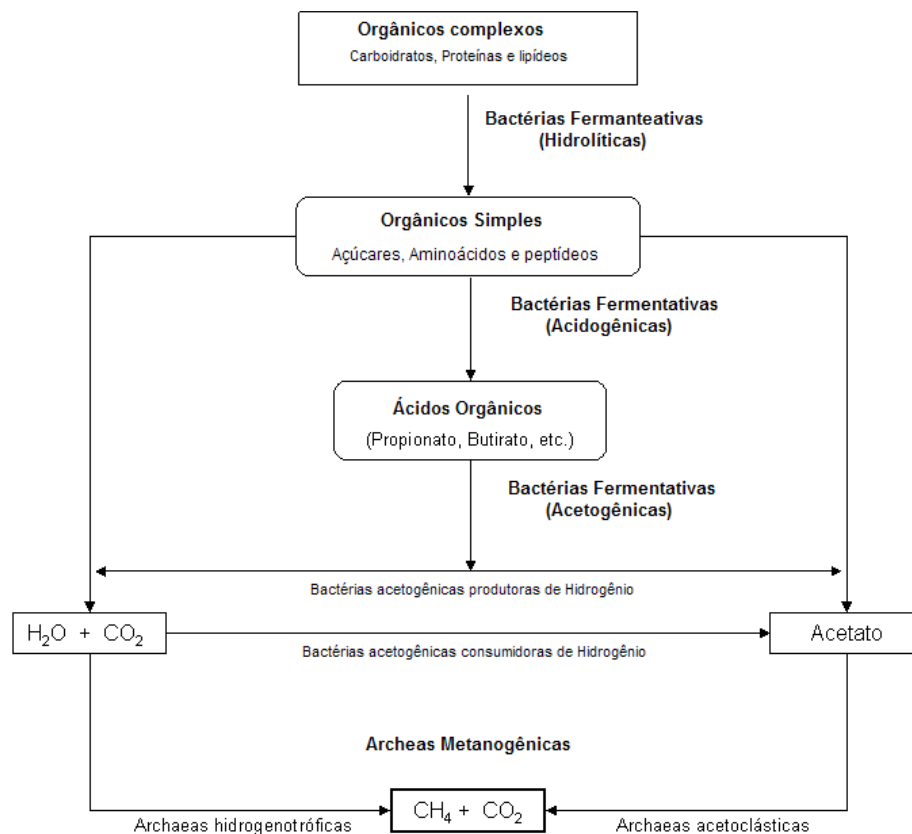


Figura 3.1. Bioquímica da digestão anaeróbia (CHERNICHARO, 2007)

Considerando compostos facilmente biodegradáveis, aqueles que contêm cadeias curtas de carbono, a fase limitante da digestão anaeróbia é a metanogênica.

Por outro lado durante a digestão anaeróbia de compostos complexos como proteínas e resíduos provenientes da indústria de alimentos, entre outros, a fase limitante do processo é a de hidrólise. (HUTNAN *et al.*, 1999).

3.1.1. Bactérias Hidrolíticas

Algumas bactérias possuem mecanismos, onde com a ajuda de enzimas, a matéria orgânica particulada fica em condições de “assimilação”, constituindo portanto a primeira fase do processo de degradação anaeróbio. Nesta etapa a hidrólise de materiais particulados complexos, tais como os polímeros, são convertidos a materiais mais simples, constituídos por moléculas menores, que podem, por sua vez, atravessar as paredes celulares das bactérias fermentativas. Esta conversão de materiais particulados em compostos dissolvidos, ocorre através da ação de enzimas extracelulares excretadas por bactérias fermentativas hidrolíticas. (CHERNICHARO, 2007).

3.1.2. Bactérias Acidogênicas

Os produtos solúveis, provenientes da fase hidrolítica, são metabolizados por bactérias fermentativas sendo convertidos em diversos compostos simples, que são excretados pelas células. Os compostos produzidos nesta etapa incluem os ácidos graxos voláteis, álcoois, ácido láctico, gás carbônico, hidrogênio, gás amônio e sulfato de hidrogênio, além do próprio crescimento celular. Por serem os ácidos graxos voláteis os principais produtos destas bactérias, elas são usualmente chamadas de bactérias fermentativas acidogênicas.

A acidogênese é realizada por um grande e diverso número de bactérias, como por exemplo, as espécies de *Clostridium* e *Bacteroids*. As primeiras constituem uma espécie anaeróbia que formam esporos, o que permite que elas sobrevivam em ambientes tão adversos. As *Bacteroids* encontram-se presentes em ambientes digestivos participando da degradação de açúcares e aminoácidos. A maioria das bactérias acidogênicas são anaeróbias restritas, sendo que cerca de 1% constituem de bactérias facultativas que podem oxidar um substrato orgânico por via oxidativa. Isso é particularmente importante, uma vez que as bactérias anaeróbias restritas são protegidas com a presença de oxigênio eventualmente presente no meio.

3.1.3. Bactérias Acetogênicas

As bactérias acetogênicas são responsáveis pela oxidação de produtos gerados na fase acidogênica. Os produtos desta fase são utilizados como substrato pelas arqueas metanogênicas. Desta forma as bactérias acetogênicas fazem parte de um grupo de metabolismo intermediário, que produzem substrato para as bactérias metanogênicas. De todos os produtos metabolizados pelas bactérias acidogênicas, apenas o hidrogênio e o acetato podem ser utilizados diretamente pelas metanogênicas.

Cerca de 50% de DQO biodegradável é convertida em propionato e butirato que por sua vez são decompostos a acetato e hidrogênio pela ação das bactérias acetogênicas (CHERNICHARO, 2007).

3.1.4. Arqueas Metanogênicas

De acordo com O'FLAHERTY *et al.* (1996), a fase metanogênica é a etapa final do processo de degradação anaeróbia e é responsável pela produção de metano. As arqueas metanogênicas são anaeróbias restritas onde há domínio das *Archeas*.

As arqueas metanogênicas utilizam somente um número limitado de substrato, com baixo número de carbono presente em sua estrutura (ALVES *et al.*, 2001). Estes substratos são o ácido acético, hidrogênio e dióxido de carbono, ácido fórmico, metanol, metilaminas e monóxido de carbono. A produção de metano está muito ligada à afinidade de se consumir fontes específicas de carbono. Assim, divide-se estas arqueas em dois grupos principais, sendo um grupo composto por organismos que produzem metano a partir de ácido acético e metanol (chamadas acetoclásticas) e outro grupo que o produz, a partir de hidrogênio e dióxido de carbono (chamadas hidrogenotróficas).(CHERNICHARO, 2007):

3.1.5. Arqueas Metanogênicas acetoclásticas

São poucas as arqueas metanogênicas capazes de produzir metano a partir de acetato e normalmente estão presentes em processos de digestão anaeróbios. Essas arqueas são responsáveis por cerca de 60 a 70% da produção de metano durante a digestão anaeróbia de águas residuárias domésticas. As metanogênicas acetoclásticas

pertencem a dois grupos principais sendo: *Methanosarcina* e *Methanosaeta* (*Methanotrix*). O gênero *Methanosaeta* utiliza exclusivamente acetato. Esses microrganismos se desenvolvem na forma filamentosa e tem grande importância para a formação de pellets ou grânulos bacterianos. Os microrganismos que pertencem ao gênero *Methanosarcina* apresentam-se na forma de cocos. Este gênero de *Methanosarcina* é considerado como constituir os mais versáteis entre as metanogênicas e são os que possuem espécies que são capazes de utilizar hidrogênio e metilamina (CHERNICHARO, 2007).

3.2. VINHAÇA

A vinhaça é o subproduto gerado durante a destilação do caldo de fermentação no processo de produção de álcool etílico a partir de cana-de-açúcar, beterraba, milho, mandioca e outros caldos vegetais ricos em açúcares fermentescíveis. Dependendo da região do Brasil, a vinhaça recebe outras denominações, como vinhoto, vinhote, calda, restilo, tiborna, caxixi ou garapão. Dependendo da origem da matéria-prima vegetal, a vinhaça apresenta diferentes propriedades. A composição da vinhaça depende de inúmeros parâmetros de processamento, como a composição da matéria-prima, a linhagem de levedura utilizada, os aditivos químicos utilizados para a preparação do caldo, do tempo de fermentação, da qualidade do vinho e das características do equipamento de destilação, dentre outros. A denominação de mosto refere-se aos líquidos susceptíveis a sofrer fermentação e posterior destilação. Uma vez fermentado, o mosto passa a ser denominado vinho, que pode ser destilado, possibilitando a recuperação do álcool produzido na fermentação, restando o resíduo que é a vinhaça.

Em relação ao processo baseado na cana-de-açúcar, como o caso brasileiro, a vinhaça pode resultar de 3 origens distintas: (a) *vinhaça de mosto de melão* – o mosto é produzido a partir de um subproduto da produção de açúcar, chamado melão, (b) *vinhaça de mosto de caldo* – produzida em destilarias que produzem apenas álcool, a partir da fermentação alcoólica do caldo, (c) *vinhaça de mosto misto* – o mosto é produzido com mistura de caldo e melão. Em uma mesma safra, a vinhaça pode se apresentar nas diversas categorias, resultante do uso de caldo, melão ou com mistura de caldo mais melão (VIANA, 2006). A Tabela 3.1 apresenta a

composição média da vinhaça conforme origem do mosto e conforme diferentes fontes da literatura (VIANA, 2006).

Tabela 3.1. Composição média da vinhaça conforme diversos tipos de mostos e referências bibliográficas. (Fonte: VIANA, 2006).

Referência	Tipo de Mosto de vinhaça	pH	DBO (g/l)	DQO (g/l)	N(total) (g/l)	SO ₄ (g/l)	P(total) (g/l)	K(K ₂ O ₅) (g/l)
Van Haandel e Catunda, (1994)	Caldo	3,5	12,0	25,0	0,40	0,20	0,80	-
Driessen <i>et al.</i> , (1994)	Caldo	3,5	15,0	22,0	0,40	0,06	-	0,40
Costa <i>et al.</i> , (1986)	Caldo	4,2	16,5	33,0	0,70	0,09	1,74	0,76
Callander e Badford, (1983)	Caldo	3,9	-	26,0	1,19	0,32	2,10	1,47
Lampoglia e Rossel, (1997)	Caldo	4,1	11,0	24,0	0,45	0,650	0,11	1,65
Lampoglia e Rossel, (1997)	Misto	4,5	19,8	45,0	0,60	3,70	0,10	4,00
Costa <i>et al.</i> , (1986)	Misto	4,5	19,8	45,0	0,71	0,09	3,82	3,73
Souza <i>et al.</i> , (1992)	Misto	3,9	-	31,5	0,37	0,03	1,30	0,42
Costa <i>et al.</i> , (1986)	Melaço	4,6	25,0	65,0	1,61	0,13	6,50	6,40
de Menezes, (1989)	Melaço	4,1	25,8	48,0	0,82	0,16	-	-
Harada <i>et al.</i> , (1996)	Melaço	4,1	30,0	120	1,60	0,06	1,92	4,60
Sheehan e Greenfield, (1980)	Melaço	4,2	35,7	77,7	1,78	0,17	8,90	4,36
Driessen <i>et al.</i> , (1994)	Melaço	3,9	39,0	100	1,03	0,03	7,00	9,50
Goyal <i>et al.</i> , (1996)	Melaço	4,1	60,0	98,0	1,20	1,50	1,20	5,00
Sanchez Riera <i>et al.</i> , (1985)	Melaço	4,8	-	100	2,50	0,30	1,75	0,70
Casarini <i>et al.</i> , (1987)	Melaço	4,2	-	24,6	0,81	0,03	1,98	0,61
Lampoglia e Rossel, (1997)	Melaço	4,6	25,0	65,0	1,03	6,40	0,20	5,60
de Bazua <i>et al.</i> , (1991)	Melaço	5,0	27,5	64,0	1,30	-	-	2,80

A Tabela 3.2. mostra um resumo das características da vinhaça proveniente de motos de diferentes etapas do processo, segundo PRADA *et al.* (1998).

Tabela 3.2. Características físico-químicas da vinhaça segundo a origem do mosto. (Fonte: PRADA et al, 1998).

Parâmetro	Melaço	Caldo	Misto
pH	4,2 - 5,0	3,7 - 4,6	4,4 - 4,6
Temperatura	80 - 100	80 - 100	80 - 100
DBO (mg/L O ₂) (1)	25.000	6.000 - 16.500	19.800
DQO (mg/L O ₂) (2)	65.000	15.000 - 33.000	45.000
Sólidos totais (mg/L)	81.500	23.700	52.700
Sólidos voláteis (mg/L)	60.000	20.000	40.000
Sólidos fixos (mg/L)	21.500	3.700	12.700
Nitrogênio (mg/L N)	450 - 1.610	150 - 700	480 - 710
Fósforo (mg/L P ₂ O ₅)	100 - 290	10 - 210	9 - 200
Potássio (mg/L K ₂ O)	3.740 - 7.830	1.200 - 2.100	3.340 - 4.600
Cálcio (mg/L CaO)	450 - 5.180	130 - 1.540	1.330 - 4.570
Magnésio (mg/L MgO)	420 - 1.520	200 - 490	580.700
Sulfato (mg/L SO ₄ ²⁻)	6.400	600 - 760	3.700 - 3.730
Carbono (mg/L C)	11.200 - 22.900	5.700 - 13.400	8.700 - 12.100
Relação C/N	16 - 16,27	19,7 - 21,07	16,4 - 16,43
Matéria orgânica (mg/L)	63.400	19.500	3.800
Subst. redutoras (mg/L)	9.500	7.900	8.300

(1) DBO = Demanda Bioquímica de oxigênio

(2) DQO = Demanda Química de oxigênio

A matéria orgânica é o principal constituinte da vinhaça, basicamente sob a forma de ácidos orgânicos. A vinhaça também é rica em cátions como o potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg). Quando originada de mosto de melaço, a vinhaça apresenta maiores concentrações em matéria orgânica, potássio, cálcio e magnésio, ao passo que esses elementos decaem consideravelmente quando se trata de mosto de caldo de cana (ROSSETTO, 1987). A quantidade gerada pelas destilarias pode variar de 10 a 18 L de vinhaça por litro de álcool produzido, dependendo das condições tecnológicas da destilaria (ROSSETTO, 1987). Pelo alto teor de matéria orgânica e pelo grande volume gerado, a vinhaça é o efluente líquido da indústria sucroalcooleira que possui o maior potencial poluidor, apresentando Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) variando de 20.000 a 35.000 mg/L.

O poder poluente da vinhaça, quando lançada em rios ou em lagos, é cerca de cem vezes maior que o do esgoto doméstico, sendo isso devido ao alto teor em matéria orgânica, baixo pH, elevada presença de cátions alcalinos e alcalinos terrosos e altos índices de demanda bioquímica de oxigênio (DBO), além de elevada temperatura na saída da etapa de destilação (cerca de 85 a 90°C). Por essa razão, a vinhaça é considerada altamente nociva à fauna, flora, microfauna e microflora das águas doces, além de afugentar a fauna marinha que vem às costas brasileiras para procriação. Segundo LUKSENBERG *et al* (1980, apud VIANA, 2006), cada 2 litros de vinhaça equivalem ao esgoto sanitário de um habitante/dia. O impacto ambiental negativo da vinhaça também decorre da sua cor e da presença de metais pesados e

poluentes orgânicos, como clorofórmio, pentaclorofenol e cloreto de metileno. Compostos fenólicos (ácido tânico e húmico) da matéria-prima, melanoidinas da reação de Maillard de açúcares com proteínas, caramelos de açúcares superaquecidos e resíduos da hidrólise ácida podem contribuir com a coloração do efluente. Estes compostos podem inibir a fermentação microbiana no rúmen, assim como no tratamento biológico da vinhaça, quando presentes em determinadas concentrações (VIANA, 2006).

Embora a vinhaça seja caracterizada como efluente de alto poder poluente, ela também tem alto valor fertilizante, principalmente pelos altos teores dos elementos cálcio, magnésio e potássio. Por essa razão, a alternativa principal de uso da vinhaça passou a ser o uso como agente recuperador de solo. No Brasil, a vinhaça *in natura* é amplamente aproveitada como fertilizante em áreas agrícolas, próximas às usinas de cana-de-açúcar, por conter elementos em quantidades significativas. Segundo VIANA (2006), as principais desvantagens do uso da fertirrigação são: a possível salinização do solo, contaminação de aquíferos subterrâneos e aumento do nível de potássio no caldo da cana.

Segundo vários autores (VIANA, 2006, RIBAS, 2006), a digestão anaeróbia é um efetivo meio de remoção da carga orgânica da vinhaça, pois produz biogás, que pode ser prontamente utilizado pela indústria do álcool. Outra vantagem da digestão anaeróbia, quando comparada com métodos aeróbios convencionais, é a baixa produção de lodo biológico, sendo aproximadamente 50% da DQO convertida em biogás e 10% em lodo (SPEECE, 1996; STAFFORD, 1992), enquanto que, no tratamento aeróbio, 50% da DQO é convertida em lodo (SPEECE, 1996; FRANCISCO Jr *et al*, 1987).

De acordo com VIANA (2006), os polissacarídeos presentes na vinhaça são hidrolisados a açúcares e estes fermentados a piruvatos. O piruvato é então catabolizado a acetato, CO₂ e H₂ ou a propionato (via lactato), butirato ou etanol. Se ao invés de polissacarídeos, houver lipídeos para serem catabolizados pelas bactérias fermentativas, estes produzem gliceróis e galactose para serem fermentados ou outros ácidos graxos de cadeias longas como estearatos, palmitatos e isovaleratos, dependendo da composição do resíduo. Em um segundo estágio, os produtos do primeiro estágio de degradação da vinhaça são oxidados anaerobiamente a acetato ou acetato e CO₂ por bactérias acetogênicas. Nesse estágio também ocorre a produção de

metano por arqueas metanogênicas que produzem H₂. As arqueas metanogênicas estão diretamente envolvidas nos estágios finais da digestão anaeróbia e são de suma importância para o processo, pois permitem a estabilização da matéria orgânica no resíduo. Existem vários grupos de arqueas produtoras de metano, e cada grupo é responsável pela degradação de certos tipos de compostos orgânicos. Assim, em uma digestão completa, vários tipos de arqueas metanogênicas diferentes são necessários.

O desenvolvimento de técnicas de tratamento da vinhaça é de grande importância para o Brasil, dado o volume produzido desse resíduo. Como anteriormente mencionado, uma usina produz em média 800 m³ por dia de etanol, ou seja, da ordem de 10.000 m³ de vinhaça, com concentrações mássicas variando de 50 a 100 g/L de matéria orgânica (VIANA, 2006). Apesar disso, no Brasil, a aplicação de tratamento biológico ou físico-químico à vinhaça ainda é incipiente. Nesse sentido, o sistema de tratamento deve ser robusto, capaz de assimilar grandes vazões de afluentes e altas cargas de matéria orgânica, intermitência dos processos e sazonalidade das safras. Em geral, o tratamento biológico possui baixos custos de implantação e operação comparados a outras tecnologias, e reatores de alta taxa podem ser aplicados de modo a maximizar o tempo de residência celular e minimizar o tempo de detenção hidráulica através da imobilização da biomassa (VIANA, 2006).

Existem diversos estudos na literatura científica que relatam o tratamento biológico da vinhaça, preferencialmente pela rota anaeróbia. GAZETTA e CELLIGOI (2006) apresentaram um estudo sobre diferentes combinações de melão/vinhaça como substrato para produção de proteína e lipídios por microrganismos. No trabalho realizado os autores utilizaram como culturas puras quatro linhagens de leveduras, sendo: *Cândida lipolytica*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Saccharomyces cerevisiae* e uma levedura isolada de lagoas de vinhaça a qual denominaram como LLV98. Os meios utilizados nos estudos tiveram a seguinte composição: a) 50% melão e 50% vinhaça; b) 25% melão e 75% vinhaça e c) 75% melão e 25% vinhaça. Os experimentos foram realizados em mesa rotativa em erlenmeyers contendo 50 mL de solução a 28°C±2°C a uma agitação de 180rpm. Todos os experimentos foram realizados por um período de tempo de aproximadamente 50 horas. Segundo os pesquisadores, a maior produção de proteína na biomassa foi obtida por *S. cerevisiae* (50,35%) seguida por *R. mucilaginosa* (41,96%) na relação de 25% de melão e 75% de vinhaça. A melhor produção de lipídeos totais, com rendimento acima de 26%, foi

obtida com *S. cerevisiae* e *C. glutamicum* nos meios de cultura com a proporção 50%:50% de melão e vinhaça.

GARCÍA *et al.* (1997) apresentam a utilização de culturas de *Aspergillus terreus* e *Geotrichum candidum* para a remoção de fenol presente na vinhaça. A vinhaça utilizada nos estudos era esterilizada e apresentava uma DQO de 83000 mg/L e uma concentração de fenóis totais de 469 mg/L. Os cultivos foram realizados aerobiamente, sendo os valores de pH mantidos entre 4,5 a 6,5. Os autores mostraram que os fungos *Aspergillus terreus* e *Geotrichum candidum* conseguem degradar o fenol presente na vinhaça sem a necessidade de suplementação de nutrientes. A redução de DQO foi de 72,2 % para ambos microrganismos e com relação aos fenóis totais o *Aspergillus terreus* degrada 34% do valor inicial enquanto que o *Geotrichum candidum* degrada 30,5%.

3.3. GLICEROL

Segundo ARRUDA *et al.* (2007) o glicerol, também conhecido como 1,2,3 propanotriol ou glicerina, foi descoberto por Scheele em 1779 durante o processo de saponificação do azeite de oliva. Mais tarde, em 1858, Pasteur observou a formação deste composto como um subproduto da fermentação alcoólica, em concentrações de 2,5 - 3,6% do conteúdo de etanol (REHM, 1988), podendo ser o glicerol o segundo maior produto formado durante este tipo de fermentação (TOSETTO e ANDRIETTA, 2003).

O glicerol é um poliálcool o qual está presente em diferentes espécies, incluindo plantas, protistas unicelulares e mamíferos (BRISSON *et al.*, 2001). No entanto, é difícil encontrar o glicerol na sua forma livre nesses organismos, pois geralmente o mesmo se encontra na forma de um triglicerídeo combinado a ácidos graxos, como o oléico, palmítico e esteárico. Grandes quantidades de glicerol podem ser encontradas em óleos ou azeites como o de coco, dendê, soja, algodão e oliva, bem como em gorduras de animais como a banha de porco e sebo (MORRISON, 1994).

O termo glicerol aplica-se somente ao composto puro, 1,2,3 propanotriol, enquanto o termo glicerina aplica-se a produtos comerciais que contêm normalmente quantidades maiores ou iguais a 95% de glicerol (MORRISON, 1994). No caso da

utilização do glicerol em humanos, como componente em formulações farmacêuticas, por exemplo, a terminologia encontrada em sua especificação deve ser glicerol USP (MORRISON, 1994). O glicerol, desde 1959, é reconhecido como substância atóxica, permitido como aditivo em alimentos e remédios, e também considerado como substância “GRAS” (Generally Regraded as Safe) pelo FDA (“*Food and Drug Administration*”) dos Estados Unidos, e permitido em alimentos enlatados. No Brasil, seu uso em produtos alimentícios é assegurado pela Resolução de nº 386, de 5 de Agosto de 1999 (ANVISA).

Dentre as características físico-químicas do glicerol (Tabela 3.3), destacam-se as propriedades de ser um líquido oleoso, incolor, viscoso e de sabor doce, solúvel em água e álcool em todas as proporções e pouco solúvel em éter, acetato de etila e dioxano e insolúvel em hidrocarbonetos (LOPES *et al.*, 1999). Devido à combinação de uma série de suas propriedades, incluindo aquelas físico-químicas e a atoxicidade (JACKLOBSON *et al.*, 1989), o glicerol é uma substância com grande variedade de aplicações.

Tabela 3.3. Propriedades físico-químicas do glicerol. (Fonte: ARRUDA *et al.*, 2007).

Massa molar	92,09 g/mol
Densidade (glicerol 100%) 25°C	1262 kg/m ³
Viscosidade 20°C	939 cP
Ponto de ebulição (1 atm)	290°C
Ponto de fusão	18°C
Ponto de inflamação	177°C
Tensão superficial 20°C	63,4 mN/m
Calor específico (glicerol 99,94%) 26°C	2435 J/kg
Calor de evaporação 55°C	88,12 J/mol
Calor de dissolução	5,8 kJ/mol
Calor de formação	667,8 kJ/mol
Condutividade térmica	0,28 W/(m.K)

Todo o glicerol produzido no mundo, até 1949, era proveniente da indústria de sabão. Atualmente, 70% da produção de glicerol nos Estados Unidos ainda provêm dos glicerídeos (óleos e gorduras naturais) e, o restante, da produção do glicerol sintético (subproduto da fabricação de propileno), da produção de ácidos graxos e

também de ésteres de ácidos graxos (Biodiesel). Apesar das inúmeras aplicações conhecidas, com o aumento da produção de biodiesel, a oferta de glicerol vem superando gradativamente a sua demanda, o que tem feito o preço de mercado do produto diminuir significativamente. (CARVALHO *et al.*, 2007). Em 2000, a produção mundial de glicerol foi de 800 mil toneladas, sendo que 10% disto foram oriundos de indústrias responsáveis pela produção de biodiesel. (CARVALHO *et al.*, 2007).

3.4. BIOMASSA ÁCIDOGÊNICA (INÓCULO I)

Recorrendo à literatura, há a indicação de que algumas espécies de microrganismos possivelmente se destacariam na produção de hidrogênio. Dentre eles, pode-se citar: *Klebsiella sp.*, que é uma espécie envolvida com a produção de hidrogênio a partir de carboidratos (HUNG *et al.*, 2007) sendo que esta não está diretamente relacionada com a produção de hidrogênio, mas com rotas de consumo de O₂, criando condições favoráveis para a produção anaeróbia de hidrogênio via *Clostridium sp.* (FERNANDES, *et al.*, 2008); *Bacteroides sp.*, que são microrganismos associados com a produção de hidrogênio (REN, *et al.*, 2007); *Ethanoligenbacterium sp.*, *Clostridium sp.* e *Spirochaetes*, sendo que o aumento das populações está associado com o aumento da velocidade de produção de hidrogênio (HAWKES *et al.*, 2008); *E. cloacae*, *Clostridium sp.* e *C. acetobutyricum* reconhecidas como bactérias produtoras de AGV's e hidrogênio (MAINTINGUER, *et al.*, 2008).

3.5. GRÃOS DE KEFIR (INÓCULO II)

Grãos de Kefir são conglomerados simbióticos formados de bactérias e fungos, (Figura 3.2) utilizados na fermentação do leite, ou de substratos alternativos através de atividades metabólicas (WITTHUHN *et al.*, 2004).

A composição da população dos grãos pode diferir, dependendo da origem ou dos diferentes métodos de cultivo. Alguns microrganismos estão sempre presentes, mas outros nem sempre são encontrados, dependendo do método de cultura e do substrato utilizado (MOREIRA *et al.*, 2008).



Figura 3.2. Estrutura dos grãos de Kefir (“Kefir de água”)

Os grãos de Kefir podem ser cultivados em açúcar, leite ou sucos de frutas, sendo sua coloração dependente do substrato utilizado para cultivo. Os grãos são amarelos claros quando cultivados em leite. Se crescidos em açúcar mascavo, são ocre e pardos, ou purpúreos se cultivados em suco de uva. Em qualquer tipo de leite, os grãos podem ser fermentados, como de vaca, ovelha ou cabra, de coco, arroz e soja ou ainda água com açúcar (“*Kefir de água*”), porém, é tradicionalmente preparado a partir do leite de vaca. Para o caso do Kefir à base de leite animal, o leite utilizado, normalmente fresco, pode ser cru, pasteurizado, desnatado, semidesnatado ou integral, com ou sem nata (MOREIRA *et al.*, 2008).

Apresentando mais de 40 tipos de microrganismos (bactérias e leveduras), o Kefir é considerado um alimento probiótico por auxiliar a regulação do funcionamento do intestino e a melhora do sistema imunológico. Tem sido bastante estudado por causa de seu poder antimicrobiano, anti-fungos, antitumoral, além de benefícios aos sistemas digestivo e imunológico e na redução do colesterol (MOREIRA *et al.*, 2008).

Como já salientado, a composição do grão ou suas características gerais, são, em parte, dependentes da cultura mãe da qual a colônia foi obtida, modo de preparo, condições de armazenamento, idade da cultura de fermentação, dentre outros fatores.

Os grãos de Kefir fixados em formol e vistos ao microscópio revelam uma estrutura complexa formada por (DOM’S SITE, 2007):

- 4,4% de lipídeos;
- 12,1% de cinzas;

- 45,7% de mucopolissacarídeo;
- 34,3% de proteínas totais (27% insolúvel, 1,6 solúvel e 5,6% aminoácidos livres);
- Vitamina do complexo B;
- Vitamina K;
- Triptofano;
- Cálcio, fósforo e magnésio.

DORNELLES e RODRIGUES (2006) utilizaram caldo de cana fresco diluído como fonte de substrato. Os ensaios foram realizados à temperatura ambiente (30°C), sendo que a fermentação teve duração de 7 dias. As concentrações de grãos de Kefir variaram de 25 à 50%, para uma concentração de sacarose que variava de 20 à 120 g/L. Ao fim dos ensaios foi observada a formação de etanol e de ácidos orgânicos.

STIVAL (2009) utilizou grãos de Kefir analisando a viabilidade do processo para conversão de glicerol em sacarídeos, polissacarídeos e outros compostos de valor agregado, confirmada pela relação qualitativa do glicerol inicial e final e a presença e identificação de substâncias através de Cromatografia gasosa /Espectrometria de massa. Foi quantificada e analisada a geração de gás nos ensaios anaeróbios bem como o teor de etanol nos sistemas aeróbios e anaeróbios.

3.6. PRODUÇÃO BIOLÓGICA DE HIDROGÊNIO (H₂) E FATORES ASSOCIADOS

A produção biológica de hidrogênio pode ocorrer por meio de dois processos: fotossíntese e fermentação, sendo esta última tecnicamente mais simples, sendo que o hidrogênio é obtido de carboidratos presentes em águas residuárias (HAN e SHIN, 2004). Assim, através da etapa fermentativa da digestão anaeróbia, microrganismos acidogênicos decompõem a matéria orgânica em H₂, CO₂ e ácidos graxos voláteis de cadeia curta.

Alguns fatores como temperatura, pH, forma de inoculação, microrganismos associados, rotas metabólicas, configuração do reator, entre outros, podem influenciar no processo de produção de H₂ (FERNANDES, 2008).

Especificamente sobre alguns desses fatores, tem-se que ZHANG (2006) observou que a temperatura influencia na produção de hidrogênio. Muitos trabalhos

determinam temperaturas distintas, sendo elas geralmente relacionadas ao tipo de microorganismo envolvido, já que cada tipo tem sua temperatura ótima de atuação, assim como os consórcios microbianos (NGUYEN *et al.*, 2008).

O pH também é um parâmetro operacional de grande importância para a produção de hidrogênio, pois conforme constataram FANG e LIU (2002), a velocidade de produção de hidrogênio e a ação dos microrganismos hidrogenotróficos (consumidores de hidrogênio) são diretamente afetadas pelo pH. Alguns pesquisas mostram que o pH otimizado para produção de hidrogênio está na faixa de 5,0 e 6,5 (MIZUNO *et al.*, 2002; LIN e LAY, 2004; CHANG e LIN, 2003). Entretanto, muitos apontam para um único valor de 5,5 (FANG e LIU, 2002; MU *et al.*, 2007; SHIN, 2007), mesmo trabalhando com culturas diferentes.

O processo de fermentação para geração hidrogênio pode ocorrer com emprego de culturas mistas ou puras (HALLENBECK, 2004), sendo o efeito do inóculo é considerável, especialmente em trabalhos em escala de bancada.

Pode-se empregar vários tipos de água residuária, variando assim o tipo de substrato, como é reportada na literatura especializada, em que principalmente são utilizadas águas residuárias que continham celulose, pentose e xiloses (TAGUCHI *et al.*, 1995); glicerol, resíduo do processo de fabricação do biodiesel (ITO *et al.*, 2005); água residuária de laticínio (MOHAN *et al.*, 2008); subprodutos do processamento da farinha de trigo (HAWKES *et al.*, 2008); melaço (LI *et al.*, 2007); resíduos sólidos de alimentos (HAN, 2004); efluente de indústria de papel (VAZQUEZ *et al.*, 2005); esgoto doméstico (VAN GINKEL *et al.*, 2005); entre outros.

LOGAN *et al.*, (2002) observaram diferentes tempos de adaptação para diferentes substratos em reatores operados em batelada (glicose, sacarose, melaço, lactato, celulose e extrato de batata) e as máximas produções foram obtidas para o melaço e glicose, seguido da sacarose, sendo que todos os sistemas partiram com 1g/L de DQO.

TEMUDO *et al.* (2008) avaliaram o potencial do glicerol no processo fermentativo com a aplicação de uma “cultura mista” para produção de produtos químicos, sendo que o experimento foi realizado em um reator com capacidade de 2 litros e 8 horas de fermentação, mantendo uma temperatura de 30°C e pH controlado em 8 por um titulador automático. O ambiente foi anaeróbio. Na fermentação com

uma concentração de 4 g/L de glicerol foram encontrados os seguintes produtos e suas respectivas proporções: Acetato (5,5%), Formiato (10,0%), H₂ (0,4%), 1,3-propanodiol (27,8%), Succinato (1,1%) e Etanol (46,2%). Para investigar a fermentação de glicerol, a maioria dos estudos tem aplicado culturas puras, as mais conhecidas são *Klebsiella aerogenes* ou *Clostridium butyricum*.

SEIFERT *et al.* (2009) realizaram experimentos em batelada, onde foram variadas as concentrações tanto de glicerol, quanto de inóculo (lodo de esgoto sanitário). O pH inicial utilizado foi de 6, e os experimentos foram realizados a 37°C. Os resultados mostraram que é possível a produção de hidrogênio a partir do glicerol, sendo que as melhores produções variaram de 0.345 a 0.715 L H₂/L de glicerol. Além disso foi observada a produção de 1,3-propanodiol, ácidos butírico, acético e láctico, como também etanol.

FERNANDES *et al.* (2010) teve como objetivo avaliar a potencialidade da produção de hidrogênio a partir de águas residuárias de diferentes origens (esgoto sanitário, vinhaça gerada na produção de etanol de cereais e glicerol, resíduo do processamento do biodiesel). Os ensaios foram realizados em reatores em batelada e sacarose foi usada como substrato controle. O inóculo empregado nos sistemas originou-se de biomassa proveniente de reatores de leito fixo operados para produzir hidrogênio. Hidrogênio foi gerado a partir de todas as águas residuárias estudadas (200 mL H₂/ g DQO para o esgoto sanitário; 579 mL H₂/ g DQO para a vinhaça; 200 mLH₂/gDQO para o glicerol e 270 mLH₂/gDQO para a sacarose). Além disso, nos ensaios foram avaliadas as produções de AGV`s para cada um dos efluentes.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A proposta de montagem dos ensaios, como mostra a Figura 4.1, consistiu em frascos lacrados com volume total de 2L sendo que o volume reacional foi de 1L e o headspace de 1L. Os efluentes utilizados foram: vinhaça, glicerol e esgoto sanitário, sendo que também foram realizados ensaios controle, com um meio sintético contendo sacarose como fonte de carbono, Todos os experimentos, com os inóculos I e II, foram realizados em duplicata.

Além disso, uma etapa experimental adicional foi feita, sendo que esta consistiu na utilização dos produtos gerados na fase de produção de hidrogênio em reatores inoculados com biomassa metanogênica. As concentrações de biomassa metanogênica foram as mais próximas possíveis das concentrações de biomassa acidogênica utilizadas (250 mg/L).

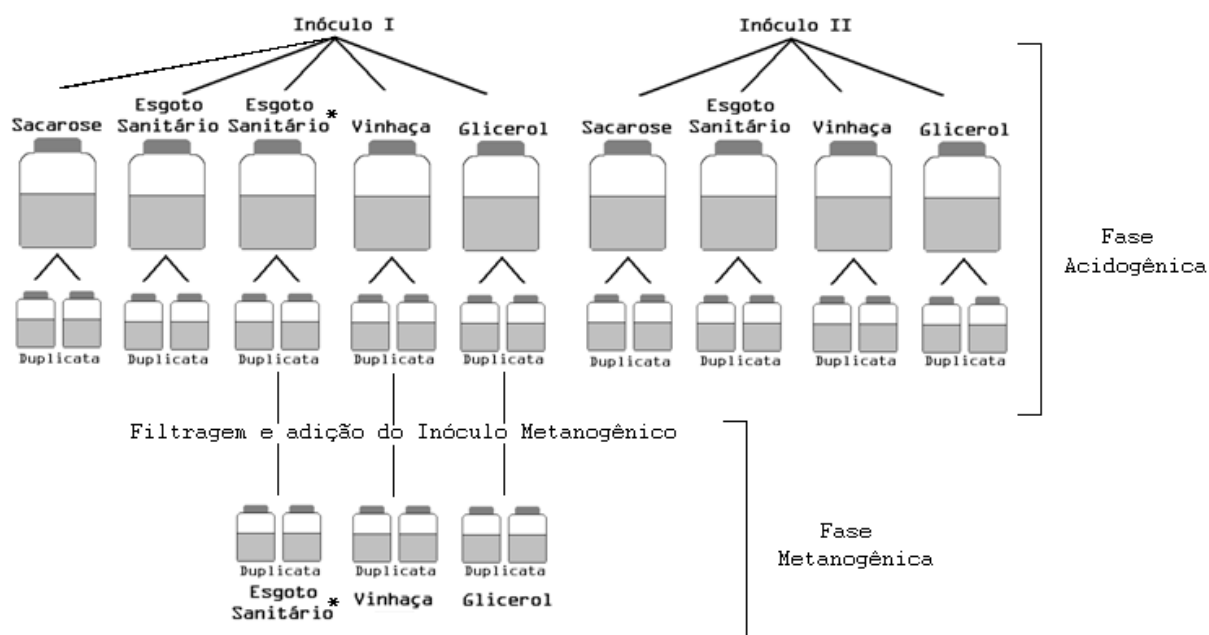


Figura 4.1. Fluxograma ilustrativo referente ao desenvolvimento do projeto, com os efluentes que serão utilizados para os dois inóculos e para o inóculo Metanogênico.

Como pode ser observado, apenas para o inóculo I foi testado esse sistema de reaproveitamento do efluente, sendo essa apenas uma etapa complementar, para analisar a viabilidade de um tratamento metanogênico posterior à fase acidogênica.

Além disso, observa-se que foram realizados dois ensaios distintos com esgoto sanitário com o inóculo I, sendo que o segundo ensaio (destacado na Figura 4.1 com um *) foi realizado para que fosse possível a elaboração da etapa metanogênica com essa água residuária. Essa idéia surgiu ao longo da realização dos experimentos, depois de terem sido realizados os dois ensaios iniciais (com sacarose e esgoto sanitário). Assim, os dois ensaios realizados com o esgoto sanitário serão tratados nesse trabalho.

Devido a alguns problemas na elaboração da solução de sacarose no dia do experimento, o ensaio metanogênico controle foi descartado.

A seguir estão descritos os procedimentos de preparação dos ensaios, com especificações dos materiais e métodos utilizados.

4.1. PREPARAÇÃO DO MEIO NUTRIENTE

O meio nutriente foi preparado segundo DEL NERY (1987). A composição exata do meio utilizado nesse experimento sofreu pequenas modificações em relação à concentração do meio original, sendo que estas modificações estão apresentadas em FERNANDES, B. *et al.* (2010). Essa composição pode ser vista na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Composição do Meio nutriente utilizado e sua respectiva concentração no reator (adaptação do meio Del Nery, 1987)

Composto	Concentração (mg/L)
Dióxido de selênio	0,036
Fosfato de potássio monobásico	5,36
Fosfato de potássio dibásico	1,3
Fosfato de sódio dibásico	2,2
Cloreto de cálcio	2,06
Sulfato de níquel	0,5
Sulfato ferroso	2,5
Cloreto férrico	0,25
Cloreto de cobalto	0,04
Uréia	125
Bicarbonato de sódio	500

4.2. CARACTERIZAÇÃO DO INÓCULO I

O Inóculo I utilizado foi um lodo anaeróbio proveniente de reatores contínuos de leito fixo e fluxo ascendente, operando com uma relação Carbono/Nitrogênio de 40, alimentado com solução de sacarose às mesmas condições que geraram o lodo para o experimento de FERNANDES et al. (2010) . Após a retirada da biomassa desses reatores, o Inóculo 1 foi centrifugado a 8.000 rpm, com a centrífuga apresentada na Figura 4.2. Na Figura 4.3 pode-se ver uma foto do Inóculo 1 concentrado.



Figura 4.2. Centrífuga utilizada para concentrar o Inóculo 1.



Figura 4.3. Inóculo I concentrado.

Para sua preparação e posterior uso nos reatores, foi quantificado o teor de sólidos desse concentrado, sendo os resultados apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2. Quantidade de sólidos presentes no Inóculo I concentrado.

Inóculo I Concentrado	
Sólidos Totais	35,64 g/L
Sólidos Fixos	1,72 g/L
Sólidos Voláteis	33,92 g/L

Assim, com um elevado teor de sólidos, uma simples diluição foi feita a fim de que a quantidade de Sólidos Voláteis (SV) ficasse em torno de 250 mg/L, sendo esta diluição feita com uso de água destilada. Para a quantificação de sólidos foram utilizadas cápsulas de cerâmica e béqueres, além da utilização de uma estufa (Figura 4.4) e de uma mufla (Figura 4.5). As metodologias utilizadas estão de acordo com *Standard Methods* (APHA, 1998), sendo que estas análises já são realizadas rotineiramente no Laboratório de Processos Biológicos (LPB), da USP São Carlos.



Figura 4.4: Estufa utilizada nas análises



Figura 4.5: Mufla utilizada nas análises

4.3. CARACTERIZAÇÃO DO INÓCULO METANOGENÊNICO

O inoculo utilizado originou-se de reator UASB utilizado para tratamento de águas residuais de abatedouro de aves. Analogamente à caracterização do inóculo I, foi quantificado o teor de sólidos desse concentrado, sendo os resultados apresentados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3: Quantidade de sólidos presentes no Inóculo Metanogênico concentrado.

Inóculo Metanogênico Concentrado	
Sólidos Totais	38,4 g/L
Sólidos Fixos	2,1 g/L
Sólidos Voláteis	40,5 g/L

4.4. CARACTERIZAÇÃO DO INÓCULO II (GRÃOS DE KEFIR)

Com esse inóculo o procedimento de utilização e caracterização diferiu dos demais, pois, de acordo com POWELL (2006), a localização de alguns tipos de bactérias e fungos é claramente definida entre a superfície e o interior de um grão de Kefir, estando esta distribuição provavelmente relacionada à atividade específica de cada microrganismo no processo fermentativo.

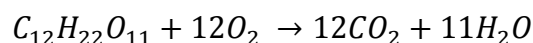
Sendo assim, não foi feita nenhuma solução concentrada desse inóculo, mas sim foram utilizados os grãos de forma natural nos ensaios. Portanto, para o controle da quantidade de grãos a ser utilizada, onde a concentração de biomassa deveria ser em torno de 250 mg/L, como proposto inicialmente, foi feita uma análise da quantidade média de biomassa, medida em termos de SV, encontrada em cada porção de massa de grãos, que era peneirada antes do procedimento para retirar o excesso de água.

4.5. CARACTERIZAÇÃO DOS EFLUENTES

Os efluentes utilizados foram: solução de sacarose, esgoto sanitário, vinhaça e glicerol. As procedências de cada um dos efluentes assim como as características gerais estão apresentadas a seguir.

4.5.1. Solução de Sacarose

Para a solução de sacarose, alguns cálculos foram feitos a fim de obter a DQO de aproximadamente 250 mg/L. Esses cálculos foram obtidos de acordo a seguinte reação:



Com base na reação foi calculada a massa para preparo de 1L de solução. Sendo assim, a massa utilizada foi de 0,1028 g, de acordo com os cálculos efetuados a fim de se atingir o valor de DQO desejado.

A solução foi então preparada com o auxílio de um balão volumétrico, balança analítica de alta precisão e outras vidrarias comuns como béqueres, bastões de vidro, etc.

4.5.2. Esgoto Sanitário

O esgoto sanitário utilizado foi retirado de uma miniestação de tratamento, localizada na Universidade de São Paulo (Campus II – São Carlos, Prédio da Engenharia Ambiental). Essa miniestação foi construída especialmente para fins de pesquisa, que são desenvolvidas no local. A estrutura da miniestação pode ser observada na Figura 4.6.



Figura 4.6. Miniestação. Destaque para o tanque de armazenamento de esgoto, onde foi feita a coleta.

4.5.3. Vinhaça

A vinhaça utilizada foi retirada da Usina São Martinho, localizada em Pradópolis – SP. Ela é um efluente gerado da produção de etanol, portanto é uma *vinhaça de mosto de caldo*.

4.5.4. Glicerol

O glicerol utilizado foi o efluente gerado na produção de biodiesel pela Indústria Granol, unidade de biodiesel, localizada em Anápolis - GO. A caracterização do glicerol e dos outros três efluentes citados pode ser vista na Tabela 4.4.

Tabela 4.4. Caracterização dos efluentes utilizados.

Caracterização	Esgoto Sanitário	Esgoto Sanitário *	Vinhaça	Glicerol
DQO (mg/L)	467,64	261,85	10.200	1.108.230
pH	6,71	6,96	3,8	ND
Alcalinidade (mg/L $CaCO_3$)	150,94	124	0	ND
ST (mg/L)	456	1.971	15.830	ND
SSV (mg/L)	344	1.612	12.065	ND
SF (mg/L)	112	359	3.765	ND
N-Total (mg/L N)	35,15	42	360	0
P-Total(mg/L PO_4^{3-})	9,03	4,7	163	0

DQO – Demanda Química de Oxigênio; ST – Sólidos Totais; SV – Sólidos Voláteis; SF – Sólidos

Fixos; N – Nitrogênio; P – Fósforo; ND – Não determinado.

4.6. PREPARAÇÃO DAS BATELADAS – FASE ACIDOGÊNICA

Com os efluentes, o meio nutriente e o inóculo já preparados, passou-se então para o preparo dos ensaios.

A preparação de cada frasco Duran de 2L se iniciou com uma lavagem adequada e na separação das tampas de borracha. Logo após, foram adicionados em sequência, 110mL do Inóculo, para uma concentração de sólidos de aproximadamente 250 mg/L, 990mL dos efluentes, com a DQO aproximada de 250 mg/L, e o meio nutriente.

Após a preparação do volume reacional, com o auxílio de uma bureta eletrônica, um béquer de 2L, um agitador e um Peagâmetro digital, foi adicionado

ácido clorídrico ou bicarbonato de cálcio para que o pH das soluções completas ficasse próximo de 5,5. Observa-se que com os valores acima foram preparados 1,1L de volume reacional. Isso foi feito pois antes do fechamento dos frascos foi retirada uma amostra de 100mL desse volume fazendo com que o volume reacional ficasse em 1L, sendo preservadas as relações propostas no trabalho.

Como essa amostra consiste em uma solução Inóculo – Efluente – Meio Nutriente, ela foi analisada como o tempo 0h do experimento.

Para a remoção do oxigênio e estabelecimento da anaerobiose no sistema, foi fluxionado argônio na solução até completa troca de atmosfera do volume de “headspace” (Figura 4.7). Os reatores foram acondicionados em uma câmara escura sem agitação e mantidos a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.



Figura 4.7. Fotos dos frascos sendo fluxionados com gás Argônio, possibilitando sua anaerobiose.

4.7. PREPARAÇÃO DAS BATELADAS – FASE METANOGENÉTICA

Como pode ser visto no fluxograma da Figura 4.1, três ensaios com o inóculo I tiveram seu efluente reutilizado para implementação de uma fase metanogênica complementar.

Para isso, os reatores, após as 36 horas da fase acidogênica, foram abertos e os produtos solúveis foram filtrados para a retirada da biomassa acidogênica. Após a filtração com membrana de $1,2 \mu\text{m}$, sendo essa uma porosidade não muito adequada para retenção total das bactérias, os reatores foram novamente incubados com o meio nutriente descrito na Tabela 4.1, inoculados com lodo metanogênico, fluxionados com

argônio e fechados gerando sistemas com 1L de “headspace” e 1L de meio reacional.

Os reatores foram novamente mantidos sem agitação, em uma câmara escura, a aproximadamente 25°C. Periodicamente, como na fase acidogênica, foi medida a pressão no interior dos frascos e amostras de biogás e da fase líquida eram retiradas dos sistemas.

4.8. MÉTODOS ANALÍTICOS

Sobre os métodos analíticos, a composição do biogás (hidrogênio, dióxido de carbono e metano) foi determinada por cromatografia gasosa (GC 2010 Shimadzu – Figura 4.8) (Steneeson, 2004) usando detecção de condutividade térmica e argônio como gás de arraste. As temperaturas do injetor, detector e coluna foram mantidas a 30°C, 200°C e 230°C, respectivamente.

As concentrações dos álcoois foram medidas por cromatografia gasosa (GC 2010 Shimadzu – Figura 4.9), equipada com detector de ionização de chama e sistema automático de introdução de amostra para COMBI-PAL “headspace” (modelo AOC 5000) e coluna HP-INNOWAX de 30m x 0.25mm x 0.25µm de espessura.

Os ácidos orgânicos foram analisados via um conjunto Shimadzu de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC – Figura 4.10) composto por uma bomba LC-10ADvp, uma válvula solenóide FCV-10ALvp, um forno CTO-10Avp (temperatura de trabalho de 62°C), um controlador SCL-10Avp, um detector de UV SPDM10Avp com arranjo de diodo de 205 nm e uma coluna de troca iônica Aminex HPX-87H (0,3 m de comprimento e 7,8 mm de diâmetro interno). O eluente foi H₂SO₄ 0,005 M com fluxo de 0,8 mL/min.

Os parâmetros sólidos suspensos voláteis (SSV), pH, COT e DQO foram monitorados de acordo com a metodologia estabelecida no *Standard Methods* (APHA, 1998), sendo que estas análises já são realizadas rotineiramente no Laboratório de Processos Biológicos (LPB), com as metodologias bem definidas. As concentrações de carboidratos foram determinadas por método colorimétrico (DUBOIS, 1956).



Figura 4.8: Cromatógrafo GC Shimadzu, utilizado na análise de álcoois e ácidos. Destaque para o local onde as amostras são armazenadas.



Figura 4.9: Cromatógrafo GC-Shimadzu, utilizado na análise de hidrogênio e de outros gases. Destaque para o local onde é efetuada a injeção do gás.



Figura 4.10: Conjunto Shimadzu de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

4.9. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Para organização da obtenção dos resultados durante o experimento foram feitos, em todos os ensaios, planos de amostragem que relacionavam todas as análises a serem feitas durante o experimento. Sendo assim, foi fixado que cada retirada de amostras líquidas, após o fechamento do frasco, seria de aproximadamente 20mL,

totalizando ao final do experimento uma retirada que não ultrapassasse muito uma quantia de 10% do volume reacional, ou seja, 100mL.

As análises de gás foram feitas periodicamente, com o auxílio de uma seringa, com a retirada do gás do “headspace” pelo topo dos frascos, visto que a tampa é constituída por uma região de borracha para permitir a penetração da agulha da seringa. Foi também medida periodicamente a pressão no interior dos frascos, para que fossem possíveis os cálculos mais exatos do volume de gás produzido. A Figura 4.11 representa esquematicamente os reatores e a forma de retirada de gás para as análises.

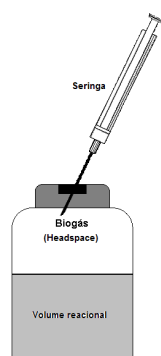


Figura 4.11: Esquema do reator em batelada

Além disso, a definição inicial da duração dos experimentos foi proposta de acordo com o trabalho realizado por FERNANDES, *et al* (2010), já citado na revisão da literatura, onde as produções máximas ocorreram em torno de 15 a 16 horas de experimento. Essa duração tinha previsão de aproximadamente 24 horas. Obviamente, caso os dados obtidos se comportassem de forma diferenciada, o Plano de Amostragem seria modificado, visando uma melhor obtenção de dados. Levando isso em consideração, os ensaios com o inóculo I foram estendidos para aproximadamente 36 horas, e os ensaios com o inóculo II foram estendidos para 126 horas, levando este último um maior tempo de adaptação da biomassa. Com o inóculo metanogênico as características seguiram as mesmas utilizadas para os inóculos acidogênicos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para melhor exposição dos resultados, eles serão apresentados em cinco tópicos. O primeiro será referente aos resultados dos dois primeiros ensaios com as soluções de sacarose e esgoto sanitário com o inóculo I. O segundo tópico é referente aos demais ensaios feitos com o inóculo I (esgoto sanitário*, vinhaça e glicerol), tratando apenas da fase acidogênica desses ensaios. O terceiro é referente aos ensaios com o inóculo II.

No quarto tópico são avaliados os resultados obtidos com os dois inóculos, com todos os efluentes utilizados.

Ressalta-se que nos gráficos de produção de gás foram utilizadas diretamente unidades de volume (mL). Isso foi feito, pois todos os ensaios foram realizados de forma similar, com as mesmas condições e com aproximadamente as mesmas concentrações de DQO e SSV, não sendo necessário relacionar os resultados com valores de DQO e SSV, por exemplo, para que fosse possível obter uma comparação entre as potencialidades de cada efluente.

Porém, no quarto tópico os resultados mais expressivos das produções de gás são relacionados aos valores de DQO e SSV, possibilitando uma melhor discussão com dados descritos na literatura.

O quinto e último tópico será dedicado à extensão feita no trabalho, com a utilização do inóculo Metanogênico após os ensaios da fase acidogênica com o primeiro inóculo.

5.1. BATELADAS COM INÓCULO I – SACAROSE E ESGOTO SANITÁRIO – FASE ACIDOGÊNICA

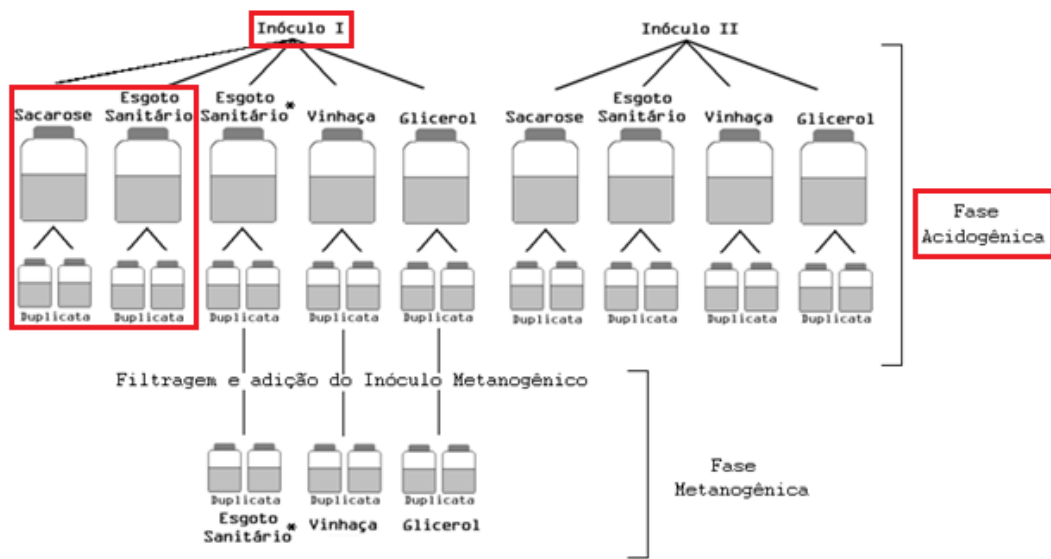


Figura 5.1: Fluxograma do trabalho com o destaque para a fase tratada no tópico 5.1.

Nas Figuras 5.2 e 5.3 pode-se ver o consumo de carboidratos, tanto para os ensaios com a solução de sacarose quanto para os ensaios com o esgoto sanitário. Nota-se que o consumo se deu em poucas horas de experimento (aproximadamente 24 horas), sendo os carboidratos, segundo HAWKES *et al.* (2008), compostos que constituem uma fonte preferencial de carbono orgânico para a produção de hidrogênio via fermentação. As remoções chegaram a aproximadamente 100% na solução de sacarose e 50% para o esgoto sanitário, que possivelmente apresenta tipos de carboidratos mais complexos.

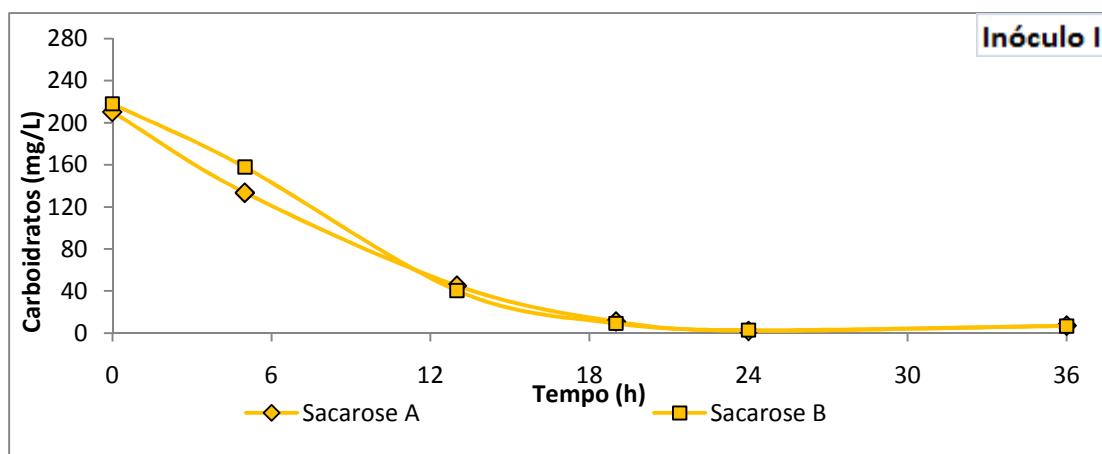


Figura 5.2. Concentração de carboidratos dada em termos de sacarose

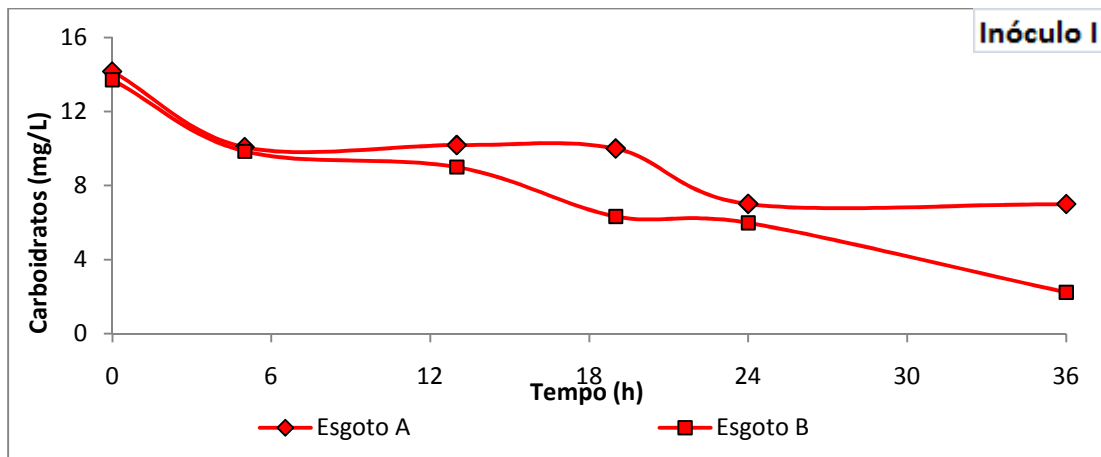


Figura 5.3. Concentração de carboidratos dada em termos de Esgoto Sanitário

Sobre a DQO, observou-se que ela não variou de forma considerável, e não houve uma remoção relevante de matéria orgânica, como pode ser observado na Figura 5.4. Outros autores também observaram baixas remoções de matéria orgânica em sistemas destinados à produção de hidrogênio, especificamente em reatores em batelada (VAN GINKEL, et al 2005). Essa baixa remoção se deve ao fato de que são gerados somente os intermediários da digestão anaeróbia (ácidos) e por tanto a matéria orgânica não é utilizada para a síntese de metano.

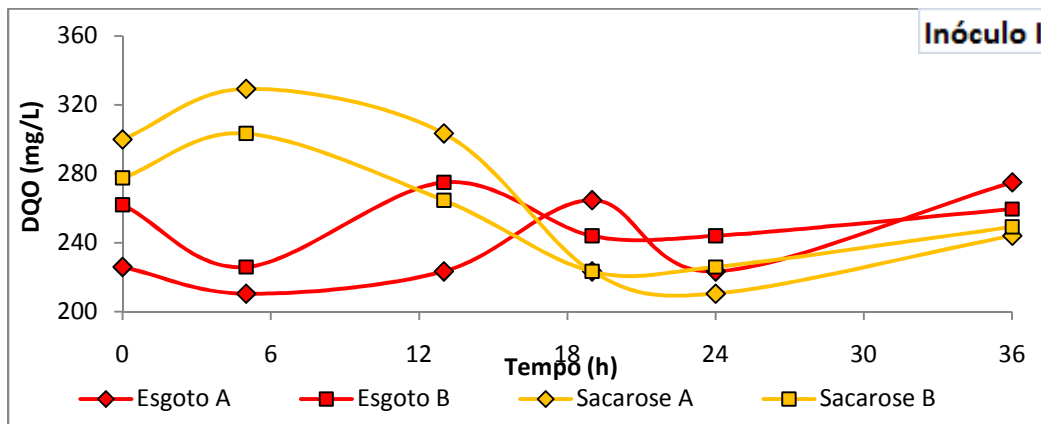


Figura 5.4. Variação da DQO durante os ensaios

A variação temporal da produção de hidrogênio e de gás carbônico para cada água residuária está apresentada nas Figuras 5.5 e 5.6, respectivamente.

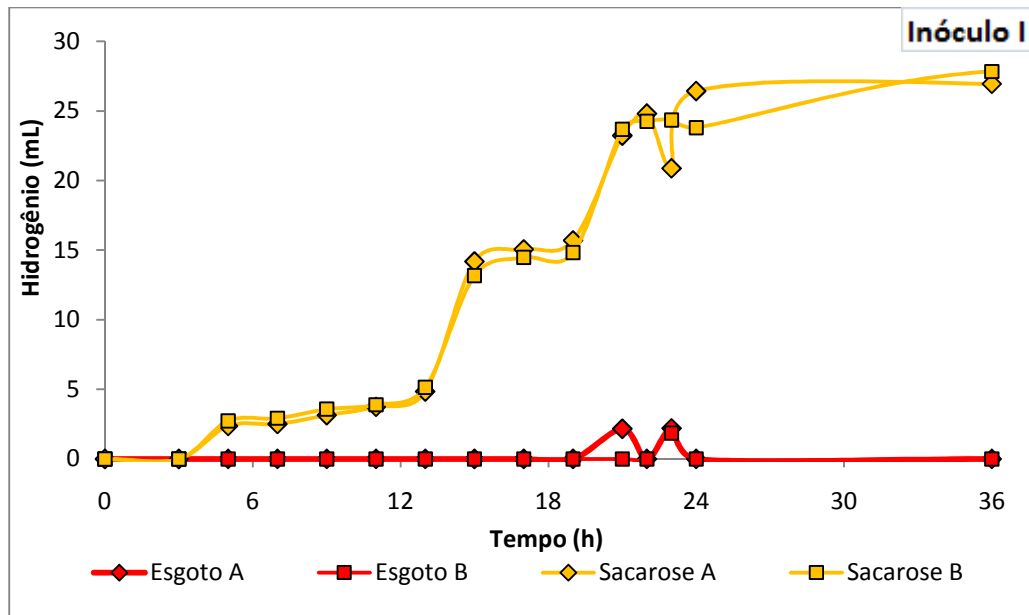


Figura 5.5. Variação temporal da concentração de Hidrogênio.

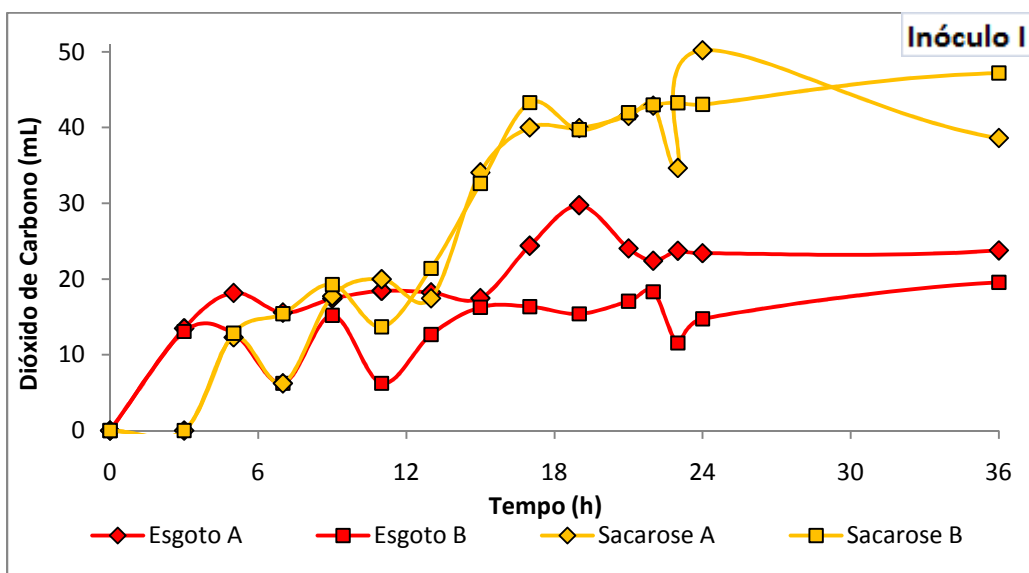


Figura 5.6. Variação temporal da concentração de Dióxido de Carbono.

Pode-se observar que a solução de sacarose, como era esperado, obteve uma boa produção de hidrogênio, chegando a uma produção máxima de aproximadamente 28 mL.

O esgoto sanitário apresentou dois pequenos picos de produção de hidrogênio em apenas um dos frascos da duplicata realizada, sendo que os valores máximos chegaram próximos de 3 mL. Constatado esses baixos valores de produção de hidrogênio, uma das explicações pode ser a baixa quantidade de carboidratos, que não

forneceu condições adequadas para a produção desse gás. Outra pode ser alguma interferência nas medições, que indicaram uma produção que pode não ter existido.

Sobre a análise de ácidos e álcoois, tem-se que as produções de Etanol, Ácido Acético e n-Butanol se destacaram no começo do experimento com a sacarose. Foi observada também a produção de Ácidos Propiônico e Butírico, por volta de 24 horas de experimento, coincidindo com o pico de produção de gás.

Recorrendo à literatura, WANG, L. *et al.*(2006) dizem que é comum o acúmulo de Ácido Propiônico quando há a produção de hidrogênio. Além disso, é dito que tal acúmulo pode ser prejudicial para a continuação da produção de hidrogênio e para o tratamento de águas residuárias, em ambientes anaeróbios, sendo que ele pode provocar uma mudança de pH que mudaria as características da fermentação que estaria ocorrendo.

Outros ácidos, como o Valérico, Isovalérico, Crotônico e Capróico, e álcoois, como Metanol e Isobutanol, não foram detectados na cromatografia gasosa.

Para o esgoto sanitário, a produção de Etanol, Ácido Acético e n-Butanol não se destacou da forma esperada no início do experimento. A explicação pode ser a baixa quantidade e qualidade dos carboidratos, que não forneceram condições adequadas para a produção desses compostos.

Sobre os Ácidos Propiônico e Butírico, tem-se que o Butírico não apareceu nas análises cromatográficas. Já o Propiônico começou a aparecer por volta de 24 horas de experimento, que foi onde o sistema começou a estabilizar a produção de gás. A produção de Ácido Acético também foi observada após as 24 horas de experimento.

Outros ácidos, como o Valérico, Isovalérico, Crotônico e Capróico, e álcoois, como Metanol e Isobutanol, também não foram detectados na cromatografia.

Rassalta-se que estes dados de ácidos e álcoois foram obtidos com o uso de cromatografia gasosa (Cromatógrafo GC Shimadzu). Nos próximos experimentos descritos, a análise de ácidos foi feita por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), o que dará uma maior segurança sobre as produções dos mais variados ácidos e uma maior discussão dos resultados, com a apresentação de perfis temporais e tabelas.

Sobre o crescimento de biomassa, a Tabela 5.1 mostra os valores iniciais e finais, sendo possível a constatação da variação de massa de microorganismos nos sistemas. Para esses ensaios não foi possível a realização de análises por microscopia ótica.

Tabela 5.1. Valores para a análise de sólidos – Inóculo I.

Sólidos	Inicial			Final		
	ST	SF	SV	ST	SF	SV
Sacarose A	155	10	145	285	35	250
Sacarose B	260	5	255	330	60	270
Esgoto A	285	0	285	325	25	300
Esgoto B	300	5	295	320	15	305

5.2. BATELADAS COM INÓCULO I – ESGOTO SANITÁRIO*, VINHAÇA E GLICEROL – FASE ACIDOGÊNICA

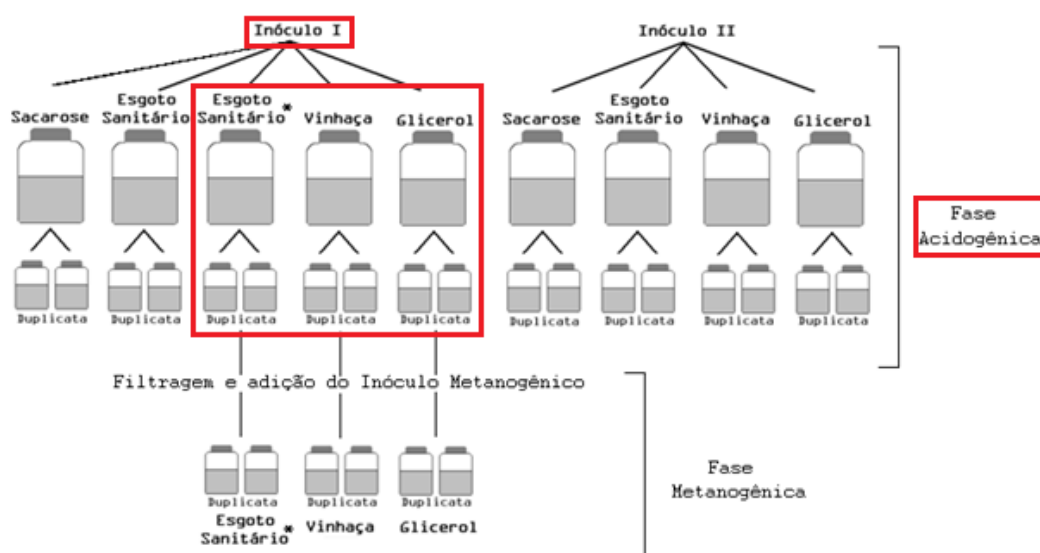


Figura 5.7. Fluxograma do trabalho com o destaque para a fase tratada no tópico 5.2.

Os resultados apresentados na Figura 5.8 mostram que durante as 36 horas do ensaio, em todos os sistemas, houve uma considerável degradação dos carboidratos. Destacando os ensaios com a vinhaça e o glicerol, que tinham uma maior quantidade de carboidratos em sua composição inicial (36 mg/L e 20 mg/L, respectivamente), tem-se que as remoções chegaram a valores em torno de 46% para a vinhaça e 25% para o glicerol.

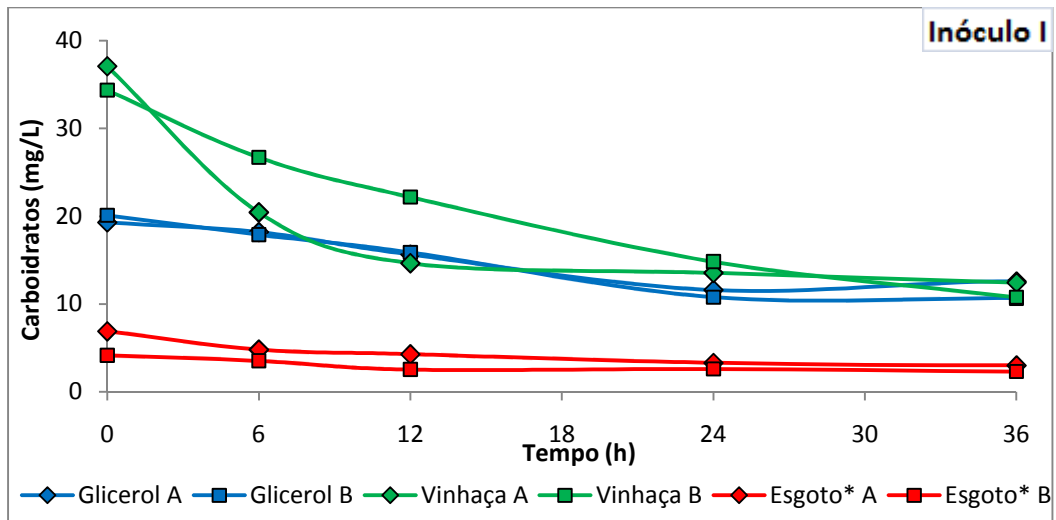


Figura 5.8. Concentração de carboidratos dada em termos de sacarose

Na Figura 5.9 constata-se que a concentração de matéria orgânica (medida como DQO) sofreu redução média de 22,5%, 32% e 16% para glicerol, vinhaça e esgoto, respectivamente. Essa redução incompleta da DQO indica que a matéria orgânica sofreu oxidação parcial, com acúmulo de compostos orgânicos intermediários da degradação anaeróbia, ou seja, os ácidos, que serão tratados de forma mais aprofundada posteriormente.

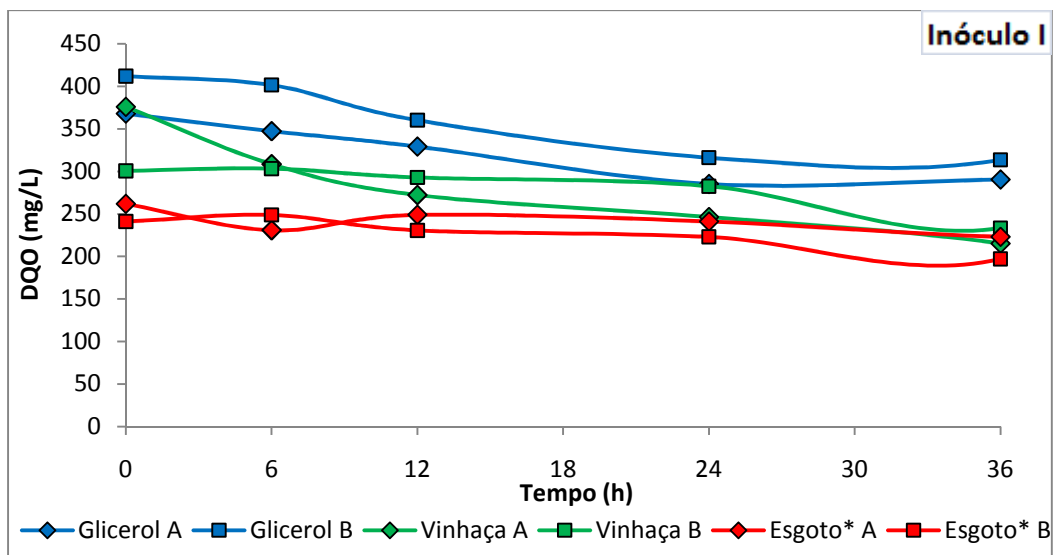


Figura 5.9. Concentração de matéria orgânica medida como mg/L de DQO

A Figura 5.10 mostra que, embora os valores da DQO inicial dos efluentes fossem similares, a concentração de carbono orgânico total (COT) foi muito maior em águas residuárias como glicerol e vinhaça. O baixo valor de COT obtido para o esgoto

possivelmente está relacionado à baixa concentração de compostos biodegradáveis no mesmo.

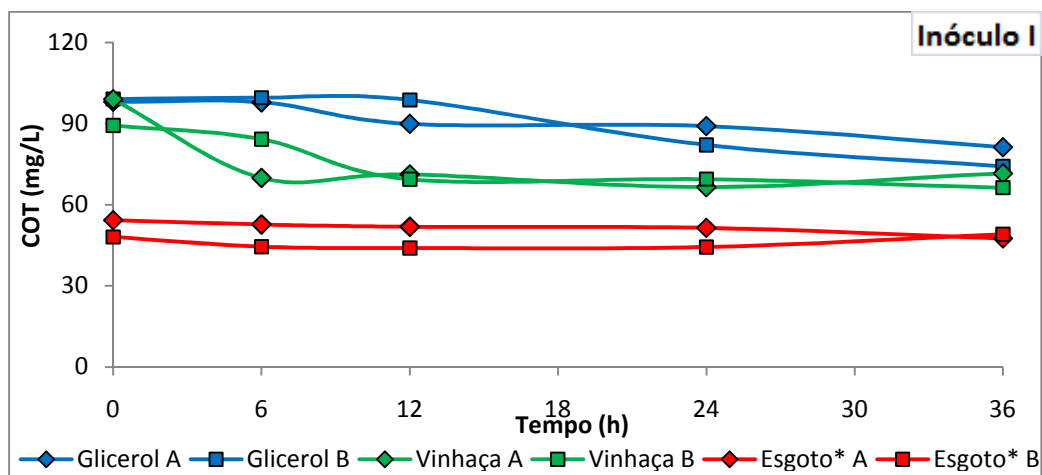


Figura 5.10. Carbono orgânico total (mg/L)

A variação temporal da produção de hidrogênio e gás carbônico para cada água residuária está apresentada nas Figuras 5.11 e 5.12. Todos os sistemas apresentaram fase de adaptação da biomassa.

A fase de adaptação da vinhaça na produção de hidrogênio foi de aproximadamente 12 horas, enquanto não houve produção detectada para os outros efluentes. Para a geração de gás carbônico a fase de adaptação foi em torno de 6 horas a 8 horas para todos os efluentes, exceto para o glicerol, no qual não houve produção, sendo que o tempo de experimento pode ter sido curto para a adaptação da biomassa a esse substrato mais complexo.

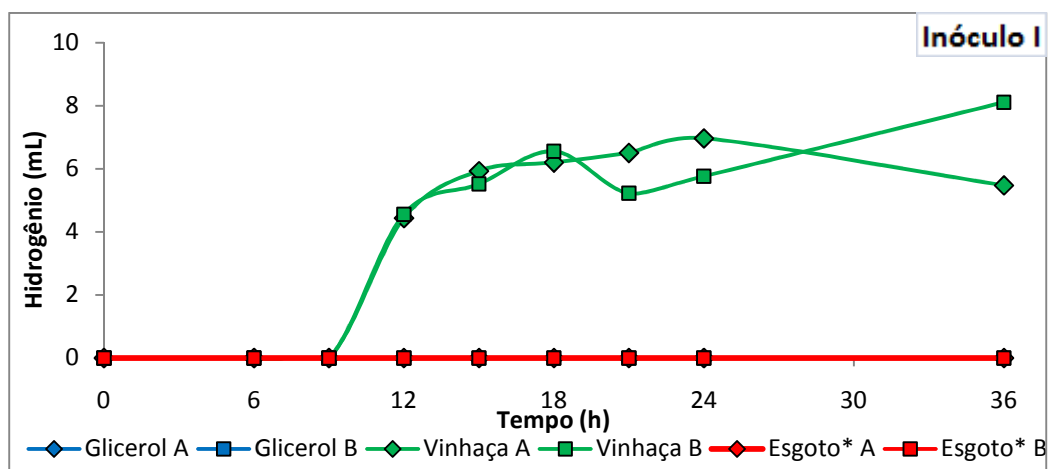


Figura 5.11. Produção de Hidrogênio (mL)

Pelo perfil temporal mostrado na Figura 5.11 é possível observar que vinhaça A e vinhaça B obtiveram o melhor resultado na geração de hidrogênio com 7,0 mL e 8,1 mL, respectivamente.

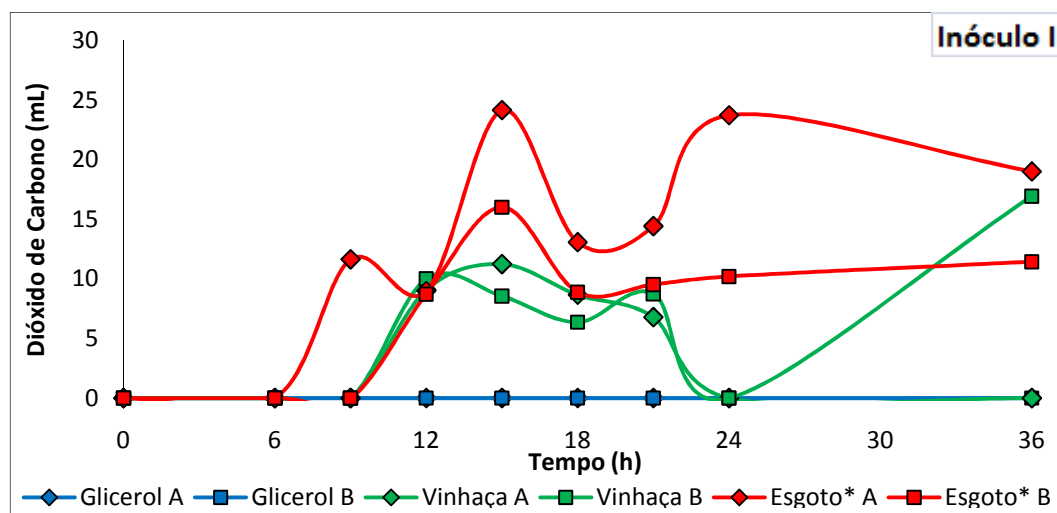


Figura 5.12. Produção de Gás Carbônico (mL)

Pelo perfil temporal mostrado na Figura 5.12 é possível observar que o Esgoto A e o Esgoto B obtiveram maior geração de gás carbônico, com 24,2 mL e 16 mL, respectivamente. Vinhaça A e Vinhaça B chegaram a valores de 11,2 mL e 10 mL, respectivamente.

Em relação à análise da produção de ácidos e álcoois, para os ensaios com o Glicerol (A e B), as Figuras 5.13 e 5.14 mostram os ácidos e álcoois que tiveram uma maior taxa de aumento em suas concentrações e a Tabela 5.2 mostra os valores, para os mais relevantes ácidos e álcoois detectáveis, das concentrações iniciais, máximas e os tempos onde foram constatadas essas concentrações máximas, ou seja, o pico de produção.

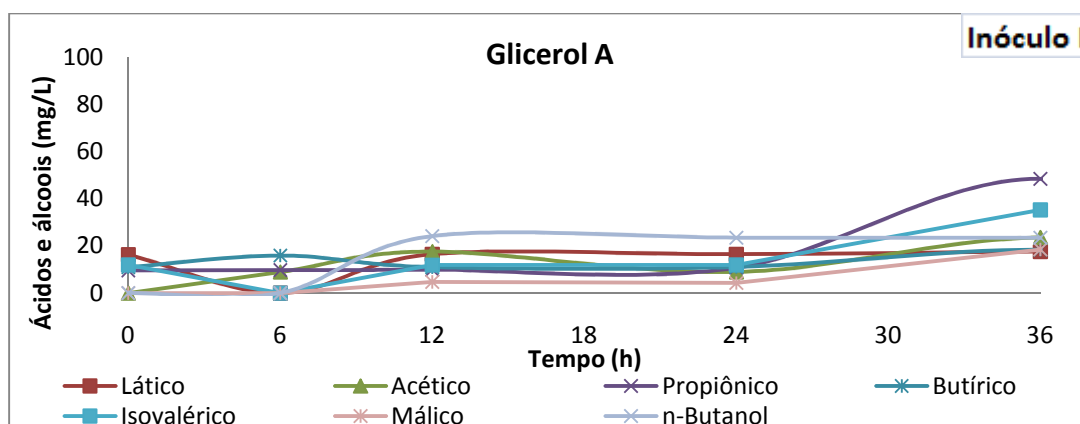


Figura 5.13. Produção de ácidos e de álcoois (mg/L) - Glicerol A

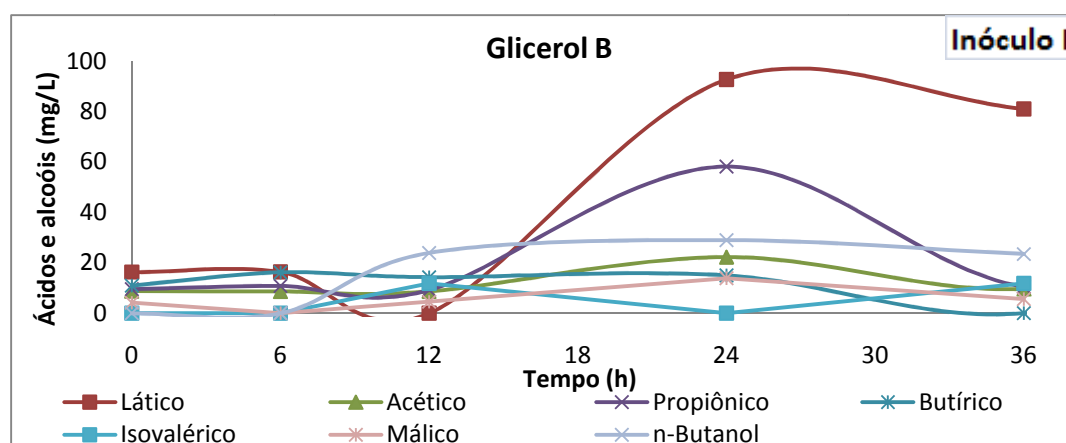


Figura 5.14. Produção de ácidos e de álcoois (mg/L) – Glicerol B

Tabela 5.2. Concentrações iniciais, máximas e os tempos dos picos de produção de todos os ácidos e álcoois analisados; Dados para o Glicerol A e Glicerol B.

Ácidos e Álcoois	Glicerol A			Glicerol B		
	C inicial	C máx	Tempo	C inicial	C máx	Tempo
Málico	0,0	18,5	36h	4,2	13,9	24h
Succínico	11,6	13,7	24h	12,9	12,9	0h
Lático	16,2	17,6	36h	16,4	92,8	24h
Acético	0,0	23,6	36h	8,8	22,3	24h
Propionico	9,6	48,4	36h	9,6	58,3	24h
Isobutírico	10,9	15,2	12h	12,8	12,8	0h
Butírico	10,9	18,4	36h	10,9	15,0	24h
Isovalérico	11,9	35,3	36h	0,0	11,9	12h
Valérico	11,0	11,9	36h	10,8	19,8	24h
Capróico	11,1	11,1	0h	10,9	20,1	24h
Etanol	22,5	22,5	0h	18,1	20,6	24h
N-butanol	0,0	24,1	12h	0,0	23,9	12h

Os resultados mostram que, mesmo não tendo um bom rendimento na produção de gases, o glicerol tem um bom potencial para a produção de ácidos, como málico, lático, acético, propiônico, butírico e isovalérico. Além disso, houve uma considerável produção de n-butanol. Sendo assim, um possível reaproveitamento desse efluente pode ser sua utilização para produção de metano ou purificação para usos industriais.

Por outro lado, o fato de que apenas um dos frascos da duplicata (Glicerol B) ter apresentado uma grande produção, principalmente do ácido láctico, pode indicar algum tipo de interferência nas análises.

As Figuras 5.15 e 5.16, e a Tabela 5.3 mostram os valores obtidos para os ensaios com esgoto sanitário (Esgoto A e Esgoto B).

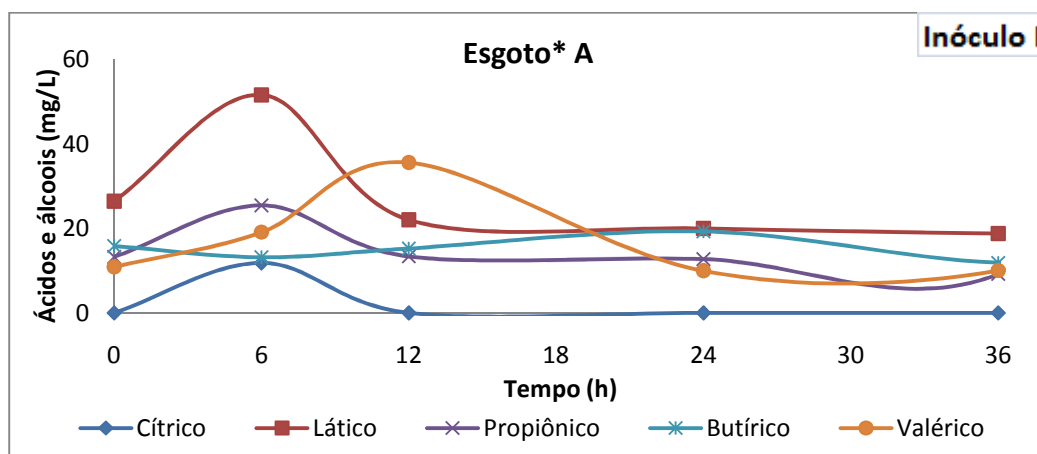


Figura 5.15. Produção de ácidos e de álcoois (mg/L) – Esgoto* A

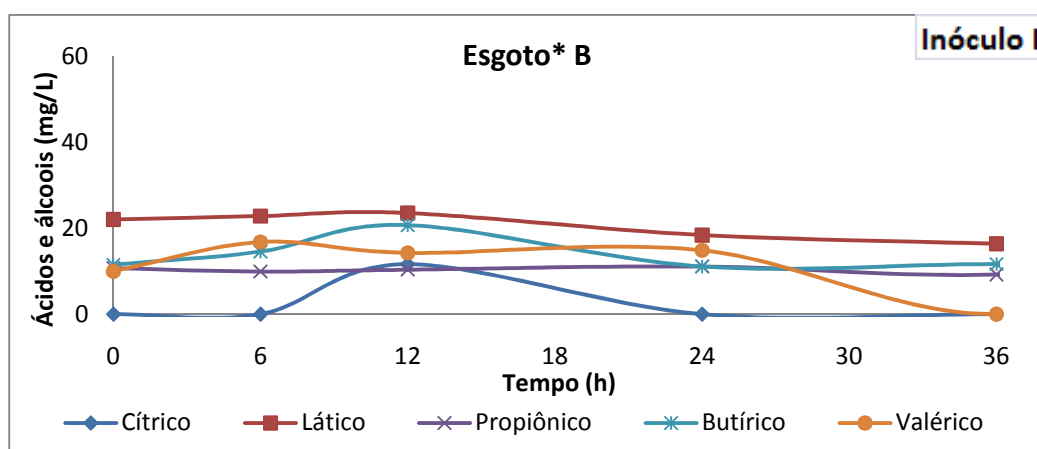


Figura 5.16. Produção de ácidos e de álcoois (mg/L) – Esgoto* B

Tabela 5.3. Concentrações iniciais, máximas e os tempos dos picos de produção de todos os ácidos e álcoois analisados; Dados para o Esgoto* A e Esgoto* B.

Ácidos e Álcoois	Esgoto A			Esgoto B		
	C inicial	C máx	Tempo	C inicial	C máx	Tempo
Cítrico	0,0	11,8	6h	0,0	11,6	12h
Málico	4,5	5,2	36h	4,1	4,2	6h
Lático	26,5	51,7	6h	22,0	23,5	12h
Fórmico	4,1	5,0	6h	3,6	3,6	0h
Propionico	13,3	25,5	6h	10,7	11,1	24h
Isobutírico	11,6	11,6	36h	11,4	11,4	0h
Butírico	12,2	15,3	36h	11,5	20,7	12h
Valérico	10,9	35,7	24h	10,0	14,8	24h
Etanol	21,9	21,9	0h	17,9	19,6	36h

Os resultados mostram que o esgoto tem um bom potencial para a produção de ácidos, sendo que os principais produtos foram os ácidos cítrico, láctico, propiônico, butírico e valérico.

As Figuras 5.17 e 5.18, e a Tabela 5.4 mostram os valores obtidos para os ensaios com Vinhaça A e Vinhaça B.

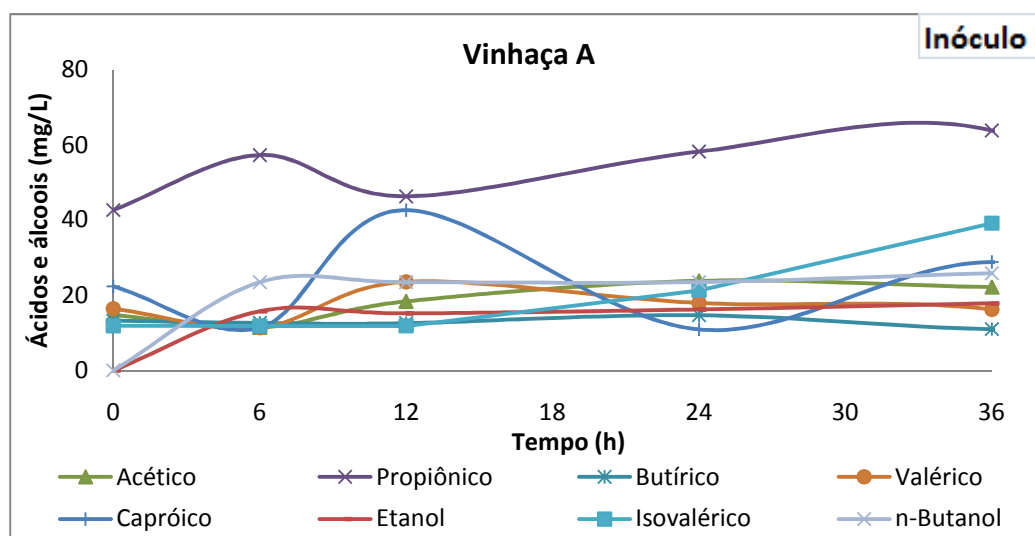


Figura 5.17. Produção de ácidos e de álcoois (mg/L) – Vinhaça A

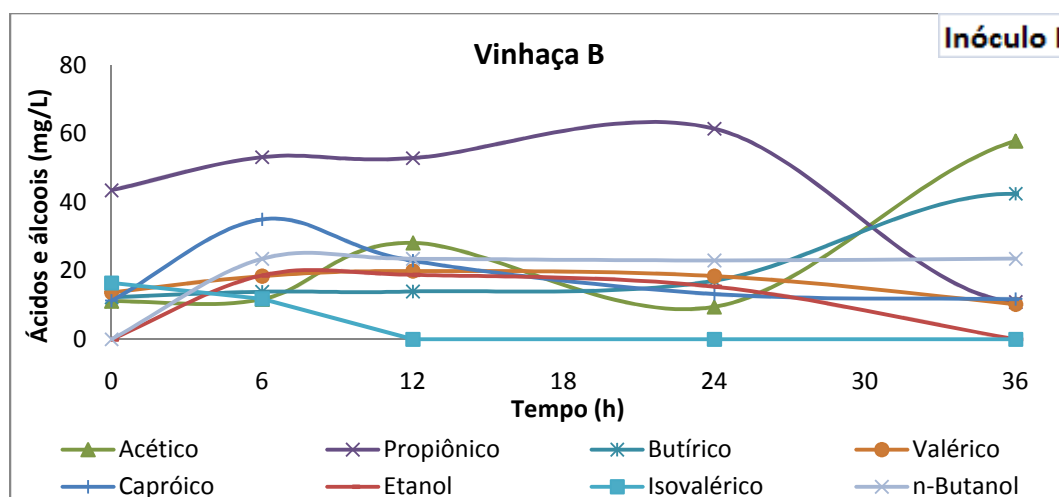


Figura 5.18. Produção de ácidos e de álcoois (mg/L) – Vinhaça B

Tabela 5.4. Concentrações iniciais, máximas e os tempos dos picos de produção de todos os ácidos e álcoois analisados; Dados para a Vinhaça A e Vinhaça B.

Ácidos e Álcoois	Vinhaça A			Vinhaça B		
	C inicial	C máx	Tempo	C inicial	C máx	Tempo
Cítrico	11,7	14,3	6h	11,8	12,0	12h
Málico	113,6	130,7	6h	183,2	183,2	0h
Succínico	18,2	22,8	6h	25,4	25,4	0h
Fórmico	4,1	6,5	6h	0,0	8,1	12h
Acético	14,8	23,9	24h	8,7	28,1	24h
Propiônico	42,7	58,2	24h	43,5	61,5	24h
Isobutírico	11,7	14,8	6h	11,4	15,2	6h
Butírico	13,3	14,7	24h	12,2	17,1	24h
Isovalérico	11,9	21,3	24h	16,4	16,4	0h
Valérico	16,4	23,6	12h	13,6	18,4	24h
Capróico	22,4	42,6	12h	11,3	35,0	6h
Etanol	0,0	17,8	36h	0,0	18,8	12h
N-butanol	0,0	23,5	6h	0,0	23,5	6h

Os resultados mostram que a vinhaça, que foi a grande produtora de hidrogênio juntamente com o efluente controle de sacarose, descrito no tópico anterior, tem uma boa capacidade de produção de ácidos, sendo que os principais produtos foram os ácidos acético, fórmico, propiônico, butírico, isovalérico e capróico, além dos álcoois etanol e n-butanol. Geralmente, ácidos como propiônico, acético e butírico estão relacionados com a produção de hidrogênio.

Sobre os ácidos que não constam na Tabela 5.4, temos que no início dos ensaios foram observadas altas concentrações dos ácidos láctico e málico. Essas concentrações caíram de forma rápida durante o experimento, sendo que possivelmente estes podem ter sido consumidos de alguma forma pelos organismos presentes (Figura 5.19). Outra explicação pode ser que estes ácidos tenham se volatilizado de alguma forma, causando a diminuição na concentração durante os ensaios.

Por outro lado também é provável que algum interferente tenha gerado esses picos no início das análises, uma vez que essas elevadas concentrações iniciais não são reais quando observamos a DQO medida nesses primeiros pontos.

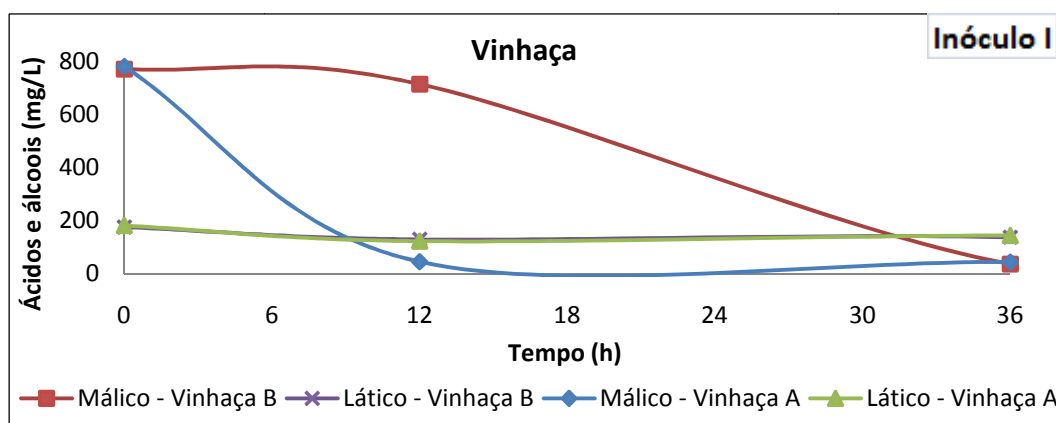


Figura 5.19. Variação temporal da concentração de ácidos Málico e Láctico para a duplicata realizada com vinhaça.

Comparando as produções de ácidos e álcoois com a literatura, constata-se que FERNANDES et al (2008), em um estudo feito com reatores em batelada com configurações similares a utilizada neste trabalho, obteve produções consideráveis de ácido butírico (7,51 mg/L) e valérico (2,73 mg/L) para experimentos com esgoto sanitário, produções de ácidos acético (25,87 mg/L), propiônico (11,73 mg/L), butírico (11,09 mg/L), isobutírico (27,17 mg/L), isovalérico (7,70 mg/L) e capróico (10,36 mg/L) para experimentos com vinhaça, e produções de ácidos acético (39,84 mg/L), butírico (28,16 mg/L) e isovalérico (12,2 mg/L) para ensaios com glicerol.

Em todos os ensaios os principais produtos foram formados em um tempo médio de 24 horas de experimento, o que pode ser explicado pelo fato de que o inóculo tem um tempo de adaptação, passando concomitantemente pela produção de ácidos, alcoóis e gases.

As diferenças entre os ensaios duplicata A e B, tanto para a vinhaça como também para o esgoto sanitário e para o glicerol, que teoricamente seriam idênticos, podem ser explicadas tanto por margem de erro dos métodos analíticos, como também por alguma possível diferença nas populações microbianas presentes na biomassa.

Em relação à biomassa, a Tabela 5.5 mostra os valores iniciais e finais da quantidade de biomassa nos sistemas. Nota-se que o crescimento foi evidente em todos os ensaios.

Tabela 5.5. Análise de sólidos- inóculo I

Sólidos	Inicial			Final		
	ST	SF	SV	ST	SF	SV
Glicerol A	485	65	420	525	50	475
Glicerol B	445	65	380	525	155	370
Vinhaça A	320	47,5	272,5	355	50	305
Vinhaça B	340	77,5	262,5	345	80	265
Esgoto A	510	12,5	497,5	552,5	62,5	490
Esgoto B	470	30	440	500	67,5	432,5

Ressalta-se que as concentrações iniciais ficaram acima da pretendida, que era de 250 mg/L. Isso ocorreu pela dificuldade de se colocar porções de sólidos exatas, já que a solução de inóculo é muito concentrada e pode não ter uma distribuição uniforme de biomassa.

Para algumas amostras, foi possível a realização de uma microscopia ótica simples, a fim de se identificar quais os possíveis organismos presentes, após o término dos ensaios. As Figuras 5.20, 5.21 e 5.22, mostram respectivamente os ensaios com glicerol, vinhaça e esgoto sanitário.

Em todos os sistemas foi observada a presença principalmente de bacilos, o que pode ser um indicativo da presença de bactérias produtoras de hidrogênio, como por exemplo, o *clostridium sp.* É possível destacar também a presença de endósporos na amostra do ensaio com o esgoto sanitário, o que pode ser explicado pelo fato dessa água residuária ser muito “poluída”, fazendo com que as culturas criem mecanismos de proteção. A vinhaça também apresentou indicativos da presença de endósporos.

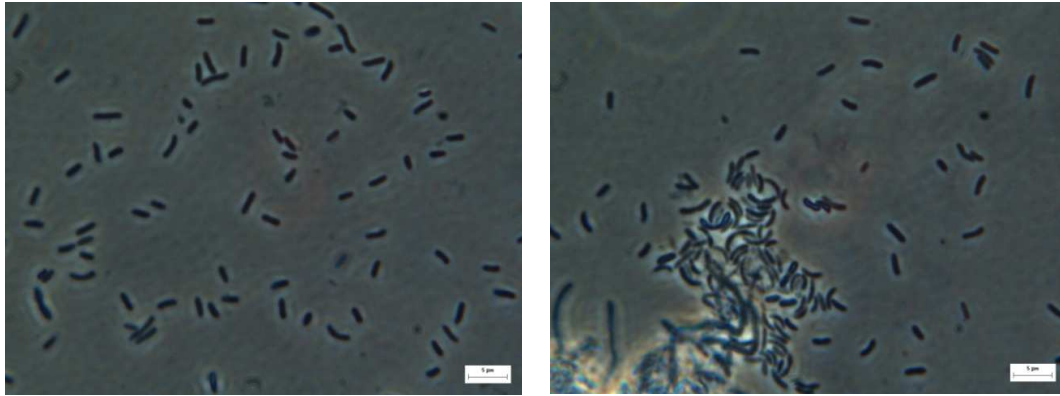


Figura 5.20. Microscopia com aumento de 2.000 vezes – Glicerol – Inóculo I

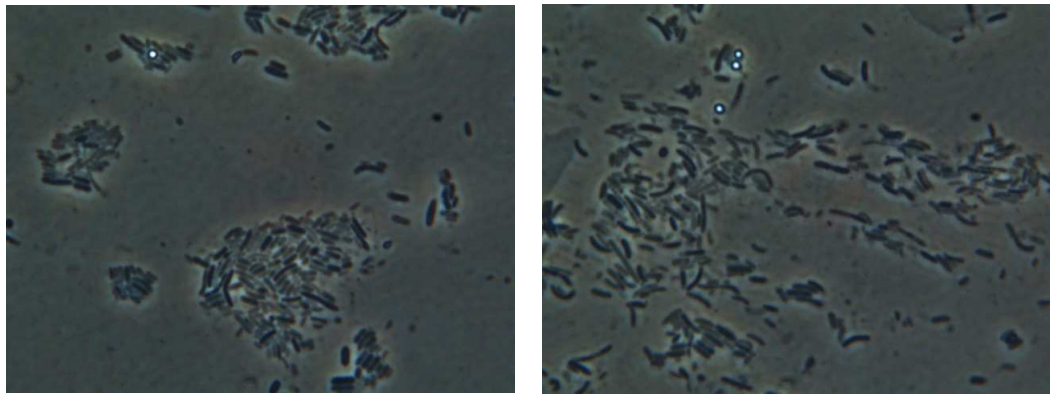


Figura 5.21. Microscopia com aumento de 2.000 vezes – Vinhaça – Inóculo I

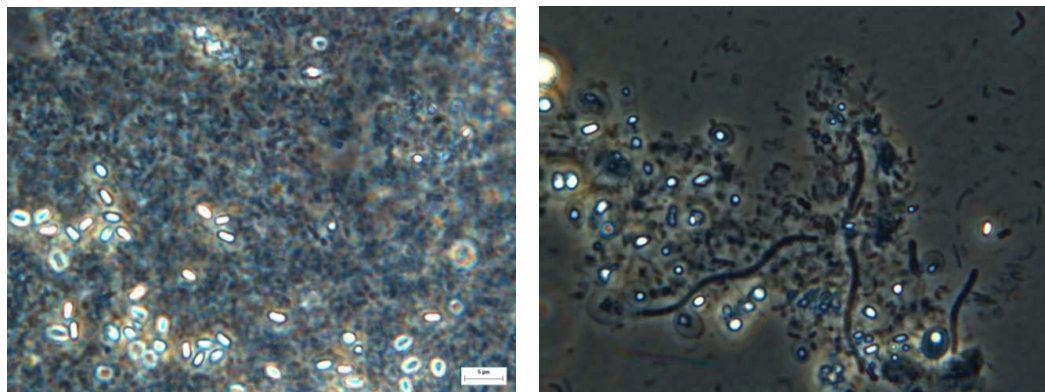


Figura 5.22: Microscopia com aumento de 2.000 vezes – Esgoto Sanitário – Inóculo I

5.3. BATELADAS COM INÓCULO II – SACAROSE, ESGOTO SANITÁRIO*, VINHAÇA E GLICEROL – FASE ACIDOGENICA

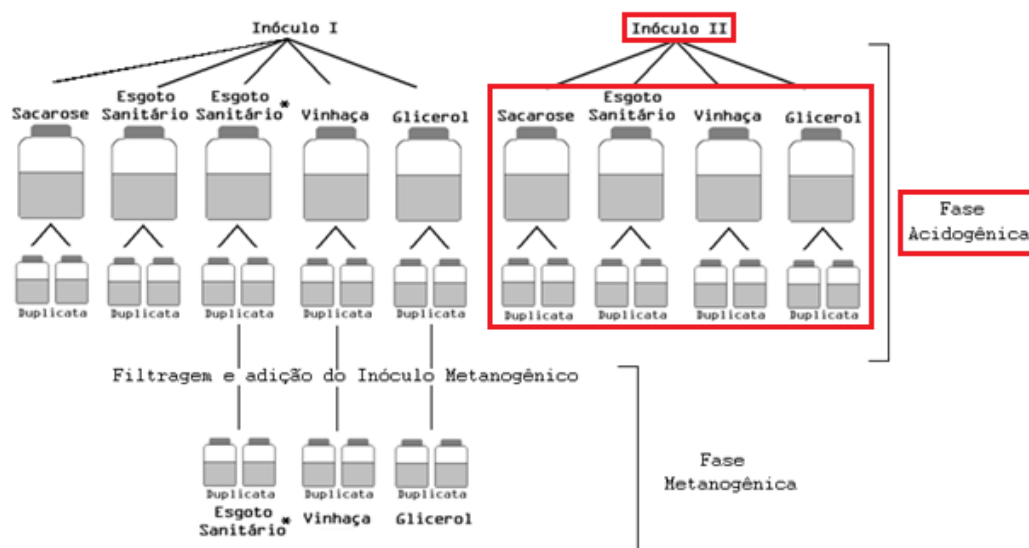


Figura 5.23. Fluxograma do trabalho com o destaque para a fase tratada no tópico 5.3.

Nas Figuras 5.24 e 5.25 pode-se ver o consumo de carboidratos, agora para os ensaios com o inóculo II, para todas as águas residuárias testadas. Os gráficos estão divididos em duas figuras para facilitar a visualização. Nota-se que o consumo se deu de forma mais lenta, diferentemente dos ensaios com o inóculo I, sendo a fase de adaptação do inóculo II ao substrato mais cadenciada.

As taxas de consumo chegaram à aproximadamente 100% para a sacarose, 50% para a vinhaça, 100% para o glicerol, e 60% para o esgoto sanitário, sendo este último o mais deficiente em relação à reserva de carboidratos.

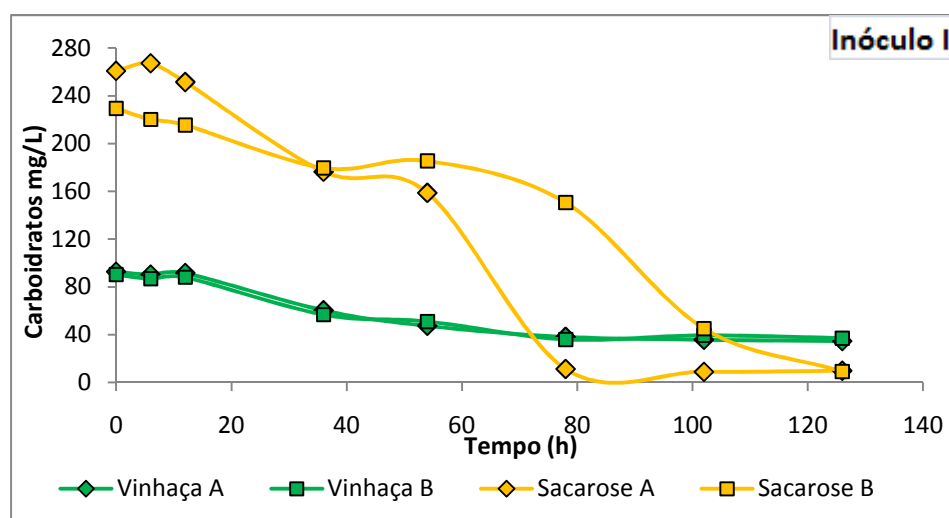


Figura 5.24. Concentração de carboidratos dada em termos de sacarose – Vinhaça e Sacarose

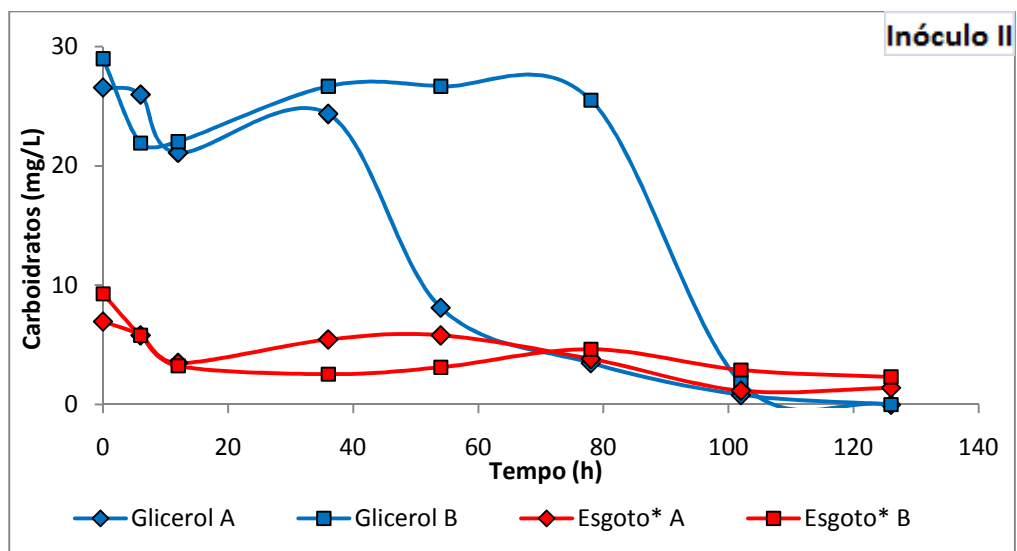


Figura 5.25. Concentração de carboidratos dada em termos de sacarose – Glicerol e Esgoto Sanitário

Nas Figuras 5.26 e 5.27 constata-se que a concentração de matéria orgânica (medida como DQO) sofreu um redução pouco considerável, chegando à reduções médias de 15% para o glicerol, 10% para a vinhaça, 16% para a sacarose e 8% esgoto sanitário.

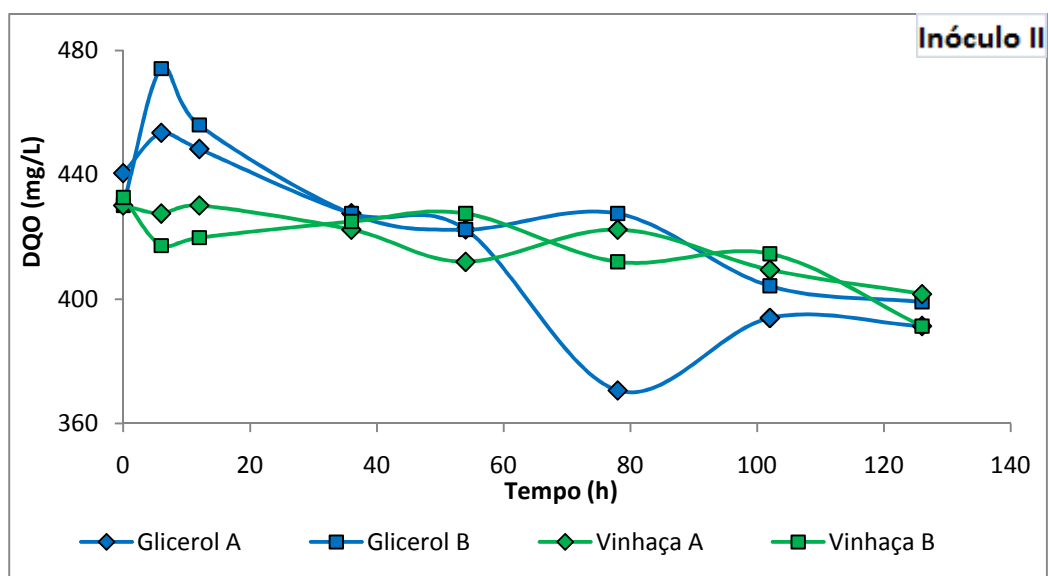


Figura 5.26. Concentração de matéria orgânica medida como mg/L de DQO – Glicerol e Vinhaça

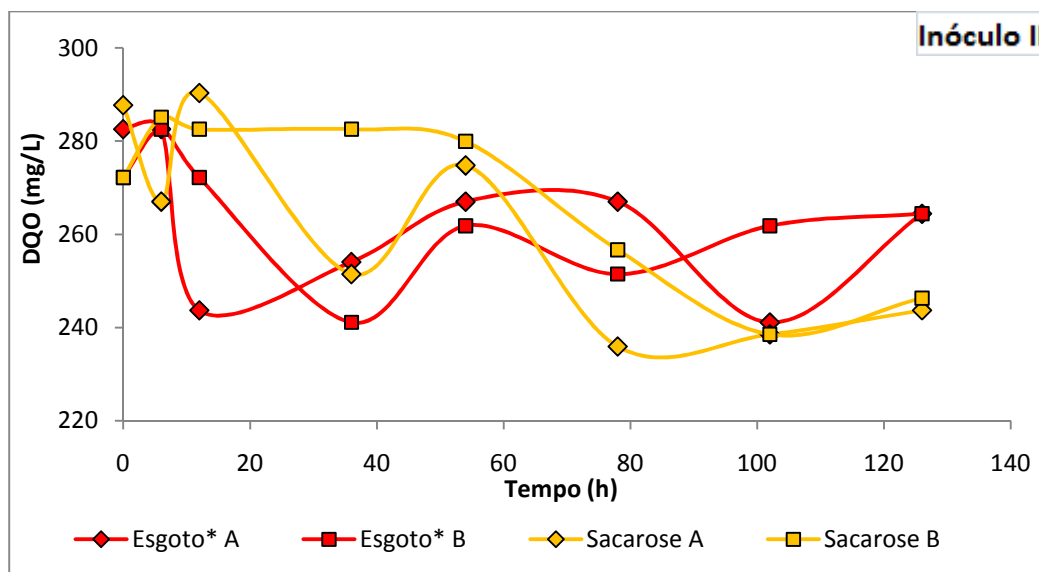


Figura 5.27. Concentração de matéria orgânica medida como mg/L de DQO – Esgoto Sanitário e Sacarose;

A variação temporal da produção de hidrogênio e gás carbônico para cada água residuária está apresentada nas Figuras 5.28 e 5.29, 5.30 e 5.31, respectivamente. Pode-se observar que a fase de adaptação da biomassa se deu em um tempo muito maior do que os ensaios com o inóculo I, o que explica o fato dos ensaios com o inóculo II terem um tempo de duração maior.

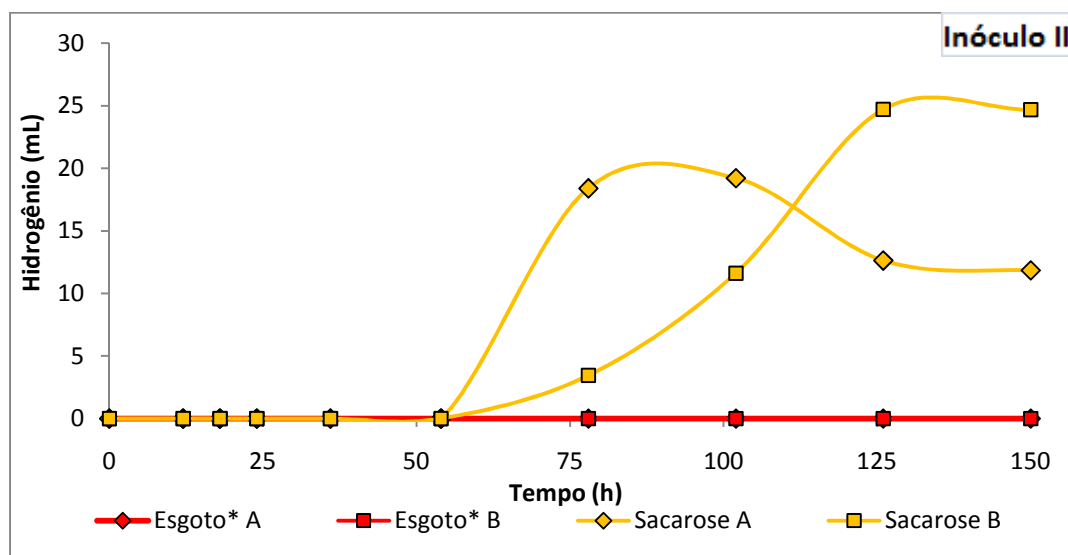


Figura 5.28. Produção de Hidrogênio (mL) – Esgoto Sanitário e Sacarose;

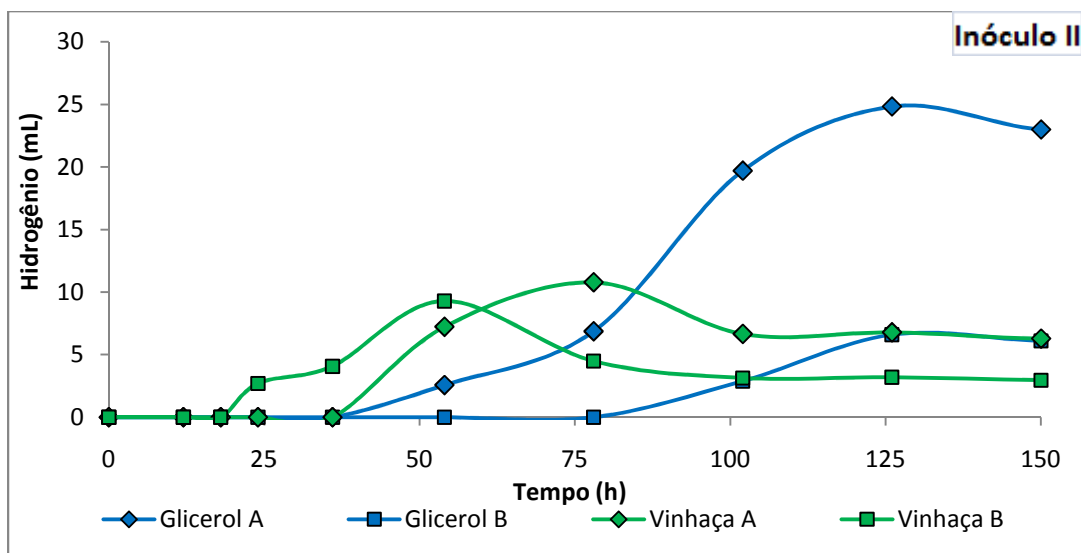


Figura 5.29. Produção de Hidrogênio (mL) – Glicerol e Vinhaça

Pode-se observar que a solução de sacarose e o glicerol obtiveram os maiores rendimentos para a produção de hidrogênio, chegando a produções de aproximadamente 25mL (Sacarose B e Glicerol A). Os ensaios com vinhaça chegaram a valores próximos de 12mL, mostrando também um bom potencial para produção desse gás. Para o esgoto sanitário não foi observada produção de Hidrogênio.

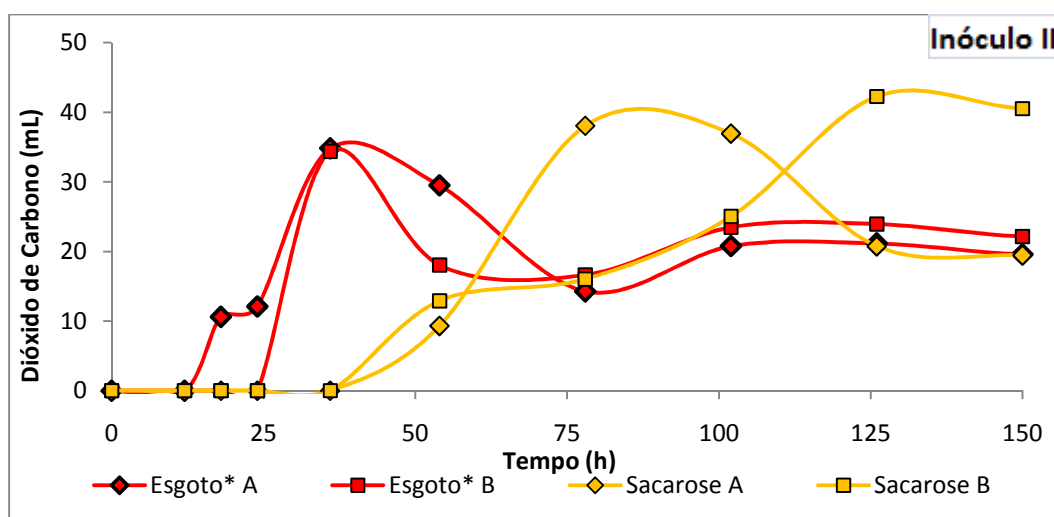


Figura 5.30. Produção de Dióxido de Carbono (mL) – Esgoto Sanitário e Sacarose

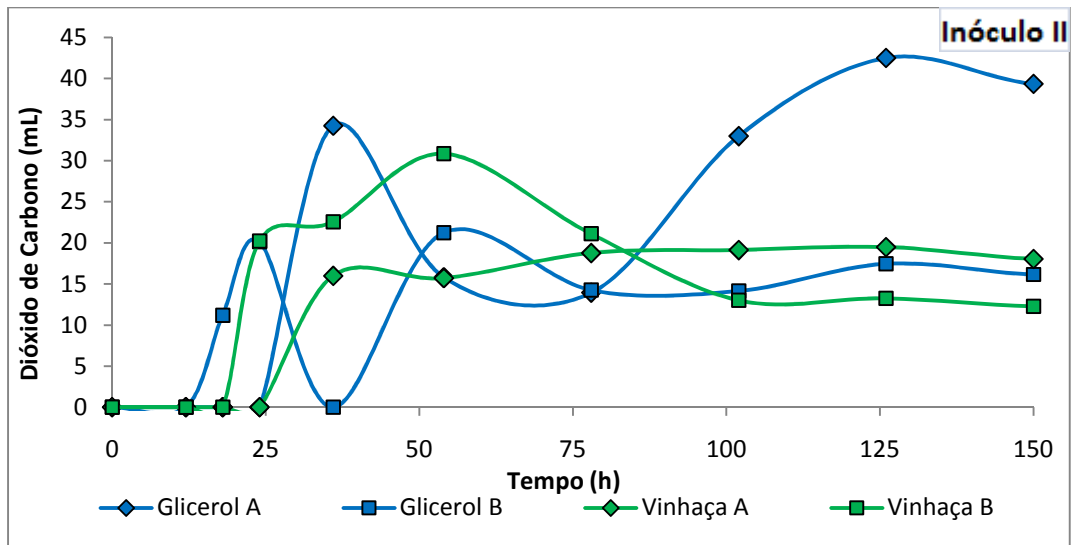


Figura 5.31. Produção de Dióxido de Carbono (mL) – Glicerol e Vinhaça

Pode-se observar que a solução de sacarose produziu aproximadamente 44mL, esgoto sanitário obteve aproximadamente 36mL, glicerol obteve 43mL e vinhaça, 33mL.

Em relação à análise da produção de ácidos e álcoois, para os ensaios com o glicerol, as Figura 5.32 e 5.33 mostram os ácidos e álcoois que tiveram uma maior taxa de aumento em suas concentrações e a Tabela 5.6 mostra os valores, para os mais importantes ácidos e álcoois detectáveis, das concentrações iniciais, máximas e os tempos onde foram constatadas essas concentrações máximas, ou seja, o pico de produção.

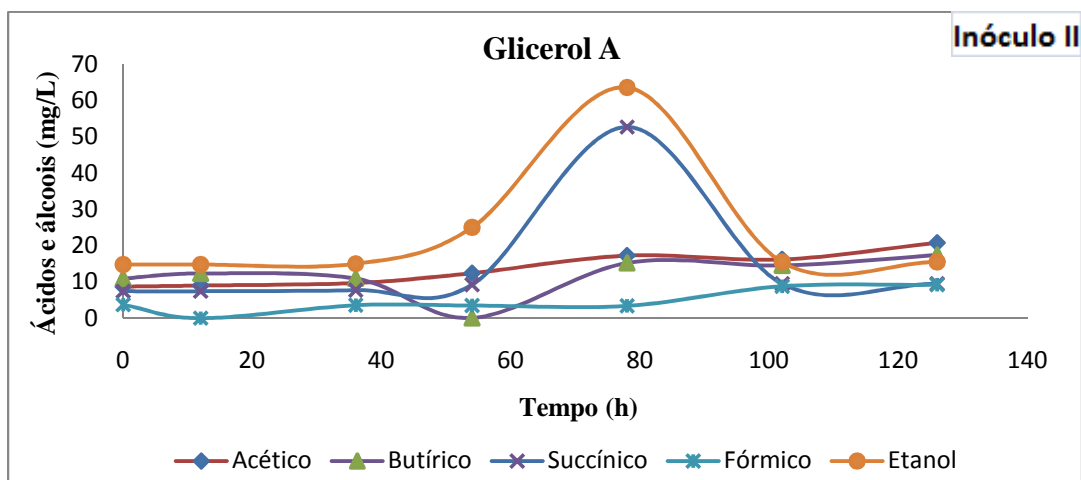


Figura 5.32. Produção de ácidos e de álcoois (mg/L) – Glicerol A

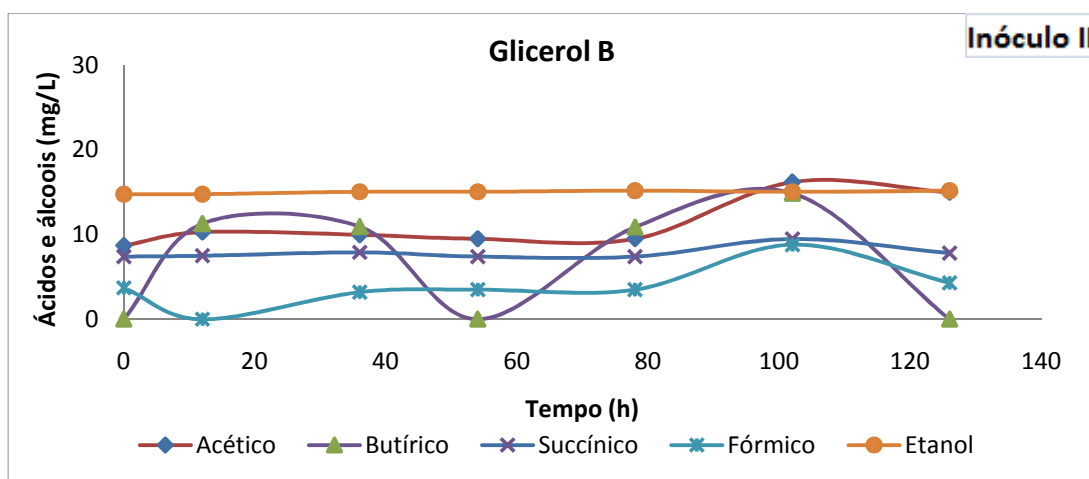


Figura 5.33. Produção de ácidos e de álcoois (mg/L) – Glicerol B

Tabela 5.6. Concentrações iniciais, máximas e os tempos dos picos de produção de todos os ácidos e álcoois analisados; Dados para a Glicerol A e Glicerol B.

Ácidos e Álcoois	Glicerol A			Glicerol B		
	C inicial	C máx	Tempo	C inicial	C máx	Tempo
Cítrico	12,0	12,0	0h	12,1	12,4	102h
Málico	6,0	8,3	78h	-	7,1	102h
Succínico	7,4	52,7	78h	7,4	9,5	36h
Lático	16,8	19,2	36h	16,7	20,9	102h
Fórmico	3,7	9,2	126h	3,7	8,8	102h
Acético	8,7	20,8	126h	8,7	16,2	102h
Propionico	24,9	24,9	0h	9,7	10,5	102h
Isobutírico	12,2	14,1	102h	13,2	13,5	102h
Butírico	10,9	17,4	78h	-	14,9	102h
Isovalérico	12,0	13,5	78h	12,2	12,2	0h
Valérico	10,0	11,4	12h	-	10,7	12h
Capróico	-	10,9	78h	-	11,0	54h
Etanol	14,8	63,6	78h	14,8	15,2	78h

Pode-se observar que o Glicerol A se destacou pelos picos de produção de etanol e ácido succínico nos tempos de 78h, que foi a fase onde se iniciou a produção de hidrogênio. O fato de que o Glicerol B não obteve esses picos de produção pode ser explicado pelo valor de pH, que no Glicerol B, estava próximo de 4, o que é muito baixo em relação ao pH indicado, que seria próximo de 5,5, como já citado nos Materiais e Métodos.

Esse baixo valor de pH também pode explicar a baixa produção de biogás, observada nas Figuras 5.29 e 5.31. A razão pelo qual o pH chegou a valores como este foi o fato de que na correção do pH, que é ajustado para aproximadamente 5,5 no início dos ensaios, possivelmente uma quantidade de ácido clorídrico maior que a necessária foi adicionada a esse frasco.

Outros ácidos, como o acético e o butírico merecem um destaque, com produções relativamente altas, que podem ser observadas na Tabela 5.6.

Analogamente, para os ensaios com esgoto sanitário, tem-se as Figuras 5.34 e 5.35, como também a Tabela 5.7.

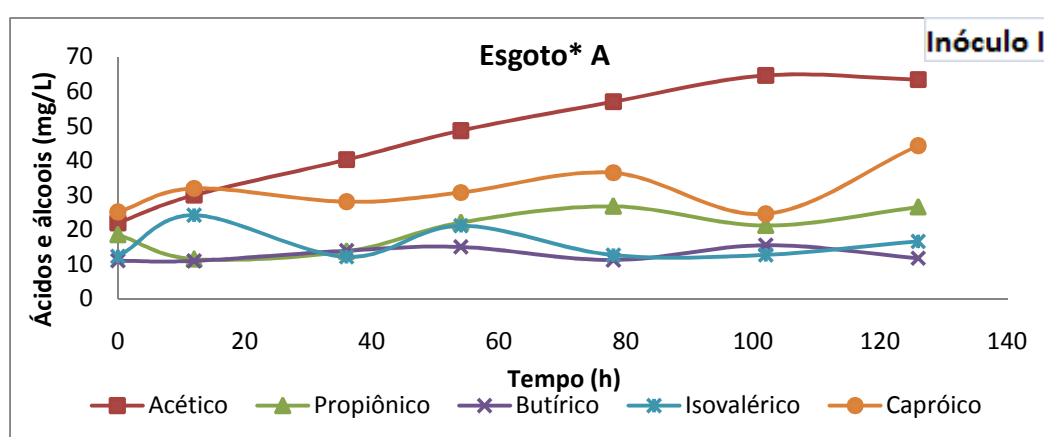


Figura 5.34. Produção de ácidos e de álcoois (mg/L) – Esgoto* A

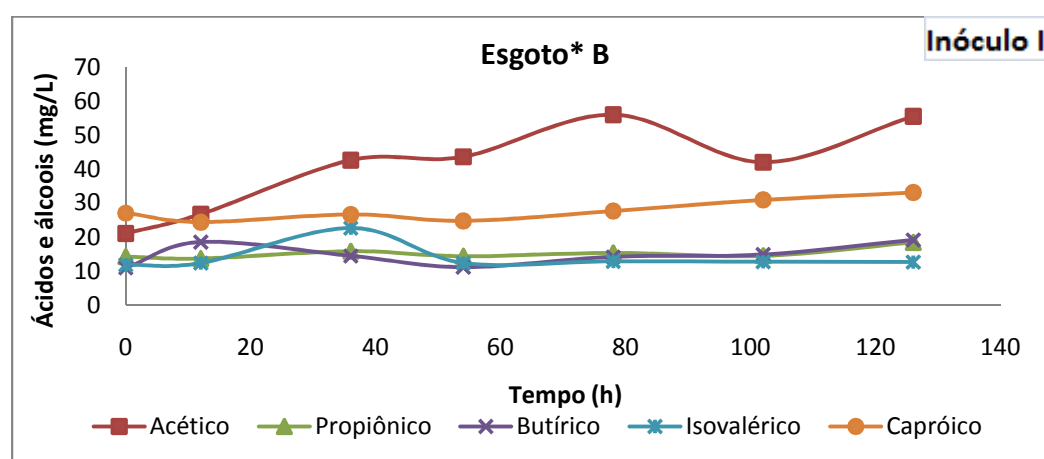


Figura 5.35. Produção de ácidos e de álcoois (mg/L) – Esgoto* B

Tabela 5.7: Concentrações iniciais, máximas e os tempos dos picos de produção de todos os ácidos e álcoois analisados; Dados para a Esgoto* A e Esgoto* B

Ácidos e Álcoois	Esgoto* A			Esgoto* B		
	C inicial	C máx	Tempo	C inicial	C máx	Tempo
Cítrico	-	-	0h	-	11,6	78h
Málico	4,3	5,0	78h	4,1	4,8	12h
Succínico	8,5	8,5	0h	8,1	9,1	36h
Lático	18,3	19,8	12h	19,0	19,0	78h
Acético	22,0	64,6	102h	21,0	56,0	126h
Propionico	18,5	26,7	78h	14,2	18,4	126h
Butírico	11,0	15,5	102h	10,9	19,1	126h
Isovalérico	12,2	24,2	12h	11,8	22,6	36h
Valérico	11,4	12,9	12h	11,0	13,4	54h
Capróico	25,1	44,3	126h	27,0	33,1	126h
Etanol	15,6	15,7	36h	15,6	20,0	36h

Para o esgoto sanitário, o ácido acético foi um dos principais produtos formados, confirmando seu destaque nas produções onde este efluente está envolvido. Além disso, obteve-se produções consideráveis dos ácidos capróico, butírico, valérico, isovalérico e propiônico, sendo que os valores máximos estão destacados na Tabela 5.7. Em média pode-se observar que os valores das concentrações desses ácidos foram crescendo juntamente com o aumento da produção de dióxido de carbono.

Analogamente, para os ensaios com a vinhaça, têm-se as Figuras 5.36 e 5.37, como também a Tabela 5.8.

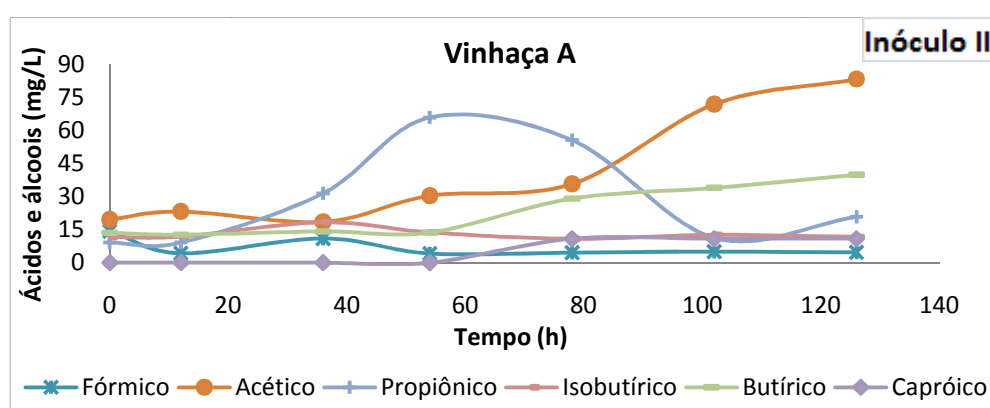


Figura 5.36. Produção de ácidos e de álcoois (mg/L) – Vinhaça A

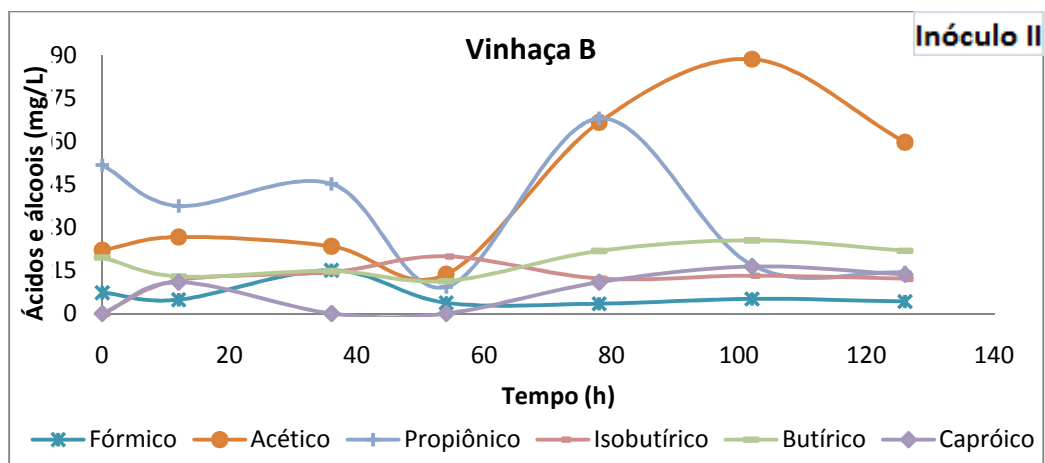


Figura 5.37: Produção de ácidos e de álcoois (mg/L) – Vinhaça B

Tabela 5.8. Concentrações iniciais, máximas e os tempos dos picos de produção de todos os ácidos e álcoois analisados; Dados para a Vinhaça A e Vinhaça B.

Ácidos e Álcoois	Vinhaça A			Vinhaça B		
	C inicial	C máx	Tempo	C inicial	C máx	Tempo
Cítrico	68,7	68,7	0h	30,6	42,6	36h
Succínico	25,0	25,0	0h	18,4	21,7	36h
Fórmico	14,3	14,3	0h	7,3	15,1	36h
Acético	19,7	83,3	126h	22,1	88,6	102h
Propionico	9,2	65,9	54h	51,7	68,0	78h
Isobutírico	11,7	18,4	36h	-	19,9	54h
Butírico	13,6	39,9	126h	19,5	25,5	24h
Isovalérico	11,8	13,2	78h	-	12,2	102h
Valérico	-	13,3	78h	11,1	14,0	36h
Capríco	-	10,9	78h	-	16,4	102h
Etanol	16,6	26,3	78h	16,6	23,1	36h
N-butanol	23,5	25,9	102h	23,5	24,1	102h

Pode-se observar que os ácidos acético e propiônico foram produzidos, sendo que as concentrações do ácido acético acompanharam as produções de biogás, e o propiônico teve apenas um pico de produção próximo da metade dos ensaios. Os ácidos butírico, capríco e isobutírico também merecem um destaque, pois foram produzidos de forma considerável. Geralmente, ácidos como propiônico, acético e butírico estão relacionados com a produção de hidrogênio, como já citado anteriormente.

Novamente, como observado nos ensaios anteriores com a vinhaça, no início dos experimentos foram observadas altas concentrações dos ácidos lático e málico. Essas concentrações novamente caíram rapidamente (Figura 5.38) durante o experimento, sendo que possivelmente estes podem ter sido consumidos de algum modo pelos organismos presentes. Outra explicação também pode ser que estes ácidos tenham se volatilizado de alguma forma, causando a diminuição na concentração durante os ensaios. Contrária a essa explicação, novamente pode-se considerar a possível ocorrência de fatores interferentes nessas análises de ácidos.

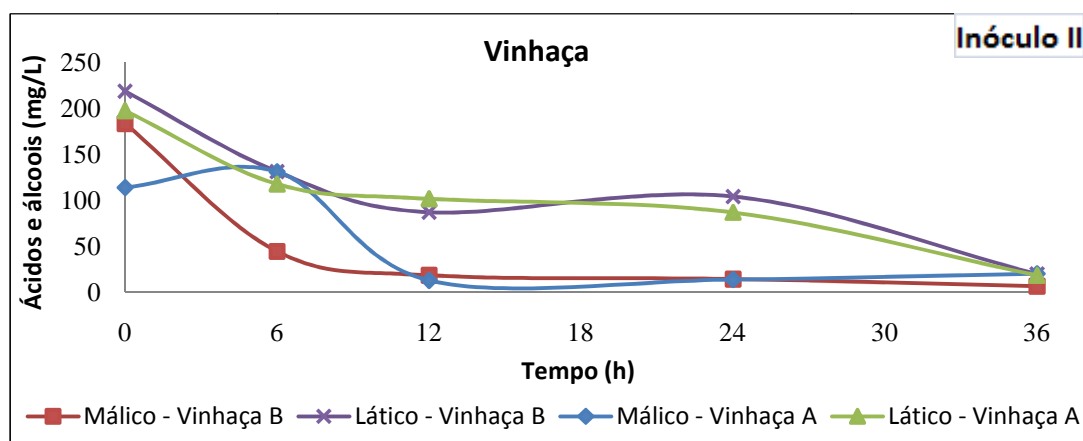


Figura 5.38. Concentração dos ácidos málico e lático para os ensaios com a Vinhaça e o Inóculo II.

Para a solução de sacarose, o destaque vai para as produções dos ácidos acético, málico e lático, e para o etanol, cujas máximas produções também coincidiram com as máximas produções de hidrogênio. O ácido succínico, que foi observado no ensaio com o glicerol, que também obteve um ótimo rendimento na produção de hidrogênio, teve uma produção considerável também para a sacarose, chegando aos valores máximos com 54 h de ensaio, para a Sacarose A e 78 h de ensaio para Sacarose B. Os dados podem ser vistos nas Figuras 5.39 e 5.40, e na Tabela 5.9.

Além disso, todos os outros ácidos detectáveis foram encontrados nos ensaios, o que mostra que realmente uma solução pura de sacarose é extremamente atrativa para os microrganismos.

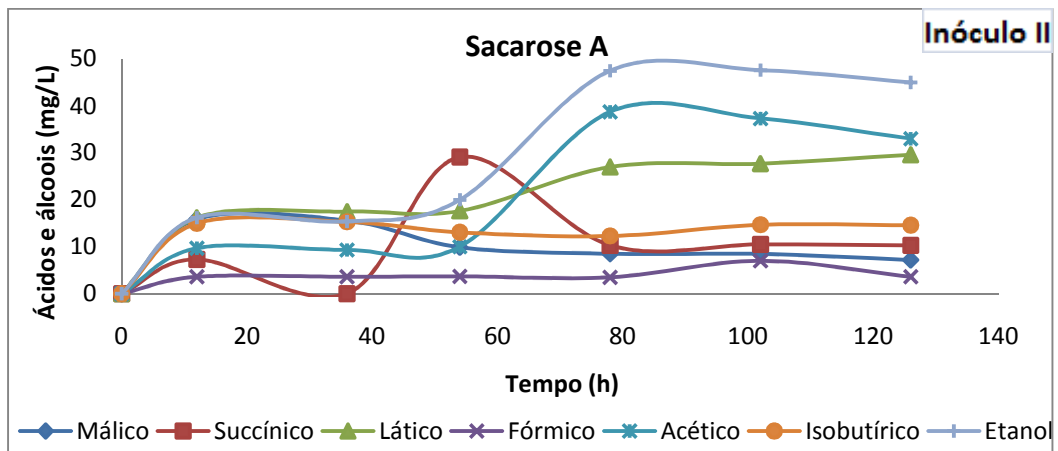


Figura 5.39. Produção de ácidos e de álcoois (mg/L) – Sacarose A

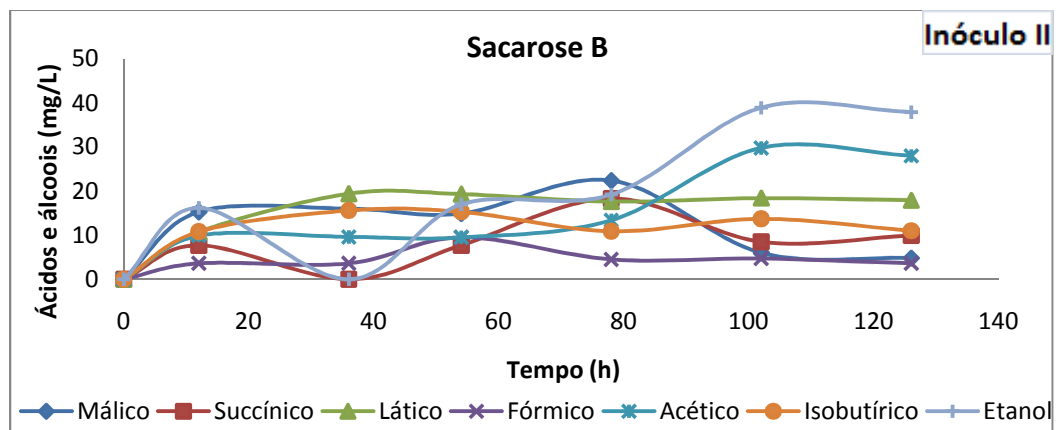


Figura 5.40. Produção de ácidos e de álcoois (mg/L) – Sacarose B

Tabela 5.9. Concentrações iniciais, máximas e os tempos dos picos de produção de todos os ácidos e álcoois analisados; Dados para a Sacarose A e Sacarose B

Ácidos e Álcoois	Sacarose A			Sacarose B		
	C inicial	C máx	Tempo	C inicial	C máx	Tempo
Cítrico	0,0	11,7	12h	0,0	12,1	102h
Málico	0,0	15,9	12h	0,0	22,4	78h
Succínico	0,0	29,1	54h	0,0	18,3	78h
Lático	0,0	29,6	126h	0,0	19,4	36h
Fórmico	0,0	7,0	102h	0,0	9,5	54h
Acético	0,0	38,7	78h	0,0	29,8	102h
Propionico	0,0	10,6	78h	0,0	13,2	102h
Isobutírico	0,0	15,3	36h	0,0	15,6	54h
Butírico	0,0	10,9	12h	0,0	17,5	12h
Isovalérico	0,0	11,9	12h	0,0	11,9	54h
Valérico	0,0	10,0	54h	0,0	10,0	126h
Capróico	0,0	10,9	12h	0,0	11,9	54h
Etanol	0,0	47,6	102h	0,0	38,9	102h
N-butanol	0,0	23,5	12h	0,0	23,5	12h

Sobre a quantificação do crescimento de biomassa, ela não pode ser feita, pois no início do ensaio, o inóculo foi utilizado em sua forma natural de grãos, como já dito anteriormente, sendo que o crescimento se deu de forma dispersa, o que foi observado com o aumento da turbidez do volume reacional. Assim, apenas uma tabela (Tabela 5.10) pode ser elaborada, com os dados iniciais de biomassa presente nos ensaios. Como já foi explicado no capítulo Materiais e Métodos, esse valor é aproximado, dado a dificuldade de se quantificar de forma mais exata.

Tabela 5.10. Concentração inicial de biomassa – Inóculo II

Efluente	Biomassa Inicial (mg)
Sacarose A	352,8
Sacarose B	374,4
Vinhaça A	332,4
Vinhaça B	447,6
Glicerol A	366,0
Glicerol B	424,8
Esgoto A	363,6
Esgoto B	453,6

Para algumas amostras, foi possível a realização de uma microscopia ótica simples, a fim de se identificar quais os possíveis organismos presentes, após o término dos ensaios. As Figuras 5.41, 5.42, 5.43 e 5.44, mostram respectivamente os ensaios com glicerol, sacarose, vinhaça e esgoto sanitário. Em todos os sistemas também foi observada a presença principalmente de bacilos, o que pode ser um indicativo da presença de bactérias produtoras de hidrogênio. É possível destacar também a presença de endósporos nas amostras dos ensaios com o esgoto sanitário e com a vinhaça, o que pode ser explicado novamente pela característica dessa água residuária.

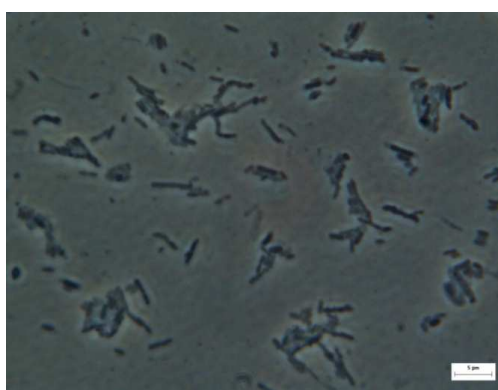


Figura 5.41. Microscopia com aumento de 2.000 vezes
Glicerol – Inóculo II

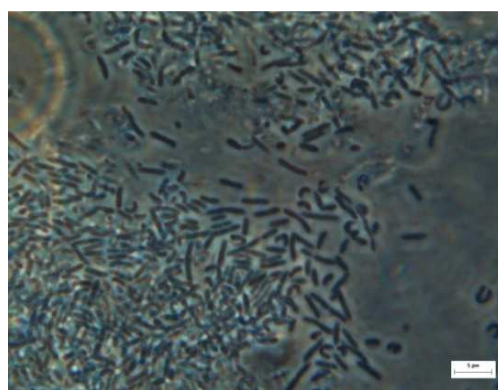


Figura 5.42. Microscopia com aumento de 2.000 vezes
Sacarose – Inóculo II

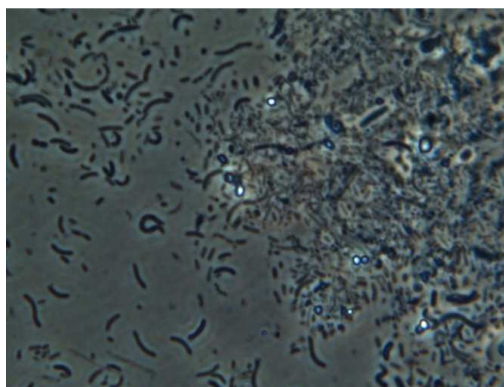
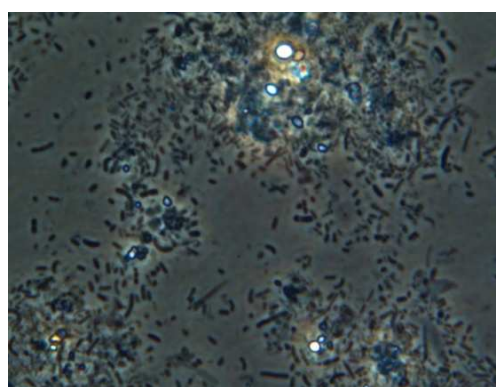


Figura 5.43. Microscopia com aumento de 2.000 vezes – *Vinhaça – Inóculo II*



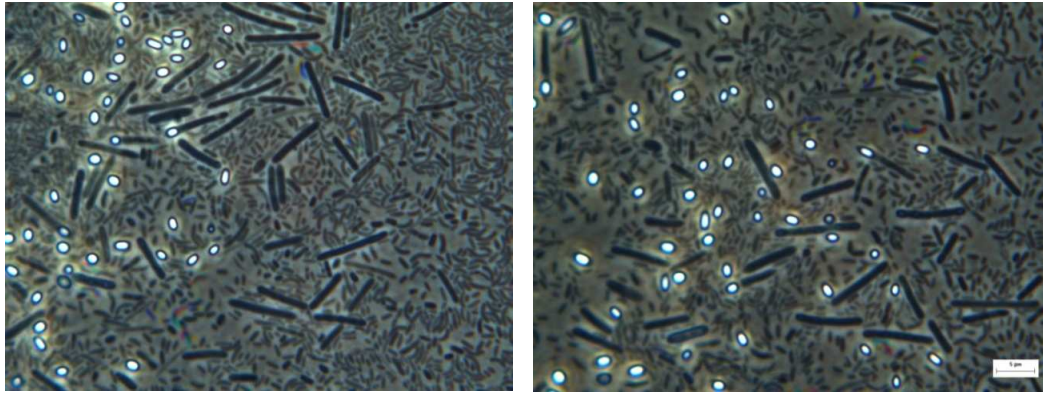


Figura 5.44. Microscopia com aumento de 2.000 vezes – *Esgoto Sanitário – Inóculo II*

Para os ensaios com a vinhaça e glicerol, também foi feita uma análise de coloração de gram (Figuras 5.45 e 5.46, respectivamente), o que mostrou uma diferença entre os tipos de bactérias encontradas em cada ensaio. No ensaio da vinhaça, foi possível observar uma maioria de bactérias gram negativas, o que caracteriza bem o inóculo utilizado (grãos de Kefir), porém alguns bacilos alongados gram positivos ganharam destaque nas imagens. Isso pode indicar que possivelmente a própria vinhaça contava com algum tipo de microrganismo, que pode ter diversificado o meio. Além disso, esses bacilos gram positivos reforçam a possível presença de bactérias do gênero *clostridium*, reconhecidas com bactérias produtoras de hidrogênio.

No ensaio com o glicerol, que foi o que teve o maior rendimento de produção de hidrogênio, observa-se apenas a presença de bacilos gram negativos. Isso quer dizer que para esse tipo de substrato, a cultura se manteve mais pura, não sofrendo uma maior interferência da água residuária. Assim, uma das possibilidades é atribuir que a não presença de uma “concorrência” para o inóculo pode ter sido favorável para obtenção de uma grande produção de hidrogênio.

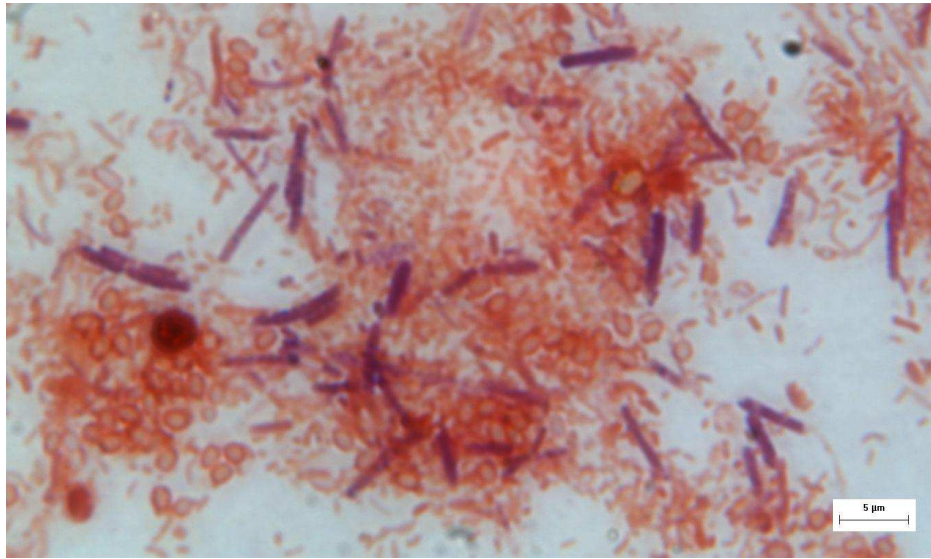


Figura 5.45. Microscopia com aumento de 2.000 vezes – Vinhaça – Inóculo II – Coloração de Gram (Avermelhado- Gram Negativo e Roxo- Gram Positivas)

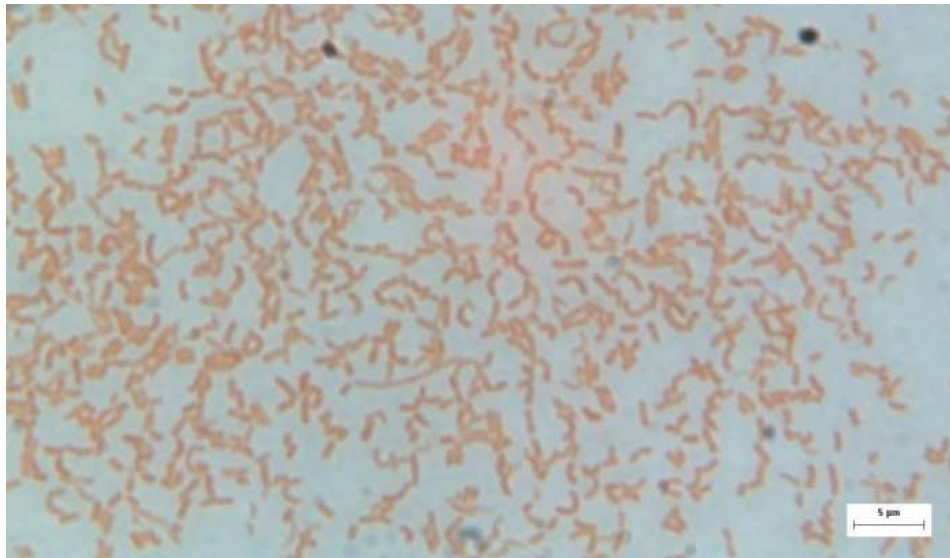


Figura 5.46. Microscopia com aumento de 2.000 vezes – Glicerol – Inóculo II – Coloração de Gram.

5.4. Comparação entre o Inóculo I e o Inóculo II – Fase Acidogênica

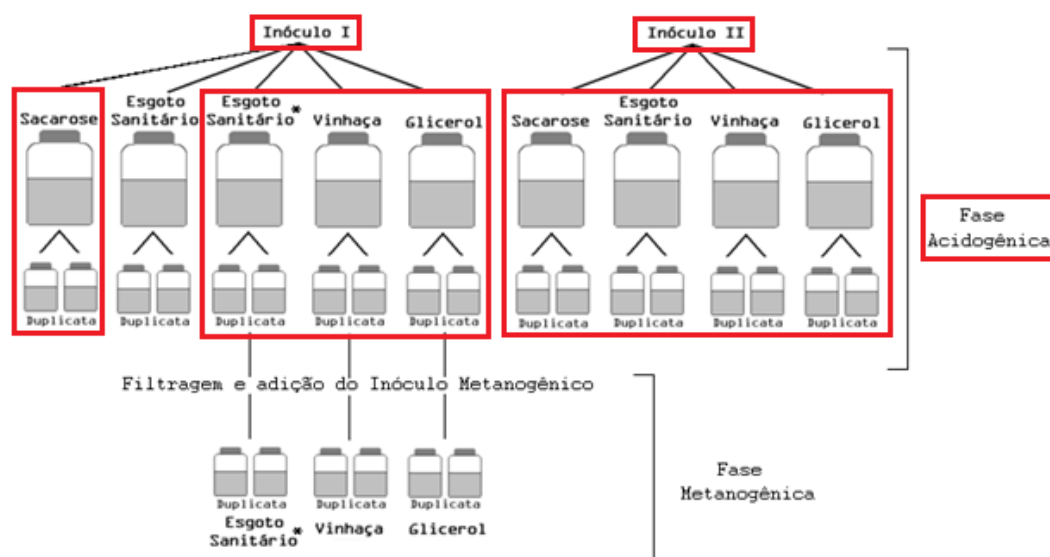


Figura 5.47. Fluxograma do trabalho com o destaque para a fase tratada no tópico 5.4.

A primeira comparação a ser feita é o tempo de duração dos ensaios para cada inóculo. O inóculo I, possivelmente tem sua fase de adaptação ao substrato mais rápida, o que pode explicar o fato de que o ensaio se estabilize após aproximadamente 36 horas. Já o inóculo II pode ter uma fase de adaptação maior, sendo que os ensaios duraram cerca de 126 horas.

Um dos motivos para esta maior duração dos ensaios com o inóculo II pode ser o fato de que para ele foi utilizado o inóculo da forma natural, em grãos, enquanto o inóculo I foi triturado e pode ter se distribuído melhor no volume reacional dos frascos. Porém, como já foi explicado, seguindo algumas indicações da literatura, foi utilizado os grãos de Kefir (Inóculo II) na sua forma natural. Uma outra razão foi o fato de que o ajuste de pH, feito no início dos ensaios, acabou não sendo feito com sucesso, o que levou a uma nova correção desse pH, com aproximadamente 12 horas de ensaio.

Passando agora para as produções de hidrogênio, tem-se que cada inóculo teve uma melhor adaptação a um tipo de substrato, sendo que o inóculo I se adaptou melhor a vinhaça, tendo suas máximas produções nos ensaios com este efluente e o inóculo II se adaptou melhor ao glicerol. A solução de sacarose, por ser este composto uma fonte preferencial, acabou gerando ótimos resultados para os dois inóculos.

Na Figura 5.48 tem-se os principais ensaios, onde ocorreram as máximas produções para os inóculos I e II, comparando-se as produções de hidrogênio.

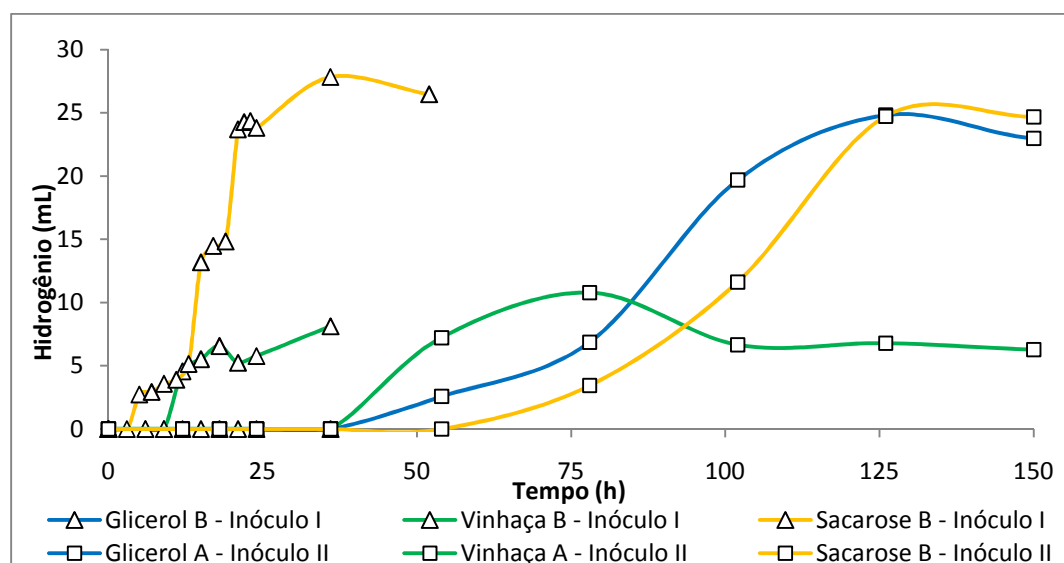


Figura 5.48. Produção de Hidrogênio. Comparação entre os inóculos. (Δ) Inóculo I e (□) Inóculo II.

Comparando em números mais exatos tem-se que os valores produzidos foram muito próximos para a solução de sacarose, chegando a aproximadamente 28mL para o inóculo I e 26,5mL para o inóculo II. A vinhaça também obteve resultados parecidos, chegando a 8mL para o inóculo I e 11mL para o inóculo II. Já o glicerol, que não gerou hidrogênio com o inóculo I foi o que apresentou melhor potencial para o inóculo II, produzindo cerca de 25ml.

Relacionando agora os dados, tem-se os valores de produção específica máxima (P_{max}) e de rendimento (Y), apresentados na Tabela 5.11. Os valores de Cx na Tabela 5.11 são correspondentes aos ensaios que tiveram uma maior produção, seguindo a lógica do gráfico da Figura 5.44.

Tabela 5.11. Valores de produção específica máxima (P_{max}), rendimento (Y) e quantidade inicial de biomassa (C_x) – Hidrogênio para os dois inóculos

Efluente	Hidrogênio – Inóculo I			Hidrogênio – Inóculo II		
	C_x (mg SSV/L)	P_{max} (mL H ₂ /g SSV)	Y (mL H ₂ /g DQO)	C_x (mg SSV/L)	P_{max} (mL H ₂ /g SSV)	Y (mL H ₂ /g DQO)
Sacarose	255	109	106	374,4	66	90,9
Glicerol	380	-	-	332,4	76	56,1
Vinhaça	262,5	30,9	26,9	366	29,5	25,1

CHEN et al. (2006) obtiveram 45 e 52 mL H₂/g DQO, em reatores em batelada usando sacarose com 300 mg/L de DQO e restos de alimentos com DQO de 1100 mg/L, respectivamente. O inóculo utilizado pelos autores originou-se de um digestor anaeróbio.

Os resultados obtidos por CHEN et al. (2006), são comparáveis aos alcançados pela vinhaça neste trabalho. Os rendimentos ligeiramente maiores, possivelmente tem relação com o emprego uma fonte de carbono que continha somente carboidratos de fácil degradação (sacarose) e de uma carga de matéria orgânica três vezes superior (1100 mg/L de DQO), pois as condições experimentais para o teste foram praticamente as mesmas, diferindo apenas pelo inóculo empregado no trabalho de CHEN et al. (2006), que foi retirado de um digestor anaeróbio.

Em relação aos ácidos tem-se que os dois inóculos apresentaram uma grande variedade de produção. Para as águas residuárias como o esgoto sanitário e o glicerol, a variedade foi relativamente grande, sendo que ácidos diferentes foram produzidos para cada inóculo. Já para os ensaios com a vinhaça, para os dois inóculos, as produções dos ácidos acético e propiônico foram evidenciadas, sendo vista uma certa similaridade entre as produções para os dois inóculos. Sendo assim, pode-se dizer que a formação de ácidos é tanto dependente do tipo de substrato quanto do tipo do inóculo, nesse caso específico.

Em relação as microscopias realizadas, tem-se que para os dois inóculos a presença de bacilos é evidente, sendo também para alguns efluentes observada a formação de endósporos, para algumas águas residuárias utilizadas. Sendo assim, não

há como diferenciar, com as técnicas utilizadas, os tipos específicos de culturas encontradas em cada um dos inóculos.

5.5. Bateladas Inóculo Metanogênico – Esgoto Sanitário*, Vinhaça e Glicerol – Fase Metanogênica

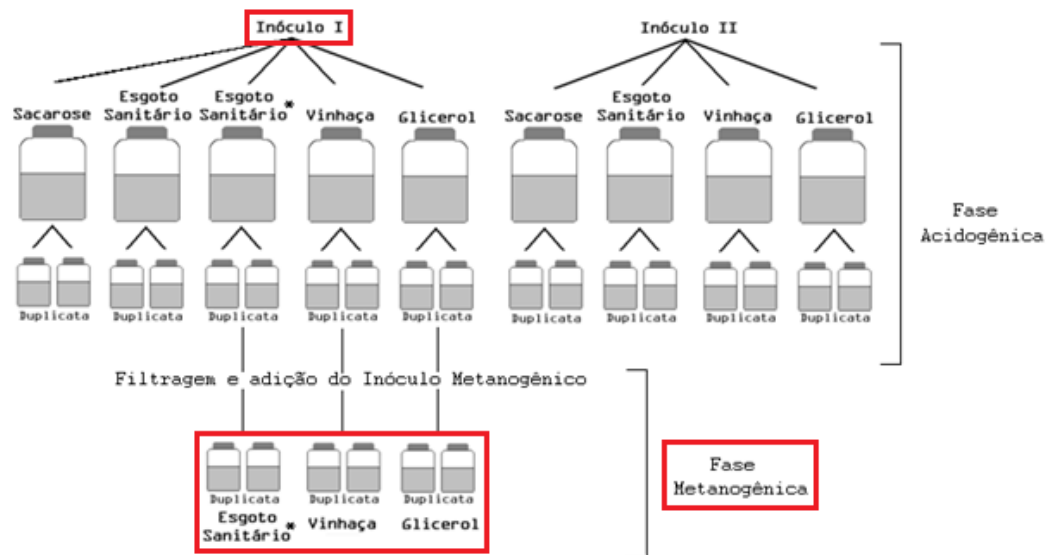


Figura 5.49. Fluxograma do trabalho com o destaque para a fase tratada no tópico 5.5.

Todos os resultados mostrados neste capítulo serão a respeito da fase metanogênica, sendo que o ponto inicial se deu após 48 horas do início do experimento, ou seja, após o fim da etapa acidogênica que durou 36 horas. Apenas uma das duplicatas de cada efluente (frascos A) contendo os produtos da fase acidogênica foram armazenados, por 12 horas a 4 °C, antes do início do experimento metanogênico.

Assim, passando para as análises pode-se constatar que a concentração de carboidratos, que já estava baixa devido à fase acidogênica, não sofreu maiores modificações, com quedas muito pouco significativas ficando praticamente constante, como mostra a Figura 5.50.

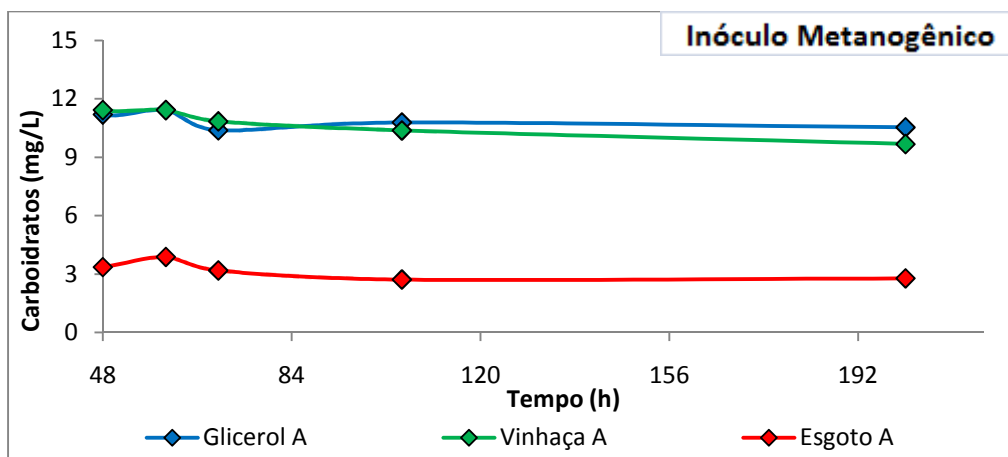


Figura 5.50. Concentração de carboidratos dada em termos de sacarose.

A redução de DQO ficou em torno de 30% para o glicerol, 14% para a vinhaça e 22% para o esgoto sanitário (Figura 5.51). Essa baixa redução já era esperada, sendo que ela indica que a matéria orgânica sofreu oxidação parcial, com acúmulo de compostos orgânicos intermediários da degradação anaeróbia. Essa queda, mesmo que não muito expressiva, pode indicar o consumo dos ácidos para formação de metano, já que as concentrações de carboidratos se mantiveram quase constantes.

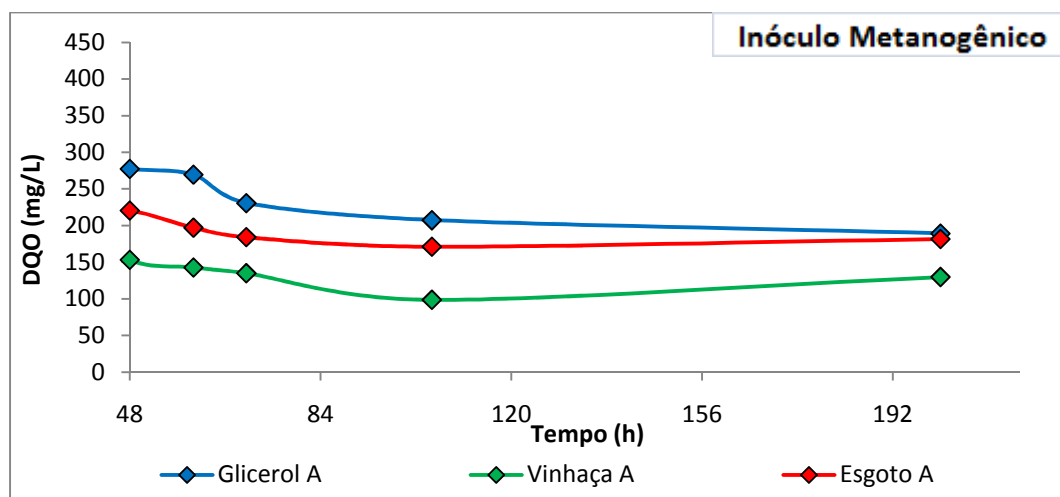


Figura 5.51. Variação temporal da DQO.

A variação temporal da produção de metano para cada água residuária está apresentada na Figura 5.52. Todos os sistemas apresentaram fase de adaptação da biomassa, que em média durou cerca de 10 horas.

Em relação à essa produção de metano, tem-se que os maiores volumes de metano produzidos foram de 41,9 mL para o Glicerol A e 31,8 mL para a Vinhaça A, o que ressalta o potencial desses efluentes para a geração de metano.

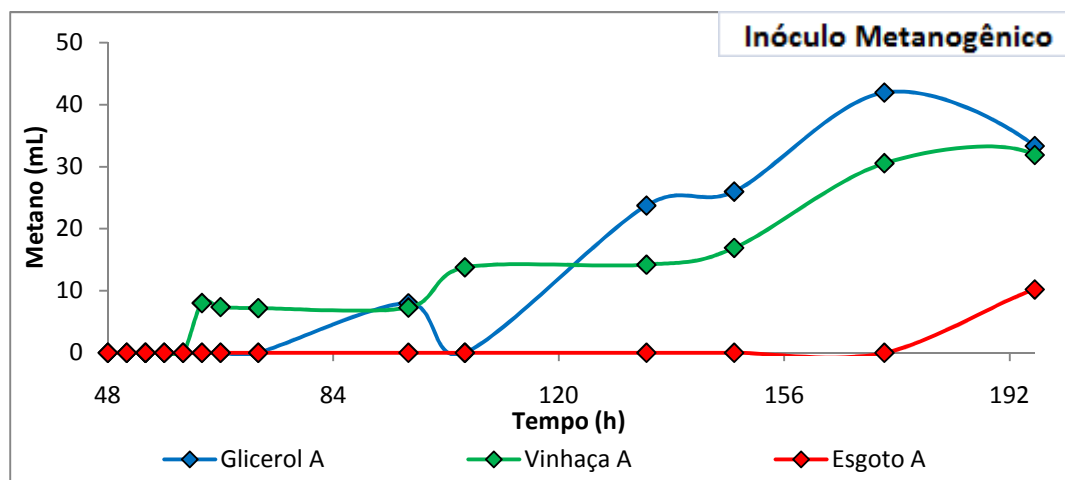


Figura 5.52. Gráfico da produção de metano.

Os valores de produção específica máxima (P_{max}) e de rendimento (Y) estão apresentados na Tabela 5.12. Todas as águas residuárias apresentaram potencial para produção de metano, pois conforme se observa na Figura 5.52, Glicerol A, Vinhaça A e Esgoto A produziram CH_4 .

Tabela 5.12. Concentração de biomassa (C_x), produção específica máxima (P_{max}) e rendimento para a geração de metano.

Efluente	Metano		
	C_x (mg SSV/L)	P_{max} (mL CH_4 /g SSV)	Y (mL CH_4 /g DQO)
Glicerol A	505	83,1	114
Vinhaça A	465	65,8	81,4
Esgoto A	610	16,7	39

Sobre a produção de ácidos e álcoois, seguindo o perfil temporal do glicerol (Figura 5.53) observa-se, após um pico de crescimento, um consumo dos ácidos acético e lático, o que provavelmente associa-se a produção de metano. O ácido propiônico gerado também foi degradado, porém apresentou velocidade de consumo

menor. Após a geração de ácido acético houve o aparecimento de um pico de etanol, que possivelmente pode estar associado à uma quantidade de biomassa acidogênica remanescente, pois o metabolismo da *Clostridium sp.* também pode se direcionar para a formação de solventes (LEVIN et al., 2004).

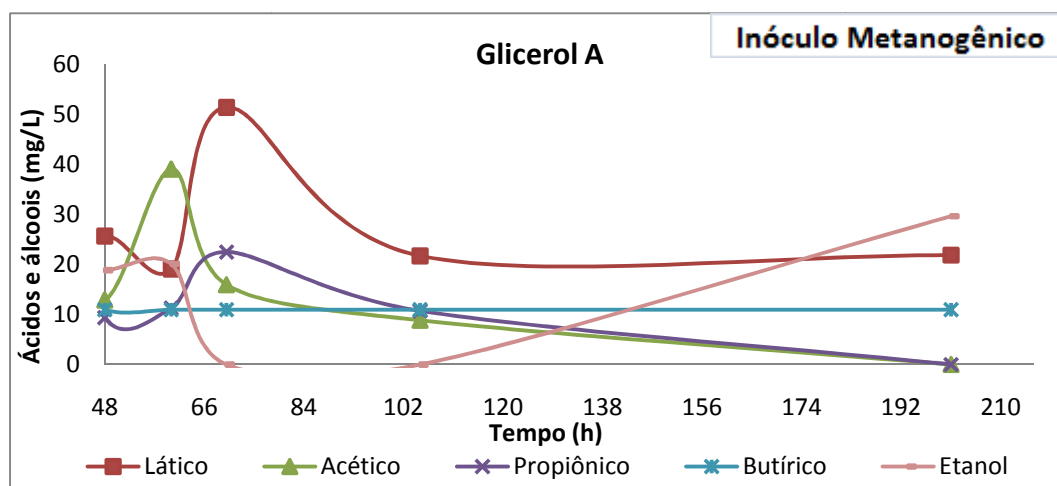


Figura 5.53. Geração de ácidos e álcoois (glicerol A).

Para a vinhaça, o comportamento foi de certa forma similar, sendo que os ácidos acético, propiônico e butírico foram consumidos. Além disso observa-se a queda da concentração de ácido capróico e uma queda geral nas concentrações dos demais ácidos indicados na Figura 5.54 após aproximadamente 100h de ensaio, o que pode indicar que esses ácidos foram utilizados para produção de metano.

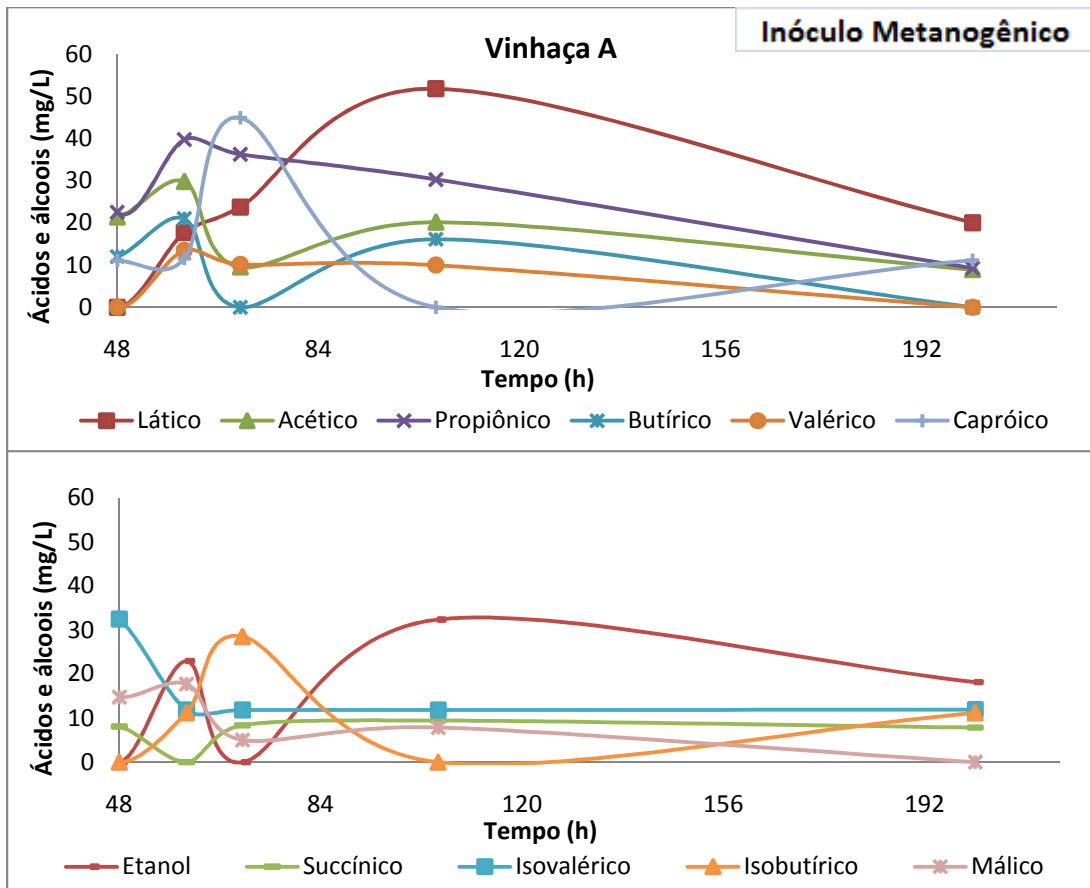


Figura 5.54: Geração de ácidos e álcoois (Vinhaça A).

Para a vinhaça também foi gerada uma certa quantidade de etanol, que pode indicar interferência do inóculo acidogênico, dando indicação de um possível erro no método de filtragem utilizado para retenção da biomassa acidogênica.

Para o esgoto sanitário, observou-se um consumo dos ácidos propiônico, capróico e butírico (Figura 5.55).

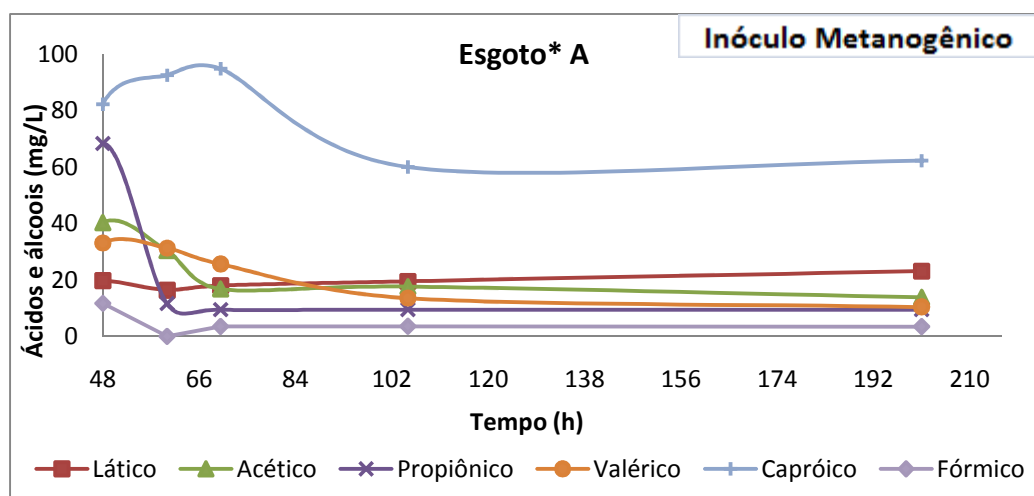


Figura 5.55. Geração de ácidos e álcoois (Esgoto Sanitário A)

6. CONCLUSÕES

Com os dados obtidos e avaliados primeiramente pode-se analisar o alto aproveitamento dos reatores controle, inoculados com a solução de sacarose. Assim, pode-se concluir que um efluente com uma grande quantidade de açúcares, como a sacarose, tem grande potencial de ser uma boa fonte de nutriente para a produção de hidrogênio e AGV's. Isso pode ser comprovado pelos resultados obtidos com a vinhaça, sendo ela o efluente que apresenta a maior quantidade de carboidratos em relação aos outros efluentes testados.

Para o inóculo I, a vinhaça obteve o maior potencial de produção e para o inóculo II obteve também um bom aproveitamento. Em relação à produção de ácidos, a vinhaça produziu ácidos como o propiônico, o acético e o butírico, que estão relacionados à produção de hidrogênio.

O esgoto sanitário obteve uma grande produção de gás carbônico para os dois inóculos, superando os outros efluentes, e uma satisfatória produção de ácidos.

Já o glicerol, mesmo não tendo um potencial de produção de gases para o inóculo I, teve um ótimo aproveitamento na produção de ácidos e álcoois, produzindo ácidos málico, láctico, acético, propiônico, butírico e isovalérico, como também n-butanol. Para o inóculo II o glicerol obteve o melhor rendimento para a produção de Hidrogênio em relação aos outros efluentes, o que pode indicar que essa fonte de substrato é favorável ao desenvolvimento das culturas presentes nos grãos de Kefir.

Comparando os resultados de forma geral para os dois inóculos, com exceção do glicerol, que com o inóculo I não proporcionou produção de hidrogênio, para a vinhaça, sacarose e esgoto sanitário os inóculos tiveram comportamentos próximos na produção de hidrogênio.

Com relação à produção sequencial de hidrogênio e metano, a interação entre as fases acidogênica e metanogênica ocorreu em todos os sistemas, com produtos da primeira fase sendo utilizados na segunda fase. A vinhaça e o glicerol apresentaram os maiores potenciais de aplicação, sendo que o perfil temporal de ácidos e de álcoois dá a indicação que o inóculo acidogênico assumiu um papel importante na decomposição da molécula de glicerol para a formação de outros compostos. Especialmente, o perfil

dos ácidos acético e butírico indica que estes podem ter sido a principal fonte para a formação de metano.

Pode-se observar também uma produção de etanol na fase metanogênica, o que pode ser explicado pela estratégia de filtração, para a retirada da biomassa acidogênica, que possivelmente não foi totalmente eficiente, sendo que outros resultados também podem ter sido afetados.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Sendo assim, concluindo de forma mais ampla, a oportunidade de desenvolver e atuar em um projeto de pesquisa proporcionou experiências que me auxiliarão para muitas atividades futuras, sendo que novos conhecimentos foram adquiridos ao longo da pesquisa, complementando os conhecimentos obtidos na graduação. Além disso, foi possível aprender uma linha de raciocínio para escrever e desenvolver um projeto de pesquisa, sendo muito interessante o contato direto com análises e equipamentos de laboratório.

Outro fator importante é saber que a pesquisa realizada possui a característica de reverter os resultados para a população, buscando possíveis aplicações, bem como desenvolver futuras pesquisas que auxiliarão profissionais e pesquisadores da área.

8. BIBLIOGRAFIA

- ALVES, M. M.; MOTA, M.; MAGGIOLLY, J. – *Técnicas de caracterização e estudo de digestores anaeróbios*. Boletim de Biotecnologia. Departamento de Engenharia Biológica – Universidade do Minho, p. 25-37, 2001.
- ANVISA – Resolução nº 386 de 5 de Agosto de 1999.
http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/386_99.htm (Acessado em 20/07/2010).
- ANZOLA ROJAS, M.P. – *Influência da relação C/N na produção de hidrogênio em reator anaeróbico de leito fixo*. Dissertação de Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo (USP), 2010, 67P.
- APHA. – *Standard methods for the examination of waste and wastewater*. American Public Health Association, Washington, D.C. 19th Ed., 1998.
- ARRUDA, P.V., RODRIGUES, R.C.L.B., FELIPE, M.G.A. *Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica*. Revista Analytica, n.26, 56-62, Dezembro 2006/Janeiro 2007.
- BRISSON, D.; VOHL, M.C.; ST.-PIERRE, J.; HUDSON, T.J.; GAUDET, D. – *Glycerol: a neglected variable in metabolic process?* BioEssays, 23(6), 534-542, 2001.
- CARVALHO, M.; VILELA, P.S.; OLIVEIRA, R.O. – *Biodiesel em Minas Gerais: riscos e oportunidades*, Assessoria Técnica, 2007.
- CHANG, F.Y.; LIN, C.Y. – *Biohydrogen production using an up-flow anaerobic sludge blanket reactor*. International Journal of Hydrogen Energy, 29, 33 – 39, 2004.
- CHEN WH, CHEN SY, KHANAL SK, SUNG S. *Kinetic study of biological hydrogen production by anaerobic fermentation*. Int J Hydrogen Energy 2006;31:2170–8.
- CHEN, C.C.; LIN, C.Y. – *Using sucrose as a substrate in an anaerobic hydrogen-producing reactor*. Advances in Environmental Research, 7(3), 695-699, 2003.
- CHERNICHARO, C.A.L. – *Princípios do tratamento biológico de águas residuárias: Reatores Anaeróbios*, Vol.5. 2ed. Belo Horizonte, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – Universidade Federal de Minas Gerais, 2007. 380p.
- DAS, DEBABRATA; VEZIROGLU, T.N. – *Hydrogen production by biological processes: a survey of literature*. International Journal of Hydrogen Energy, 26(1), 13-28, 2001.
- DEL NERY, V. *Utilização de lodo anaeróbio imobilizado em gel no estudo de partida de reatores de fluxo ascendente com manta de lodo*. Dissertação de Mestrado, Escola de Engenharia de São Carlos, USP, 1987.
- DOM'S SITE. Dom's Kefir in-site, 2007.
- DORNELLES, A.S.; RODRIGUES, S. – *Fermentação alcoólica de caldo de cana utilizando grãos de kefir*. Revista Ciência Agrônômica, 37(3), 386-390, 2006.

- DUBOIS, S.M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.L.; REBERS, P.A.; SMITH, F. – *Colorimetric methods for determination of sugar and related substance*. Analytical Chemistry, 28(3), 350-356, 1956.
- FANG, H.P.; LIU, H. – *Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture*. Bioresource Technology, 82(1), 87-93, 2002.
- FERNANDES, B.S. – *Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo*. Tese de Doutorado, Escola de Engenharia de São Carlos-USP, São Carlos, 2008. 116p.
- FERNANDES, B.S.; PEIXOTO, G.; ALBRECHT, F.R.; AGUILA, N.K.S.; ZAIAT, M. – *Potential to produce biohydrogen from various wastewaters*. Energy for Sustainable Development, 14(2), 143-148, 2010.
- FRANCISCO JUNIOR, R., SCHELEUDERER, J., VENTURELLI, S.S., ROCHA, G.C., *Alternatives for soil disposal of excess activated sludge from the industrial waste treatment plant at Alcoolquímica Nacional*, Water Science and Technology, 19(8), pp.127-137 (1987).
- GARCÍA, I.G., VENCESLADA, J.L.B., PEÑA, P.R.J., GÓMEZ, E.R., *Biodegradation of Phenol compounds in vinasse using Aspergillus terreus and Geotrichum candidum*. Water Research, 8, pp.2005-2011(1997).
- GAZETTA, M.L.& CELLIGOI, M.A.P.C., *Estudo de diferentes combinações de melaço/vinhaça como substrato para produção de proteínas e lipídios por microrganismos*. Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas, Londrina, v. 27, p.3-10 (2006)
- GOLDEMBERG, J. – *Políticas para enfrentar o aquecimento global*, In: Aquecimento Global, O relatório do Greenpeace, ed. Fundação Getulio Vargas, Rio de Janeiro, p. 152-174, 1992.
- HALLENBECK, P.C. – *Fundamental of the fermentative production of hydrogen*. In: Proceedings of the 10th World Congress Anaerobic Digestion, Montreal, Canada, 241-248, 2004.
- HAN, S.K.; SHIN, H.S. – *Biohydrogen production by anaerobic fermentation of food waste*. International Journal of Hydrogen Energy, 29, 569-577, 2004.
- HARPER, S.R.; POHLANDER, F.G. – *Recent Development in Hydrogen Management During Anaerobic Biological Wasterwater Treatment*. Biotechnology and Bioengineering, 28(4), 585 – 602, 1986.
- HAWKES, F.R.; FORSEY, H.; PREMIER, G.C.; DINSDALE, R.M.; HAWKES, D.L.; GUWY, A.J.; CHERRYMAN, J.M.S.; SHINE, J.; AUTY, D. – *Fermentative production of hydrogen from a wheat flour industry co-product*. Bioresource Technology, 99(11), 5020-5029, 2008.
- <http://users.chariot.net.au/~dna/kefirpage.html>. (Acessado em 20/07/2010)
- <http://www.faemg.org.br/Content.aspx?Code=13&ParentCode=2&ParentPath=None&ContentVersion=C> (Acessado em 20/07/2010)

- HUNG, C.H., LEE, K.S., CHENG, L.H., HUANG, Y.H., LIN, P.J., CHANG, J.S. *Quantitative analysis of a high-rate hydrogen-producing microbial community in anaerobic agitated granular sludge bed bioreactors using glucose as substrate*. Journal Applied Microbiology and Biotechnology. 2007; 75 (3): 693-701.
- HUTNAN, M.; DRTIL, M.; MRAFKOVA, L.; DERCO, J.; BUDAY, J. – *Comparison of start up and anaerobic wastewater treatment in UASB, Hybrid and Baffled reactor*. Bioprocess and Biosystems Engineering, 21(5), 439-445, 1999.
- ITO, T.; NAKASHIMADA, Y.; SENBA, K.; MATSUI, T.; NISHIO, N. – *Hydrogen and Ethanol Production from Glycerol-Containing Wastes Discharged after Biodiesel Manufacturing Process*. Journal of bioscience and bioengineering, 100 (3), 260–265, 2005.
- JACKOBSON, G.; KATHAGEN, F.W.; KLATT, M. – *Glycerol*. In: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Weinheim: VCH Verlag, 477-489, 1989.
- LAY, J.J.; LEE, Y.J.; NOIKE, T. – *Feasibility of biological hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste*. Water Research, 33(11), 2579-2586, 1999.
- LEE, K.S.; LO, Y.S.; LO, Y.C.; LIN, P.J.; CHANG, J.S. – *H₂ production with anaerobic sludge using activated-carbon supported packed-bed bioreactors*. Biotechnology Letter, 25(2), 133-138, 2003.
- LEITE, G.F. – *Avaliação econômica da adubação com vinhaça e da adubação mineral de soqueiras de cana-de-açúcar na Usina monte Alegre Ltda – Monte Belo – MG*. Revista da Universidade de Alfenas, Alfenas-MG, vol. 5, 189-191, 1999.
- LEITE, J.A.C.; FERNANDES, B.S.; POZZI, E.; BARBOZA, M.; ZAIAT, M. (2008). – *Application of an Anaerobic Packed-bed Bioreactor for the Production of Hydrogen and Organic Acids*. International Journal of Hydrogen Energy, 33(2), 579-586, 2008.
- LEVIN D.B., PITT L, LOVE M. (2004). *Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application*. International Journal of Hydrogen Energy., vol. 29, pp. 173-185.
- LI, J.; LI, B.; ZHU, G.; REN, N.; BO, L.; HE, J. – *Hydrogen production from diluted molasses by anaerobic hydrogen producing bacteria in an anaerobic baffled reactor (ABR)*. International Journal of Hydrogen Energy, 32(15), 3274 – 3283, 2007.
- LIN, C.Y.; LAY, C.H. – *Carbon/nitrogen-ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora*. Internaciona Journal of Hydrogen Energy, 29, 41– 45, 2004.
- LOPES, F.D.; REVELLA, J.L.G.; MUNILLA, M.H. – *Glicerol*. In: Manual dos Derivados da Cana-de-Açúcar: diversificação, matérias-primas, derivados do bagaço do melaço, outros derivados, resíduos, energia. Brasília: IBIPTI, cap. 5.4, 393-397, 1999.
- MAINTINGUER, S. I., FERNANDES, B. S., DUARTE, I. C. S., SAAVEDRA, N. K., ADORNO, M. A. VARESCHE, M. B., *Fermentative hydrogen production by microbial consortium*, International Journal of Hydrogen Energy 33 (2008) 4309 – 4317.

- MALVESTIO, A.C ; LEITE, J. A. C. ; BARBOZA, M. ; ZAIAT, M. . *Volatile Fatty Acids Separation by ion exchange chromatography in fixed bed column*. In: III International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology, 2009, Lisboa. Biomicroworld 2009, 2009.
- MIZUNO, O.; DINSDALE, R.; HAWKES, F.R.; HAWKES, D.L, NOIKE, T. – *Enhancement of hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging*. *Bioresour. Technology*, 73(1), 59–65, 2000.
- MOHAN S.V.; BABU, V.L.; SARMA, P.N. – *Effect of various pretreatment methods on anaerobic mixed microflora to enhance biohydrogen production utilizing dairy wastewater as substrate*. *Bioresource Technology*, 99(1), 59–67, 2008.
- MOREIRA, M.E.C.; SANTOS, M.H.; PEREIRA, I.O.; FERRAZ, V.; BARBOSA, L.C.A.; SCHNEEDORF, J.M. – *Atividade antiinflamatória de carboidrato produzido por fermentação aquosa de grãos de quefir*. *Química Nova*, 31(7), 1738-1742, 2008.
- MORRISON, L.R. – *Glycerol*. In: *Encyclopedia of Chemical Technology*. New York: Wiley, 921-932, 1994.
- MU, Y.; YU, H.Q.; WANG, G. – *A kinetic approach to anaerobic hydrogen-producing process*. *Water Research*, 41(5), 1152 – 1160, 2007.
- NGUYEN, T.A.D.; KIM, J.P.; KIM, M.S.; OH, Y.K.; SIM S.J. – *Optimization of hydrogen production by hyperthermophilic eubacteria, Thermotoga maritima and Thermotoga neapolitana in batch fermentation*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(5), 1483-1488, 2008
- O'FLAHERTY, V.; COLLINS, G.; MAHONY, T. – *The microbiology and biochemistry of anaerobic bioreactors with relevance to domestic sewage treatment*. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 5(1), 39-55, 2006.
- PEIXOTO, G. – *Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo e fluxo ascendente a partir de água residuária de indústria de refrigerantes*. Dissertação de Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo (USP), 2008. 123P.
- POWELL, J.E., *Bacteriocins and bacteriocin producers present in kefir and kefir grains*. Department of food science, (2006).
- PRADA, S.M., GUEKEZIAN, M., SUÁREZ-IHA, M.E.V., *Metodologia analítica para a determinação de sulfato em vinho*, *Química Nova*, 21(3), pp. 249-252 (1998).
- REHM, H., – *Microbial production of glycerol and other polyols*. In: *Biotechnology*. vol. 6B. Special microbial process. Weinheim, VCH, 1988.
- REN N.Q., CHUA, H., CHAN, S.H., TSANG, Y.F., WANG, Y.J., SIN, N. *Assessing optimal fermentation type for bio-hydrogen production in continuous-flow acidogenic reactors*. *Bioresource Technology*. 2007; 98(9): 1774-1780.
- ROSSETTO, A. J. *Utilização Agronômica dos Subprodutos e Resíduos da Indústria Açucareira e Alcooleira*. In: PARANHOS, S. B. (Coord.) *Caná de açúcar - cultivo e utilização*. Campinas: Fundação Cargill, 1987. 2.4.p.433-504.

- SEIFERT, K; WALIGORSKA, M.; WOJTOWSKI, M.; LANIECKI, M. – *Hydrogen generation from glycerol in batch fermentation process*. International Journal of Hydrogen Energy, 34(9), 3671 – 3678, 2009.
- SHIN, J.H.; YOON, J.H.; AHN, E.K.; KIM, M.S.; SIM, S.J.; PARK, T.H. – *Fermentative hydrogen production by the newly isolated Enterobacter asburiae SNU-1*. International Journal of Hydrogen Energy, 32(2), 192–199, 2007.
- SPEECE, R.E., *Anaerobic biotechnology for industrial wastewater treatment*. Ed. Archae Press, Nashville (1996).
- STENERSON, K. – *Analysis of Permanent Gases*. The Reporter, 3(1), 3, 2004.
- STIVAL, N.E.C.F. – *Análise da viabilidade do processo de conversão de glicerol em produtos de valor agregado pela ação microbiológica*. Dissertação de Mestrado em Tecnologia Ambiental – Centro de Ciências Exatas, Naturais e Tecnologias, Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP), 2009. 113p.
- TAGUCHI, F.; MIKUKAMI, N.; SAITO-TAKI, T.; HASEGAWA, K. – *Hydrogen production from continuous fermentation of xylose during growth of Clostridium sp. strain No. 2*. Canadian Journal of Microbiology, 41(6), 536–540, 1995.
- TEMUDO, M.F.; POLDERMANS, R.; KLEEREBEZEM, R.; VAN LOOSDRECHT, M.C.M. – *Glycerol fermentation by (open) mixed cultures: A chemostat study*. Biotechnology and Bioengineering 100(6), 1088-1098, 2008.
- TOSETTO, M.G.; ANDRIETTA, S.R. – *Cinética de produção de glicerol em processo de fermentação alcoólica utilizando diferentes matérias primas industriais*. In: Anais do 14º SINAIFERM (Simpósio Nacional de Fermentações), CDROM, Florianópolis, 2003.
- VAN GINKEL, S.W.; OH, S.E.; LOGAN, B.E. – *Biohydrogen gas production from food processing and domestic wastewaters*. International Journal of Hydrogen Energy, 30(12), 1535-1542, 2005.
- VAZQUEZ, I.V.; SPARLING, R.; RISBEY, D.; SEIJAS, N.R.; VARALDO, H.M.P. – *Hydrogen generation via anaerobic fermentation of paper mill wastes*. Bioresource Technology, 96(17), 1907– 1913, 2005.
- VIANA, A.B., *Tratamento anaeróbio de vinhaça em reator UASB operado em temperatura na faixa termofílica (55°C) e submetido ao aumento progressivo de carga orgânica*. Dissertação de Mestrado. EESC-USP, São Carlos (2006).
- WANG, L. *et al.*, Biomass and Bioenergy, 2006, 30 (2), 177-182.
- WITTHUHN, R.C.; SCHOEMAN, T.; BRITRIZ, T.J. – *Characterization of the microbial population at different stages of kefir production and kefir grain mass cultivation*. International Dairy Journal, 15(4), 383-389, 2005.
- ZHANG, Y.; SHEN, J. – *Effect of temperature and iron concentration on the growth and hydrogen production of mixed bacteria*. International Journal of Hydrogen Energy, 31(4), 441–446, 2006.