**TESES 2021**

Proteína ligadora de odor 17 (RproOBP17) de Rhodnius prolixus como alvo molecular para o controle populacional do vetor da doença de Chagas

**Autor:**

NATHALIA FARO DE BRITO

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

TESE

**Abreviatura:**

BRITO, N. F.

**Data da Defesa:**

14/05/2021

**Resumo:**

A doença de Chagas é considerada uma doença tropical negligenciada que ainda afeta cerca de 7 milhões de pessoas em todo o mundo. Seu agente etiológico é o protozoário Trypanosoma cruzi, transmitido por insetos triatomíneos conhecidos como barbeiros, dentre os quais o Rhodnius prolixus é um vetor importante, principalmente na região andina da América do Sul e na América Central. Como não existe vacina para a doença de Chagas, o controle do vetor é o meio mais eficaz de prevenção da infecção. No entanto, o manejo de populações de vetores triatomíneos usando inseticidas químicos parece não ter sucesso. Repelentes clássicos que se mostraram úteis para proteção constra mosquitos, como o DEET, IR3535 e icaridina também se mostraram ineficazes para triatomíneos. Uma vez que é bem estabelecido que a interpretação de sinais químicos no ambiente é essencial para a sobrevivência do inseto, o mecanismo molecular associado ao sistema olfativo tornou-se uma área de interesse para pesquisas com o objetivo de desenvolver novas estratégias de controle capazes de interferir em respostas comportamentais mediadas pela olfação. Diversas proteínas participam do processo de olfação, dentre as quais destacam-se as proteínas ligadoras de odor (OBP), responsáveis pelo transporte de semioquímicos majoritariamente hidrofóbicos através da linfa sensilar até os receptores olfativos (ORs) localizados na membrana dos dendritos sensoriais, iniciando a trandução do sinal olfativo e a resposta comportamental associada. OBPs são proteínas pequenas e solúveis secretadas na linfa sensilar por células acessórias. Como odores não chegam até os ORs sem o auxílio de uma OBP, elas podem ser usadas como alvos moleculares para triagem de novos compostos comportamentalmente ativos em insetos (atrativos ou repelentes) por meio de uma abordagem conhecida como ecologia química reversa. Para utilizar OBPs nesse tipo de estudo, é essencial focar em OBPs funcionais, ou seja, aquelas realmente envolvidas na comunicação química. Além de selecionar OBPs funcionais, protocolos de expressão e purificação capazes de produzir a proteína recombinante para análises in vitro também precisam ser elaborados para torná-la um alvo adequado. Portanto, o objetivo desse estudo foi utilizar a RproOBP17 como alvo molecular visando o desenvolvimento de novas estratégias de controle vetorial. Os resultados revelaram que a expressão do RproOBP17 ocorre especificamente em antenas e não depende do estado nutricional do R. prolixus. Utilizando análises experimentais associadas a estudos in silico, foi possível hipotetizar a participação dessa proteína na detecção de voláteis da glândula de Brindley, como 2-metilpropanoato de 2- feniletila, 2-feniletanol e 2-metilpropanoato de 2-metilpropila. A expressão e purificação da RproOBP17 também foi realizada com sucesso. Finalmente, a triagem in silico por novos compostos comportamentalmente ativos usando a OBP17 sugeriu alta afinidade de ligação por compostos como cedrol, α-humuleno, β-cariofileno e β-damascenona.

**Palavras-chave:**

proteína ligadora de odor (OBP);Rhodnius prolixus;olfação;controle vetorial;comunicação química

**Abstract:**

Chagas disease is considered a neglected tropical disease which still affects around 7 million people worldwide. Its etiological agent is the protozoan Trypanosoma cruzi, transmitted by triatomine insects known as kissing bugs, amongst which Rhodnius prolixus is a major vector, especially in the Andean region of South America and in Central America. Seeing that there is no vaccine for Chagas disease, vector control has been the most effective means for preventing infection. However, population management of triatomine vectors using chemicals has been repeatedly unsuccessful. A while ago, insecticide resistance of triatomines was considered unlikely due to their long life-cycle and low genetic variability. Nonetheless, several studies have reported the resistance of different species to various insecticides, essentially the most commonly used pyrethroids. Classic repellents shown to be useful for protection against mosquito populations such as DEET, IR3535 and picaridin were also proven ineffective when dealing with triatomines. Since it is well established that interpretation of chemical signals from the environment is essential for insect survival, the molecular mechanism underlying their olfactory system has become an area of interest for research aiming to develop new strategies for vector control capable of interfering in olfaction-mediated behavioral responses. After reaching the antennae, semiochemicals penetrate the cuticle through pores in the sensilla and arrive at the aqueous environment of the sensillar lymph, rich in soluble proteins. Several proteins take part in insect olfaction, including odorant-binding proteins (OBPs), responsible for binding and transporting hydrophobic odorants across the sensillar lymph until they reach sensory dendrites and activate membrane-bound odorant receptors (ORs), initiating the transduction of the olfactory signal that will evoke a behavioral response. OBPs are small soluble proteins secreted by accessory cells into the sensillar lymph. Given that no odorant comes to ORs except through OBPs, they can be used as molecular targets for the screening of new insect behaviorally active compounds (attractants or repellents) through a reverse chemical ecology approach. In order to use OBPs as molecular targets in that kind of study, it is essential to focus on functional OBPs, namely, the ones actually involved in chemical communication. Therefore, the purpose of this study was to use OBP17 from R. prolixus (RproOBP17) as a molecular target aiming at the development of novel strategies for population management of this vector. Results revealed that RproOBP17 is antennae-specific and non-dependent of the insects’ nutritional state. Combining experimental analysis and in silico studies, we were able to hypothesize a role for RproOBP17 in detecting Brindley’s glands volatiles, like 2- phenylethyl 2-methylpropanoate, 2-phenylethanol, 2-methylpropyl 2-methylpropanoate. We have also been able to successfully express and purify RproOBP17. Finally, virtual screening for potential behaviorally active compounds using RproOBP17 suggested high binding affinity for ligands such as cedrol, α-humulene, β-caryophyllene and β-damascenone.

**Keywords:**

odorant-binding protein (OBP);Rhodnius prolixus;olfaction;vector control;chemical communication

**Título:**

Atividade antitumoral do clotrimazol em um modelo de melanoma murino: inibição da PI3K e indução da repolarização de macrófagos associados ao tumor.

**Autor:**

ALAN CLAVELLAND OCHIONI

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

TESE

**Abreviatura:**

OCHIONI, A. C.

**Data da Defesa:**

11/05/2021

**Resumo:**

O câncer é um grave problema de saúde global e tem sido uma das principais causas de morbimortalidade nos países desenvolvidos e em desenvolvimento. Existem muitos elementos que contribuem para o estabelecimento e a progressão do tumor, um dos quais está relacionado a alterações no metabolismo das células tumorais. O efeito Warburg ou glicólise aeróbica direciona o fluxo glicolítico para a produção de lactato e contribui para o desenvolvimento do tumor. Estudos prévios demonstraram que a alta produção de lactato pelas células tumorais está relacionada à polarização de macrófagos, contribuindo para a agressividade do tumor. Nesse contexto, a ação de fármacos moduladores do metabolismo tumoral pode diminuir a produção de lactato por estas células. Dentre estes destacamos o clotrimazol (CTZ), um modulador negativo da glicólise nas células tumorais. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar se a inibição do metabolismo tumoral e, consequentemente da produção de lactato, pelo CTZ poderia promover a redução da polarização de macrófagos para um perfil anti-inflamatório contribuindo para a inibição da tumorigênese. Neste trabalho foram utilizadas células de melanoma murino (B16F10) e linhagens celulares de macrófagos murinos (J774 e Raw 264.7), além de macrófagos murinos em cultura primária (BMDM). Para os ensaios in vivo, células B16F10 foram injetadas por via subcutânea no dorso de camundongos C57BL/6J os quais foram tratados por 15 dias com CTZ. Nossos resultados mostram que o CTZ reduz o crescimento tumoral através da modulação do metabolismo celular. Adicionalmente, observamos uma menor infiltração de macrófagos nos tumores dos animais tratados. Os macrófagos remanescentes no microambiente tumoral apresentaram um perfil pró-inflamatório, ou seja, antitumoral. Estes resultados foram confirmados em experimentos com linhagens celulares em cultura e indicam que: a) em células tumorais o CTZ inibe a via da PI3K promovendo a inibição do metabolismo glicolítico tumoral com consequente redução da produção de lactato por estas células; b) o lactato secretado pelas células tumorais induz a polarização de macrófagos para um perfil M2, ou seja, pró-tumoral; c) o CTZ induz a repolarização dos macrófagos para um perfil M1 (pró-inflamatório) contribuindo para sua ação anticâncer. Por fim, nossos resultados demonstram que este fármaco apresenta efeitos promissores agindo sobre ambos os tipos celulares atuando, especialmente, no crosstalk entre células tumorais-macrófagos.

**Palavras-chave:**

Cãncer;Inflamação;Lactato;Citotoxicidade;PI3K

**Abstract:**

Cancer is a serious global health problem and has been a major cause of morbidity and mortality in developed and developing countries. There are many elements that contribute to the establishment and progression of the tumor, one of which is related to changes in the metabolism of tumor cells. The Warburg effect or aerobic glycolysis directs the glycolytic flow to the production of lactate and contributes to the development of the tumor. Previous studies have shown that high lactate production by tumor cells is related to macrophage polarization, contributing to tumor aggressiveness. In this context, the action of drugs that modulate tumor metabolism may decrease the production of lactate by these cells. Among these drugs we highlight clotrimazole (CTZ), a negative modulator of glycolysis in tumor cells. The present study aimed to evaluate whether inhibition of tumor metabolism and, consequently, lactate production, could promote the reduction of macrophage polarization to an anti-inflammatory profile contributing to the inhibition of tumorigenesis. In this work, murine melanoma cells (B16F10) and murine macrophage cell lines (J774 and Raw 264.7) were used, in addition to murine macrophages in primary culture (BMDM). For in vivo assays, B16F10 cells were injected subcutaneously into the back of C57BL/6J mice which were treated for 15 days with CTZ. Our results show that CTZ reduces tumor growth by modulating cellular metabolism. Additionally, we observed a decreased macrophage infiltration in the tumors of the treated animals. The remaining macrophages in the tumor microenvironment showed a pro-inflammatory, i.e. anti-tumor, profile. These results were confirmed by experiments with cultured cell lines and indicate that: a) in tumor cells, CTZ inhibits the PI3K pathway promoting the inhibition of tumor glycolytic metabolism with a consequent reduction in lactate production; b) lactate secreted by the tumor cells induces the polarization of macrophages to a M2 profile, i.e. pro-tumor macrophages; c) CTZ induces the repolarization of macrophages to a M1 profile (pro-inflammatory and anti-tumor) contributing to its anti-cancer action. Finally, our results demonstrate that this drug has promising effects acting on both cell types acting, especially, on the crosstalk between tumor- macrophage cells.

**Keywords:**

Cancer;Inflamation;Lactate;cytotoxicity;PI3K

**Título:**

RAMINOLIPÍDEOS E O PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA EM Pseudomonas aeruginosa PAO1

**Autor:**

MICHELE ROCHA CASTRO

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

TESE

**Abreviatura:**

CASTRO, M.R.

**Data da Defesa:**

30/03/2021

**Resumo:**

Pseudomonas aeruginosa é um patógeno oportunista capaz de causar infecções em indivíduos imunocomprometidos. É também um importante organismo modelo para o estudo de comportamentos multicelulares, como a formação de biofilmes aderentes e a motilidade celular. A formação de biofilmes por essa espécie bacteriana envolve muitos fatores, tais como Quorum Sensing (QS), exopolissacarídeos (EPS), fímbria tipo IV, flagelos e raminolipídeos. Raminolipídeos são glicolipídios que apresentam grande eficiência tensoativa, cuja biossíntese é controlada em nível transcricional e pós-transcricional, por mecanimos regulatórios complexos, que incluem os sistemas de QS e reguladores globais, como fatores sigma alternativos. Os raminolipídeos são produzidos pela via biossintética RhlABC e estão diretamente relacionados à cinética de formação de biofilmes e à motilidade bacteriana. Esta relação é comumente associada às propriedades físico-químicas dessa classe de moléculas, classificadas como biossurfactantes. Dentre os produtos da via RhlABC, em P. aeruginosa, os três principais são o ácido 3- (3-hidroxialcanoiloxi) alcanóico (HAA), L-raminosil-3-hidroxidecanoil-3-hidroxidecanoato (mono-raminolipídeo) e L-raminosil-L-raminosil-3-hidroxidecanoil-3-hidroxidecanoato (di-raminolipídeo). O HAA é sintetizado através da enzima RhlA, sendo convertido em mono-raminolipídeo pela enzima RhlB. Em seguida, o mono-raminolipídeo pode ser convertido em di-raminolipídeo pela enzima RhlC. A RhlA é, portanto, uma enzima-chave na produção de biossurfactantes do tipo raminolipídeo em P. aeruginosa. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo investigar os mecanismos bioquímicos associados ao papel fisiológico dos raminolipídeos, através da análise comparativa do perfil de expressão gênica da linhagem P. aeruginosa PAO1 e sua derivada deficiente na biossíntese de raminolipídeos, mutante rhlA-negativa, empregando-se microarranjos de DNA. O desenho experimental empregou o RNA total obtido a partir de cultivos bacterianos em fase estacionária. A análise apontou 134 genes diferencialmente expressos na mutante rhlA, em relação à cepa selvagem, sendo 91 genes regulados positivamente e 43 negativamente, compreendendo diferentes categorias funcionais, indicando uma diferença fisiológica significativa entre as cepas produtora e não produtora de raminolipídeos. Dentre as observações mais importantes, vários genes flagelares mostraram-se reprimidos na cepa mutante, alguns dos quais foram selecionados e testados por RT-qPCR, confirmando o perfil de repressão, que está diretamente relacionado aos fenótipos de motilidade da cepa rhlA-negativa, deficiente para swarming e twitching. Por outro lado, foi observada a indução da expressão dos genes pilO e pilA, que codificam proteínas integrantes da fímbria tipo IV. Foi também verificada a indução da expressão de genes de um sistema de secreção do tipo VI (hcp1) e outros relacionados à produção de EPSs. Os resultados obtidos sugerem um possível padrão de regulação da expressão gênica, mediada pelos raminolipídeos e/ou seus precursores, HAA, ausentes na cepa rhlA-negativa. Ensaios fenotípicos reforçam essa hipótese, já que na ausência dos raminolipídeos, conforme demonstrado para a cepa mutante rhlA, ocorre a redução da motilidade swarming, fato esse que pode ser atribuído à repressão da biossíntese flagelar observada nesse estudo. No presente estudo, foi também realizada a suplementação da cepa mutante com raminolipídeos exógenos, que teve sua motilidade do tipo swarming restaurada em nível semelhante aos da cepa selvagem, fato este observado pela primeira vez nesse trabalho. Portanto, a análise transcriptômica global por microarranjos de DNA mostrou-se relevante para a elucidação dos prováveis mecanismos moleculares envolvidos na dinâmica regulatória dos biossurfactantes raminolipídicos e/ou HAA sobre fenótipos como a formação de biofilmes e motilidade em P. aeruginosa PAO1, que são importantes fatores adaptativos e de virulência.

**Palavras-chave:**

Pseudomonas aeruginosa;raminolipídeos;motilidade;swarming;flagelos;biossurfactantes;rhlA;DNA microarray

**Abstract:**

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen capable of causing infections in immunocompromised individuals. It is also an important model organism for the study of multicellular behaviors, such as the formation of adherent biofilms and cellular motility. The formation of biofilms by this bacterial species involves many factors, such as Quorum Sensing (QS), exopolysaccharides (EPS), fimbria type IV, flagella and rhamnolipids. Rhamnolipids are glycolipids that have great surfactant efficiency, whose biosynthesis is controlled at the transcriptional and post-transcriptional levels, by complex regulatory mechanisms, which include the QS systems and global regulators, as alternative sigma factors. Rhamnolipids are produced by the RhlABC biosynthetic pathway and are directly related to biofilm formation kinetics and bacterial motility. This relationship is commonly associated with the physicochemical properties of this class of molecules, classified as biosurfactants. Among the products of the RhlABC pathway, in P. aeruginosa, the three main ones are 3- (3-hydroxyalkanoyloxy) alkanoic acid (HAA), L-rhamnosyl-3-hydroxidecanoyl-3-hydroxidecanoate (mono-rhamnolipid) and L-rhamnosyl-L-rhamnosyl-3-hydroxidecanoyl-3-hydroxidecanoate (di-rhamnolipid). HAA is synthesized through the enzyme RhlA, being converted into mono-rhamnolipid by the enzyme RhlB. Then, the mono-rhamnolipid can be converted to di-rhamnolipid by the enzyme RhlC. RhlA is, therefore, a key enzyme in the production of rhamnolipid-type biosurfactants in P. aeruginosa. Thus, the present study aimed to investigate the biochemical mechanisms associated with the physiological role of rhamnolipids, through the comparative analysis of the gene expression profile of the P. aeruginosa PAO1 strain and its derivative deficient in rhamnolipids biosynthesis, a rhlA-negative mutant, using DNA microarrays. The experimental design used the total RNA obtained from bacterial cultures in stationary phase. The analysis showed 134 genes differentially expressed in the mutant rhlA, in relation to the wild strain, with 91 genes regulated positively and 43 negatively, comprising different functional categories, indicating a significant physiological difference between the producing and non-producing strains of rhamnolipids. Among the most important observations, several flagellar genes were shown to be repressed in the mutant strain, some of which were selected and tested by RT-qPCR, confirming the repression profile, which is directly related to the motility phenotypes of the deficient rhlA-negative strain for swarming and twitching. On the other hand, it was observed the induction of expression of pilO and pilA genes, which encode type IV fimbriae proteins. The induction of gene expression of a type VI secretion system (hcp1) and others related to the production of EPS was also verified. The results obtained suggest a possible pattern of regulation of gene expression, mediated by rhamnolipids and/or their precursors, HAA, absent in the rhlA-negative strain. Phenotypic assays reinforce this hypothesis, since in the absence of rhamnolipids, as demonstrated for the mutant strain rhlA, there is a reduction in swarming motility, a fact that can be attributed to the repression of flagellar biosynthesis observed in this study. In the present study, the mutant strain was also supplemented with exogenous rhamnolipids, which had its swarming motility restored to a level similar to that of the wild strain, a fact observed for the first time in this work. Therefore, the global transcriptomic analysis by DNA microarrays proved to be relevant for the elucidation of the probable molecular mechanisms involved in the regulatory dynamics of rhamnolipids biosurfactants and/or HAA on phenotypes such as biofilm formation and motility in P. aeruginosa PAO1, which are important adaptive and virulence factors.

**Keywords:**

Pseudomonas aeruginosa;rhamnolipids;motility;swarming;flagella;biosurfactants;rhlA;DNA microarray

**Título:**

APROVEITAMENTO BIOTECNOLÓGICO DA GLICERINA RESIDUAL DO BIODIESEL PARA GERAÇÃO DE HIDROGÊNIO, 1,3-PROPANODIOL E METANO

**Autor:**

MARIANA DE OLIVEIRA FABER

**Tipo de Trabalho de Conclusão:**

TESE

**Abreviatura:**

FABER, M. O.

**Data da Defesa:**

25/03/2021

**Resumo:**

Glicerina é o subproduto da produção de biodiesel, correspondente a 10% da massa total da reação de transesterificação. Atualmente, a maior parte a glicerina gerada no Brasil é exportada, porém este produto de baixo valor agregado pode ser utilizado internamente, promovendo a valorização da cadeia produtora de biodiesel como um todo. Por conter altos teores de glicerol em sua composição, a glicerina pode ser processada de diversas formas, inclusive em processos biotecnológicos. Nesta tese, um lote de glicerina proveniente de uma planta industrial de biodiesel foi utilizada como matéria-prima para produção de hidrogênio (H2) e 1,3-propanodiol (1,3-PDO) por processo fermentativo, e o efluente gerado neste processo foi utilizado como matéria-prima para a produção de metano (CH4) por digestão anaeróbia. Ambos os processo utilizaram lodo anaeróbio de estação de tratamento de esgoto como inóculo. Primeiramente, selecionou-se um lote de lodo anaeróbio, em função do ponto de coleta na ETE, mais propício para a produção de H2, bem como o tipo de pré-tratamento deste lodo que promovesse maior produção de H2 e apresentasse estabilidade do inóculo. Realizou-se então a produção de 1,3-PDO em meio contendo suplementos para a via redutora do metabolismo de glicerol, obtendo-se 3,47 g/L a partir de 10 g/L de glicerol, o que corresponde à eficiência de 61%. Em seguida foram realizadas alterações sequenciais no processo fermentativo para promover o aumento da produção de H2: aumento na concentração de substrato, volume de headspace e otimização dos componentes do meio, a saber; partindo-se de 1 g/L de glicerol, em frasco de penicilina com 10% de headspace e meio fermentativo não otimizado e alterando-se para 7 g/L de glicerol, em reator manométrico com ajustes no headspace passando para 50% comparativamente em meio composto por Tween 80, ureia e fosfatos, foi possível aumentar o volume específico de H2 gerado em 10 vezes e a produtividade volumétrica em 17 vezes. O efluente obtido neste processo foi empregado como matéria-prima para a metanogênese, sequencialmente, levando à produção de 822 mL/L de CH4 em 39 dias. A digestão anaeróbia do efluente da produção de H2 conduzida em meio não otimizado levou à produção de 857 mL/L em 28 dias, correspondendo à eficiência de 86%. O processo sequencial de produção de H2 e CH4 utilizando meio composto apenas por glicerina, lodo anaeróbio e água resultou na produtividade energética de 142 kJ/(d.gglicerol) e remoção de 95% da DQO do efluente em relação à alimentação. A digestão anaeróbia direta da glicerina resultou em uma produção de CH4 inferior à obtida em processo sequencial, a partir da mesma concentração de glicerol, indicando que a digestão anaeróbia em duas etapas é o processo mais indicado para valorização energética da glicerina. Portanto, nesta tese foram produzidos H2, 1,3-PDO e CH4 a partir de glicerina utilizando lodo anaeróbio de ETE como inóculo em processo simples e efetivo. Para produção de H2 e 1,3-PDO em único reator batelada foi necessário suplementar o meio fermentativo com nitrogênio, fósforo e Tween 80, porém para produção sequencial de H2 e CH4 a suplementação dos meios não se fez necessária.

**Palavras-chave:**

metano;hidrogênio;glicerina;1,3-propanodiol;fermentação;digestão anaeróbia

**Abstract:**

Glycerin is the by-product of biodiesel production, corresponding to 10% of the total mass of the transesterification reaction. Currently, most of the glycerin generated in Brazil is exported, however, this low value-added product can be exploited internally, promoting the valorization of the whole biodiesel production chain. Since it contains high levels of glycerol in its composition, glycerin can be processed in several ways, including biotechnological processes. In this thesis, glycerin from a biodiesel industrial plant was used as a raw material for the production of hydrogen (H2) and 1,3-propanediol (1,3-PDO) by dark fermentation, and the effluent generated in this process was used as raw material for the production of methane (CH4) by anaerobic digestion. Both processes used anaerobic sludge from a sewage treatment plant as an inoculum. First of all, the anaerobic sludge, depending on the collect point, most suitable for the production of H2 was selected, as well as the type of pre-treatment of that sludge that promoted higher H2 production and inoculum stability. Then, 1,3-PDO was produced using a medium containing supplements for the glycerol metabolism-reductive pathway, obtaining 3.47 g/L from 10 g/L glycerol, which corresponds to the efficiency of 61%. Then, sequential changes were made in the fermentation process to promote an increase in H2 production, namely; from 1 g/L of glycerol, in a penicillin flask with 10% headspace and non-optimized fermentation medium and changing to 7 g/L of glycerol, in a manometric reactor with 50% headspace and a comparatively medium containing Tween 80, urea and phosphates, it was possible to increase the specific volume of H2 by 10 times and the volumetric productivity by 17 times. The effluent obtained in this process was used as raw material for methanogenesis, sequentially, leading to the production of 822 mL/L of CH4 in 39 days. The anaerobic digestion of the effluent from H2 production carried out in a non-optimized medium led to the production of 857 mL/L in 28 days, corresponding to an efficiency of 86%. The sequential process of producing H2 and CH4 using a medium composed only of glycerin, anaerobic sludge, and water resulted in an energetic productivity of 142 kJ/(d.gglycerol) and 95% COD removal of the effluent comparing to the feed. Direct anaerobic digestion of glycerin resulted in lower CH4 production than that obtained in a sequential process, from the same concentration of glycerol, indicating that anaerobic digestion in two stages is the most suitable process for the energetic valorization of glycerin. Thus, in this thesis H2, 1,3-PDO and CH4 were produced from glycerin using anaerobic sludge as an inoculum through a simple and effective process. Aming at H2 and 1,3-PDO in a single batch reactor it was necessary to supplement the fermentative medium with nitrogen, phosphorus, and Tween 80, although to produce H2 and CH4, sequentially, the medium supplementation was not necessary.

**Keywords:**

glycerin;hydrogen;methane;1,3-propanediol;dark fermentation;anaerobic digestion