UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE HIDRÁULICA E SANEAMENTO
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA HIDRÁULICA E SANEAMENTO

ISABELE BAIMA FERREIRA FREITAS

Produção de hidrogênio e metabólitos com valor biotecnológico a partir do melaço da
cana-de-açúcar utilizando reatores de leito granular expandido mesofílicos

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos (SP)

2018

ISABELE BAIMA FERREIRA FREITAS

Produção de hidrogênio e metabólitos com valor biotecnológico a partir do melaço da cana-de-açúcar utilizando reatores de leito granular expandido mesofílicos

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências: Engenharia Hidráulica e Saneamento.

Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Silva

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos (SP)

2018

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

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues Fontes da
EESC/USP com os dados inseridos pelo(a) autor(a).

B74p	<p>Baima Ferreira Freitas, Isabele</p> <p>Produção de hidrogênio e metabólitos com valor biotecnológico a partir do melaço da cana-de-açúcar utilizando reatores de leito granular expandido mesofílicos / Isabele Baima Ferreira Freitas; orientador Edson Luiz Silva. São Carlos, 2018.</p> <p>Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento e Área de Concentração em Hidráulica e Saneamento -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2018.</p> <p>1. Biocombustível. 2. Biohidrogênio. 3. Ácido láctico. 4. Homoacetogênese. 5. Fermentação escura. I. Título.</p>
------	---

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Bacharela **ISABELE BAIMA FERREIRA FREITAS.**

Título da dissertação: "Produção de hidrogênio e metabólitos com valor biotecnológico a partir do melaço da cana-de-açúcar utilizando reatores de leito granular expandido mesofílicos".

Data da defesa: 18/05/2018.

Comissão Julgadora:

Resultado:

Prof. Dr. **Edson Luiz Silva**
(Orientador)

(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

Aprovada

Profa. Dra. **Sandra Imaculada Maintinguer**

(Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/UNESP - Araraquara)

Aprovado

Prof. Dr. **Deovaldo de Moraes Junior**

(Universidade Santa Cecília)

Aprovada

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento:

Prof. Dr. **Eduardo Mario Mendonço**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:

Prof. Associado **Luís Fernando Costa Alberto**

Aos meu pais, Cláudia e Júnior,

À minha avó, Vera,

Pela dedicação, amor e cuidado.

Por viverem os meus sonhos junto comigo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por fazer sempre melhor do que eu pedi ou sequer imaginei. Pela força diária e por estar perto mesmo quando eu estou longe.

Ao Prof. Edson Luiz, por ter sido muito mais que um orientador presente, competente, dedicado e cuidadoso. Por ter sido amigo e conselheiro. Por ter me acolhido como um pai. Obrigada por tudo.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro concedido por meio da bolsa de Mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pelo auxílio financeiro no projeto temático Processo 15/06246-7, sob coordenação do prof. Dr Marcelo Zaiat.

À Escola de Engenharia de São Carlos (EESC-USP) e à Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), por todo o suporte para realização desta pesquisa.

Aos professores, Davi Gasparini, Eduardo Cleto, Edson Luiz, Eduardo Mendiondo, Eugênio Foresti, Márcia Damianovic e Valdir Schalch, por todos os conhecimentos compartilhados durante as disciplinas do mestrado. Obrigada por me ajudarem a construir o tipo de profissional que eu quero ser.

Às professoras Mônica Lopes Aguiar e Márcia Damianovic, pela delicadeza, sugestões e contribuições no Exame de Qualificação.

À professora Sandra Maintinguer e ao Deovaldo de Moraes Júnior por aceitarem o convite para compor a banca examinadora da defesa de dissertação. Obrigada por toda a gentileza dos comentários e pelas contribuições valiosas para melhoria deste trabalho.

Ao Prof. Men de Sá, por ter sido o grande responsável pela minha inscrição no Mestrado. Sem os seus “puxões de orelha”, eu não estaria escrevendo esses agradecimentos. À Prof. Sandra Santaella e ao Renato Leitão, por me ensinarem sempre a sair da minha zona de conforto. Obrigada por me inspirarem como profissionais e, acima de tudo, como seres humanos. À Prof. Danielle Garcez e à Eunice Menezes por todo o apoio para que a graduação fosse concluída a tempo de fazer a matrícula no mestrado. Obrigada pela torcida de sempre!

Aos técnicos do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos, especialmente à Alexandra Gonçalves, Amadeus Gomes de Azevedo e Oscar da Silva, pela ajuda diária e por socorrerem nos momentos mais difíceis de operação dos reatores.

À minha mãe, Cláudia, por me ensinar o sentido mais amplo do amor. Por me deixar voar mesmo me querendo por perto. Por fazer da minha felicidade a dela. Por me dar coragem e força. Por me ensinar a sorrir com gosto pra vida. Ao meu pai, Júnior, por toda a confiança depositada em mim. Por me ensinar os valores mais importantes da vida. Às minhas avós, Vera e Judith, por todos os ensinamentos, amor, cuidado e preocupação de sempre. Aos meus irmãos, Paulo e Eduardo, por continuarem tirando o meu juízo mesmo estando longe. Não tem como explicar ou agradecer por esse laço. Sempre farei o impossível por vocês!

Aos colegas de laboratório do LCAII/DEQ/UFSCar (Andreza, Talles, Lucas, Camila, Andressa, Schayanna, Ariane, Lívia e Priscila). Aos alunos que me receberam, Lucas Rodrigues Andreza Simões e Talles Barcelos, por todo o cuidado em passar cada detalhe sobre os procedimentos do laboratório, especialmente ao Lucas que, diversas vezes, colocou as minhas necessidades acima das dele, sempre disposto a ajudar e a ensinar, sendo essencial para a realização deste trabalho. À Camila e à Andressa, pela relação de amizade e cuidado, por toda a ajuda na operação dos reatores, pelas conversas, lanches e por todo o apoio. Sem vocês, não teria sido da mesma forma. À Schayanna, que chegou para trazer sorrisos, alegrias e abraços calorosos diretamente do nordeste para o meu coração. À Ariane, Lívia e Priscila, pelo convívio, ajuda e boas conversas.

À Camila Menezes, por ter sido minha luz quando tudo era escuro, por ter sido o meu sorriso quando eu não tinha motivos para sorrir, por ter feito leve o que era pesado. Por ter sido lar, aconchego e amor. Por me fazer acreditar.

À Andressa Bernal, por todos os momentos juntas. Obrigada por ter me ensinado a expressar o que me incomoda. Obrigada pela sensatez, pelos conselhos, pelo cuidado, por abrir os meus olhos. Obrigada pela sua bondade de coração e por não ter desistido da gente.

Ao Allan Ogura, por ter me apresentado o mundo da maneira mais linda e cuidadosa possível. Por ter me acolhido como ninguém. Por ter sido a minha pessoa quando eu mais tive medo. Por ter me ensinado a ser sol.

Ao Luttemberg Ferreira e à Natanna Melo, por terem aquecido o meu coração. Ao Luttemberg, que me deu de presente os melhores sorrisos, as melhores histórias e uma amizade única, sincera e cheia de amor. À Natanna Melo, que cuidou tão bem mim, me alimentou, me adotou e me tratou como filha. Obrigada pelas comidas, alegrias, conselhos e gnomos. Gratidão eterna aos dois por terem sido o meu pedacinho de nordeste, o meu aconchego e o meu abraço.

À Camila, Livia, Michaela e Raquel, por me ensinarem sobre a relatividade do tempo e da distância. Obrigada pela intensidade dessa amizade e pelas melhores histórias virtuais. Em especial, à Livia e à Michaela, por terem sido minhas mães fora de casa. Obrigada por compartilharem comigo os momentos mais lindos de convivência, amor e cuidado. Não poderia ter tido melhores companheiras de lar e de vida.

À Marina Gomes, por ser a pessoa mais cuidadosa e gentil do universo. Obrigada pelos rolês, cinemas e comidas. À Allita Santos, por ter sempre o melhor sorriso, energia, abraço e palavras. À Gleyciara e à Naiza, por terem sido as primeiras pessoas a me acolherem em São Carlos, ainda no período de seleção do mestrado. À Naiza, obrigada, ainda, por ser a pessoa mais linda, amiga e animada que os rolês já viram.

Ao Danilo Ayabe, Hiago Schiano, David Rosa, Murilo Senhuki, Andressa Bernal e Camila Menezes, pelos rolês mais engraçados, divertidos e errados.

À turma de mestrado do PPGSHS/2016, por todos os momentos vividos e pela ajuda durante as disciplinas. Não poderia ter tido melhor turma.

Aos meus queridos amigos de graduação, Luana, Marina, Crica, Lia, Deborah, Giovana, Lorrana e Adson, por me mandarem sempre as melhores energias e por estarem sempre na torcida pelo meu sucesso. Especialmente à Lorrana e ao Adson, por toda a amizade e amor compartilhado à distância. Pela força diária e pela confiança. Obrigada por estarem sempre por aqui. Vocês fizeram tudo suportável.

À Camila Nobre e à Júlia Barros, por nunca deixarem a amizade esfriar, por sempre me mandarem amor, por sempre estarem presentes.

Ao Caio Corrêa, por ter feito o finalzinho do mestrado muito mais lindo. Que sorte!

Ao Willame Cavalcante, por todo o apoio, amizade e disposição a ajudar.

Ao Seu Cláudio, o porteiro mais atencioso, cuidadoso e fofo.

Ao Alisson, Bruna e Isabel, pelos melhores descontos, almoços e lanches.

Às auxiliares de limpeza, especialmente à Dona Helena, pelo carinho compartilhado nos corredores, pelos sorrisos e pela inspiração.

A todos que, mesmo aqui não citados, torceram, vibraram e ficaram felizes com as minhas conquistas. A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste sonho.

Todo o meu amor e gratidão.

“Eu sou de uma terra que o povo padece,
Mas não esmorece e procura vencer.
Da terra querida, que a linda cabocla
De riso na boca, zomba no sofrer
Não nego meu sangue, não nego meu nome
Olho para a fome, pergunto o que há?
Eu sou brasileiro, filho do Nordeste,
Sou cabra da peste, sou do Ceará.”

Patativa do Assaré

RESUMO

FREITAS, I. B. F. **Produção de hidrogênio e metabólitos com valor biotecnológico a partir do melaço da cana-de-açúcar utilizando reatores de leito granular expandido mesofílicos.** 2018. 115f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

A combinação do substrato orgânico e do reator anaeróbio é determinante na produção fermentativa de hidrogênio e de ácidos orgânicos com valor agregado. A utilização do melaço da cana-de-açúcar como substrato orgânico em reatores de leito granular expandido (EGSB) ainda não foi uma alternativa explorada para produção de hidrogênio. Dessa forma, este estudo teve como objetivo analisar a produção biológica de hidrogênio e ácidos orgânicos em três reatores EGSB independentes com concentração de carboidratos de 5 g L⁻¹ (EGSB-5), 10 g L⁻¹ (EGSB-10) e 15 g L⁻¹ (EGSB-15), utilizando melaço da cana-de-açúcar como substrato, sob condição mesofílica de temperatura (30 °C) e variação do tempo de detenção hidráulica (TDH) de 24 h até 1 h. No EGSB-5, o processo fermentativo não gerou hidrogênio. No entanto, houve produção de metabólitos com valor agregado, principalmente ácido acético, butírico e propiônico. Neste reator, o ácido acético proveniente da reação de homoacetogênese (23 – 51%) justificou a ausência de hidrogênio. No EGSB-10 a produção de hidrogênio ocorreu na última fase de operação (TDH 1 h), com produção volumétrica de hidrogênio (PVH) máxima de 4,56 L d⁻¹ L⁻¹ e rendimento de hidrogênio (HY) máximo de 0,14 mol H₂ mol hexose⁻¹. No EGSB-15, houve PVH no TDH de 2 h e de 1 h, com valor máximo de 13,92 L d⁻¹ L⁻¹ no TDH de 1 h, e HY máximo de 0,25 mol H₂ mol hexose⁻¹, também no TDH de 1 h. No EGSB-10 e no EGSB-15, as vias metabólicas responsáveis pela produção de hidrogênio foram semelhantes, associadas à elevação da produção de ácido butírico e ácido lático. O ácido lático foi utilizado como fonte de carbono alternativa em condições de pouca disponibilidade de substrato e de pressão parcial de hidrogênio elevada, o que justifica os valores reduzidos de HY. Os resultados obtidos evidenciaram que o melaço pode ser utilizado para produção de H₂ e de ácidos orgânicos em reatores EGSB por processos fermentativos.

Palavras-chave: Biocombustível. Biohidrogênio. Ácido lático. Homoacetogênese. Digestão anaeróbia.

ABSTRACT

FREITAS, I. B. F. **Production of hydrogen and metabolites with biotechnological value from sugarcane molasses in mesophilic expanded granular sludge bed.** 2018. 115f. Dissertation (Master's degree) – School of Engineering of São Carlos, University of São Paulo, São Carlos, 2018.

The combination of the organic substrate and the anaerobic reactor is determinant in fermentative hydrogen and organic acids production. The use of sugarcane molasses as an organic substrate in expanded granular sludge bed (EGSB) has not yet been explored for H₂ production. Thus the objective of this study was to analyze the biological H₂ and organic acids production in three independent EGSB reactors with a carbohydrate concentration of 5 g L⁻¹ (EGSB-5), 10 g L⁻¹ (EGSB-10) and 15 g L⁻¹ (EGSB-15), using sugarcane molasses as substrate, under mesophilic temperature (30 °C) and hydraulic retention time (HRT) variation of 24 h - 1 h. In EGSB-5, the fermentation process did not generate hydrogen. However, there was production of volatile fatty acids, mainly acetic, butyric and propionic acid. In this reactor, acetic acid from the homoacetogenesis reaction (23 - 51%) justified the absence of hydrogen. The EGSB-10 produced H₂ in the last phase of operation (HTR 1 h), with maximum hydrogen production rate (HPR) of 4.56 L d⁻¹ L⁻¹ and maximum hydrogen yield (HY) of 0.14 mol H₂ mol hexose⁻¹. In the EGSB-15, there was HPR in the HPR of 2 h and 1 h, with a maximum value of 13.92 L d⁻¹ L⁻¹ in the HRT of 1 h, and HY maximum of 0.25 mol H₂ mol hexose⁻¹, also in the HRT of 1 h. In the EGSB-10 and EGSB-15, the metabolic pathways responsible for hydrogen production were similar, associated with increased production of butyric acid and lactic acid. Lactic acid was used as an alternative carbon source under conditions of low substrate availability and high hydrogen partial pressure, which justifies the reduced HY values. The results showed that molasses can be used to produce H₂ and organic acids in EGSB reactors in anaerobic fermentation process.

Keywords: Biofuel. Biohydrogen. Lactic Acid. Homoacetogenesis. Anaerobic digestion.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma do processamento de cana-de-açúcar para produção de etanol, com destaque às etapas geradoras de melaço.	30
Figura 2 - Representação esquemática dos principais sítios da digestão anaeróbia (A: bactérias hidrolíticas; B: bactérias acidogênicas; C: bactérias homoacetogênicas; D1: metanogênicas acetoclásticas; D2: metanogênicas hidrogenotróficas).	33
Figura 3 - Rotas metabólicas da fermentação de carboidratos.	34
Figura 4 – Principais rotas metabólicas da produção de ácido láctico e hidrogênio.	37
Figura 5 - Identificação dos reatores por siglas.	51
Figura 6- Instalação experimental dos reatores EGSB.	52
Figura 7 - Grânulos utilizados como material suporte para adesão dos microrganismos.	53
Figura 8 - Grânulos triturados utilizados como inóculo.	54
Figura 9 - Esquematização do pré-tratamento térmico do material suporte (grânulos) e inóculo dos reatores.	54
Figura 10 - Representação esquemática da estratégia de operação dos reatores, incluindo as etapas de inoculação, operação em modo de recirculação e operação em modo contínuo.	57
Figura 11 - Boxplot das conversões de carboidratos no EGSB-5.	65
Figura 12 - Boxplot das conversões de carboidratos no EGSB-10.	66
Figura 13 - Boxplot das conversões de carboidratos no EGSB-15.	66
Figura 14 - Boxplot da PVH em relação ao TDH aplicado no EGSB-10.	72
Figura 15 - Boxplot da PVH em relação ao TDH aplicado no EGSB-15.	72
Figura 16 - Boxplot dos rendimentos de hidrogênio correspondente ao EGSB-15.	77
Figura 17 - Porcentagem molar dos principais metabólitos produzidos pelo EGSB-5 em cada fase operacional.	79
Figura 18 – Concentração dos principais ácidos orgânicos produzidos no EGSB-5 em função do TDH.	80
Figura 19 - Porcentagem molar dos principais metabólitos produzidos pelo EGSB-10 em cada fase operacional.	83
Figura 20 – Concentração dos principais ácidos orgânicos produzidos no EGSB-10 em função do TDH.	84
Figura 21 - Porcentagem molar dos principais metabólitos produzidos pelo EGSB-15 em cada fase operacional.	86

Figura 22 - Ácidos orgânicos produzidos no EGSB-15 em função do TDH.....	87
Figura 23 - Relação entre o rendimento de hidrogênio (HY) e rendimento de ácido lático (LaY) no EGSB-15.	89
Figura 24 - Boxplot das remoções de DQO no EGSB-5.	94
Figura 25 - Boxplot das remoções de DQO no EGSB-10.	94
Figura 26 - Boxplot das remoções de DQO no EGSB-15.	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores caloríficos de alguns combustíveis.	31
Tabela 2 - Composição do melaço relatado pela literatura atual.....	32
Tabela 3 – Principais ácidos orgânicos produzidos pela fermentação, razão estequiométrica entre o produto e o açúcar e o valor aproximado no mercado.....	38
Tabela 4 - Resumo da literatura para produção de hidrogênio a partir de melaço.	45
Tabela 5 - Resumo da literatura para produção de hidrogênio e ácidos orgânicos em reatores EGSB.....	49
Tabela 6 - Dimensões e volumes dos reatores EGSB	52
Tabela 7 - Caracterização físico-química do melaço da cana-de-açúcar.....	55
Tabela 8 – Composição do meio nutricional adicionado ao afluente dos reatores	56
Tabela 9 - Fases operacionais dos reatores EGSB	58
Tabela 10 - Condições do CG para determinação da composição do biogás.....	59
Tabela 11 - Programa de monitoramento dos reatores EGSB.....	60
Tabela 12 - Concentrações e conversões médias de carboidratos para o EGSB-5.....	64
Tabela 13 - Concentrações e conversões médias de carboidratos para o EGSB-10.....	64
Tabela 14 - Concentrações e conversões médias de carboidratos para o EGSB-15.....	65
Tabela 15 - Composição do biogás produzido pelo EGSB-5.....	68
Tabela 16 – Composição do biogás produzido pelo EGSB-10.	69
Tabela 17 – Composição do biogás produzido pelo EGSB-15.	69
Tabela 18 - Valores médios da PVH para as diferentes fases operacionais no EGSB-10.	71
Tabela 19 - Valores médios da PVH para as diferentes fases operacionais no EGSB-15.	71
Tabela 20 - Comparação da PVH em diferentes processos.....	75
Tabela 21 - Valores médios de rendimento de hidrogênio para o EGSB-10.	76
Tabela 22 - Valores médios de rendimento de hidrogênio para o EGSB-15.	76
Tabela 23 - Quantificação do ácido acético proveniente da homoacetogênese em cada fase operacional do EGSB-5.....	81
Tabela 24 – Concentração (g L^{-1}) e fração molar (%) dos metabólitos produzidos pelo EGSB-5 em função da TCO.....	82
Tabela 25 - Concentração (g L^{-1}) e fração molar (%) dos metabólitos produzidos pelo EGSB-10 em função da TCO.....	85

Tabela 26 - Concentração (g L^{-1}) e fração molar (%) dos metabólitos produzidos pelo EGSB-15 em função da TCO.	91
Tabela 27 - Concentrações afluyente, efluente e remoção de DQO no EGSB-5.....	92
Tabela 28 - Concentrações afluyente, efluente e remoção de DQO no EGSB-10.....	93
Tabela 29 - Concentrações afluyente, efluente e remoção de DQO no EGSB-15.....	93
Tabela 30 - Somatório da DQO equivalente dos metabólitos solúveis, do carboidrato remanescente e dos sólidos suspensos voláteis (SSV) menos a DQO medida para o EGSB-5.	96
Tabela 31 - Somatório da DQO equivalente dos metabólitos solúveis, do carboidrato remanescente e dos sólidos suspensos voláteis (SSV) menos a DQO medida para o EGSB-10.	97
Tabela 32 - Somatório da DQO equivalente dos metabólitos solúveis, do carboidrato remanescente e dos sólidos suspensos voláteis (SSV) menos a DQO medida para o EGSB-15.	98
Tabela 33 - Valores médios de pH afluyente e efluente para o EGSB-5.....	99
Tabela 34 - Valores médios de pH afluyente e efluente para o EGSB-10.....	99
Tabela 35 - Valores médios de pH afluyente e efluente para o EGSB-15.....	100
Tabela 36 - Valores médios de SST, SSF e SSV no efluente do EGSB-5.....	101
Tabela 37 - Valores médios de SST, SSF e SSV no efluente do EGSB-10.....	102
Tabela 38 - Valores médios de SST, SSF e SSV no efluente do EGSB-15.....	102

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

ABR: *Anaerobic Baffled Reactor* (Reator Anaeróbio Compartimentado)

Carb_{afu}: Carboidrato afluente

C_{eflu}: Carboidrato efluente

CH₂: Concentração de H₂ no biogás

CO₂: Dióxido de Carbono

CONAB: Companhia Nacional de Abastecimento

CSTR: *Continuous Stirred Tank Reactor* (Reator Tanque Agitado Contínuo)

DQO: Demanda Química de Oxigênio

DQO_{afu}: DQO afluente

DQO_{eflu}: DQO efluente

EGSB: *Expanded Granular Sludge Bed* (Reator de Leito Granular Expandido)

EtOH: Etanol

H₂: Hidrogênio

HAc: Ácido Acético

HBu: Ácido Butírico

HCa: Ácido Capróico

HIsoBu: Ácido Isobutírico

HIsoVa: Ácido Isovalérico

HLa: Ácido Lático

HPr: Ácido Propiônico

HVa: Ácido Valérico

HY: *Hydrogen yield* (Rendimento de Hidrogênio)

LaY: *Lactic yield* (Rendimento de ácido lático)

NaOH: Hidróxido de sódio

NAD⁺ - nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada

NADH – nicotinamida adenina dinucleotído reduzida

OECD: *Organisation for Economic Co-operation and Development* (Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico)

PVH: Produção Volumétrica de Hidrogênio em $\text{L d}^{-1} \text{L}^{-1}$

PVH': Produção Volumétrica de Hidrogênio em $\text{mmol h}^{-1} \text{L}^{-1}$

RALF: Reator Anaeróbio de Leito Fluidificado

EGSB-5: EGSB acidogênico mesofílico com concentração de carboidratos de $5,0 \text{ g L}^{-1}$

EGSB-10: EGSB acidogênico mesofílico com concentração de carboidratos de $10,0 \text{ g L}^{-1}$

EGSB-15: EGSB acidogênico mesofílico com concentração de carboidratos de $15,0 \text{ g L}^{-1}$

SSF: Sólidos Suspensos Fixos

SST: Sólidos Suspensos Totais

SSV: Sólidos Suspensos Voláteis

TCO: Taxa de Carregamento Orgânico

TDH: Tempo de Detenção Hidráulica

TRC: Tempo de Retenção Celular

UASB: *Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor* (Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente e Manta de Lodo)

1,3-propanodiol - 1,3-PDO

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	OBJETIVOS.....	27
2.1	OBJETIVO GERAL	27
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	28
3.1	INDÚSTRIA SUCROALCOOLEIRA NO BRASIL E ALTERNATIVAS PARA SUA DIVERSIFICAÇÃO.....	28
3.1.1	Melaço da cana-de-açúcar: Características gerais	31
3.2	FUNDAMENTOS DA DIGESTÃO ANAERÓBIA PARA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO E ÁCIDOS ORGÂNICOS COM VALOR AGREGADO	32
3.3	PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO A PARTIR DO MELAÇO	38
3.4	PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO E ÁCIDOS ORGÂNICOS EM REATOR DE LEITO GRANULAR EXPANDIDO	46
3.5	CONSIDERAÇÕES PRELIMINARES	50
4	MATERIAL E MÉTODOS	51
4.1	UNIDADE EXPERIMENTAL.....	51
4.2	MATERIAL SUPORTE E INÓCULO.....	53
4.3	SUBSTRATO	54
4.4	MEIO NUTRICIONAL	55
4.5	PROCEDIMENTO DE PARTIDA DOS REATORES	56
4.6	CONDIÇÕES OPERACIONAIS	58
4.7	MÉTODOS ANALÍTICOS	59
4.7.1	Determinação da concentração de carboidratos.....	59
4.7.2	Análises físico-químicas.....	59
4.7.3	Determinação da produção e composição do biogás	59
4.7.4	Análise de ácidos orgânicos voláteis e álcoois.....	60
4.8	FREQUÊNCIA DE ANÁLISES.....	60
4.9	CÁLCULOS UTILIZADOS NA AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DOS REATORES	61
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	63
5.1	CONSUMO DE CARBOIDRATOS	63

5.2	COMPOSIÇÃO DO BIOGÁS	68
5.3	PRODUTIVIDADE VOLUMÉTRICA DE HIDROGÊNIO	70
5.4	RENDIMENTO DE HIDROGÊNIO	75
5.5	PRODUÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS	78
5.5.1	EGSB-5	79
5.5.2	EGSB-10	83
5.5.3	EGSB-15	86
5.6	PARÂMETROS DE CONTROLE DOS SISTEMAS ACIDOGÊNICOS	92
5.6.1	Remoção de DQO	92
5.6.2	Influência do pH	99
5.6.3	Sólidos suspensos	101
6	CONCLUSÕES	103
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	104
	REFERÊNCIAS.....	105

1 INTRODUÇÃO

O ideal de uma sociedade sustentável está associado intrinsecamente à redução da dependência de combustíveis fósseis e à diminuição da poluição. A utilização de águas residuárias e subprodutos agroindustriais em processos fermentativos permite que esses dois objetivos sejam abordados simultaneamente. Atualmente, existem diversas estratégias de caráter biológico que são capazes de produzir bioenergia e/ou bioquímicos a partir de substratos orgânicos, como a digestão anaeróbia metanogênica, células de combustível microbianas, fermentação para obtenção de produtos com valor agregado e bioprodução de hidrogênio.

Dentre os vários combustíveis alternativos que podem ser utilizados em substituição aos combustíveis fósseis, o hidrogênio é uma possibilidade promissora, considerada sustentável, renovável e ecologicamente correta. Além disso, o gás hidrogênio possui poder calorífico elevado (122 kJ g^{-1} , 2,75 vezes maior que o da gasolina) (ROBLEDO-NARVÁEZ et al., 2013) e não produz substâncias poluidoras em seu processo de combustão (REN et al., 2010).

A produção de hidrogênio pode ser realizada por meio de processos foto-autotróficos e quimiotróficos. Os processos quimiotróficos, como a digestão anaeróbia, podem ser implementados a temperatura e pressão ambientes, não são interrompidos com a ausência de luz e, por isso, tornam-se mais vantajosos em relação aos foto-autotróficos. Além disso, concomitantemente à produção de hidrogênio por processos fermentativos, podem ser obtidos produtos químicos com valor agregado, como ácido acético, butírico, propiônico e lático, a partir de uma variedade de substratos orgânicos complexos (YUN; CHO, 2016).

O melaço da cana-de-açúcar oriundo do processo de cristalização do açúcar e composto principalmente por açúcares, pode ser utilizado como substrato nos processos fermentativos para produção de hidrogênio. Isso possibilita agregação de valor ao melaço da cana-de-açúcar, além de ter como principal viés ambiental a produção de hidrogênio por fontes renováveis. Dessa forma, a indústria sucroalcooleira poderia introduzir uma nova plataforma, a de obtenção de hidrogênio, à sua cadeia produtiva, sem eliminar as linhas de produção de etanol e açúcar, gerando mais um produto com valor econômico.

Para isso, a digestão anaeróbia do melaço da cana-de-açúcar passa a depender da viabilidade do processo, que está diretamente atrelada ao desenvolvimento de reatores e microrganismos que obtenham rendimento e produtividade elevada. Na literatura, são estudadas diversas configurações de reatores aplicados para produção biológica de hidrogênio a partir do melaço, subdivididos entre sistemas de crescimento celular suspenso, como o reator tanque agitado contínuo (CSTR) (HAN et al., 2012a; LI et al., 2013; WANG et al., 2013); e

sistemas de crescimento celular imobilizado, como o reator anaeróbio de leito fluidificado (RALF) (REGO, 2016; FERREIRA, 2016) e o reator anaeróbio de leito granular expandido (EGSB) (GUO et al., 2008).

As configurações de reatores com biomassa imobilizada permitem desvincular o tempo de retenção celular (TRC) e o tempo de detenção hidráulica (TDH), aumentando a transferência de calor e de massa entre os microrganismos e o substrato, além de eliminar uma possível lavagem da biomassa do sistema. Outras vantagens operacionais dos reatores com crescimento celular imobilizado são a capacidade elevada de aderência da biomassa ao material suporte, possibilidade de aplicação de altas taxas de carregamento orgânico (TCO) e TDHs baixos (ZHANG et al., 2007).

Dentre os reatores com crescimento imobilizado, o EGSB ainda não foi explorado com o objetivo de produção de hidrogênio a partir do melaço da cana-de-açúcar. Apenas o trabalho de Guo et al. (2008) foi desenvolvido com a finalidade de produção de hidrogênio utilizando, no entanto, o melaço da beterrada como substrato orgânico. Desta forma, o presente trabalho teve como proposta principal investigar a bioprodução de hidrogênio e metabólitos de valor agregado a partir uma fonte de carbono alternativa, o melaço da cana-de-açúcar, em três reatores EGSB operados com concentrações de substrato distintas (5, 10 e 15 g L⁻¹) e variação do TDH (24 h a 1 h).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a produção biológica de hidrogênio e ácidos orgânicos em três reatores EGSB independentes, sob condição mesofílica de temperatura (30 °C), utilizando melaço da cana-de-açúcar como substrato orgânico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i. Verificar a influência da redução do TDH (24 h a 1 h) na produção biológica de hidrogênio e ácidos orgânicos em três reatores EGSB, operados com concentrações de substrato fixas de 5, 10 e 15 g L⁻¹;
- ii. Analisar qualitativa e quantitativamente a distribuição dos ácidos orgânicos produzidos em função da diminuição do TDH.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Este capítulo descreve informações disponíveis na literatura de referência acerca de temas pertinentes aos objetivos propostos para este trabalho, os quais servirão de base para contextualização da pesquisa e discussão dos principais resultados obtidos. Os temas julgados relevantes incluem:

- i. Aspectos gerais sobre a indústria da cana-de-açúcar no Brasil e seu potencial fornecimento de substratos orgânicos, destacando o melaço, para produção de bioenergia e ampliação da cadeia produtiva sucroalcooleira da cana-de-açúcar;
- ii. Fundamentos da digestão anaeróbia com base na produção de hidrogênio e ácidos orgânicos de valor agregado;
- iii. Alternativas tecnológicas tendo em vista o aproveitamento de subprodutos para geração de energia e produtos com valor biotecnológico.

3.1 INDÚSTRIA SUCROALCOOLEIRA NO BRASIL E ALTERNATIVAS PARA SUA DIVERSIFICAÇÃO

A indústria do etanol no Brasil foi consolidada a partir da implantação do Programa Nacional do Alcool (PRO-ÁLCOOL), a fim de reduzir a dependência da importação de petróleo frente à crise energética na década de 1970. O etanol é um biocombustível automotivo que possui, como principal vantagem em relação aos combustíveis derivados do petróleo, o elevado teor de oxigênio, aproximadamente 35 % em massa. Isso possibilita uma combustão mais limpa e desempenho melhor de motores, reduzindo emissões de poluentes até mesmo quando misturado à gasolina. Além disso, o etanol pode ser originado a partir de uma variedade de matérias-primas, de modo que, no Brasil, a cana-de-açúcar é a mais utilizada nas destilarias.

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, gerando, juntamente com os Estados Unidos da América (EUA), 80% da produção mundial total de etanol (OECD-FAO, 2018). No Brasil, o etanol é obtido da cana-de-açúcar, enquanto que os EUA utilizam amido de milho como matriz orgânica. De acordo com levantamento realizado pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), a produção de cana-de-açúcar no Brasil estimada para a safra de 2017/2018 é de 635,6 milhões de toneladas, com redução de 3,3% em relação à safra anterior, e a área a ser colhida foi avaliada em 8,76 milhões de hectares, 3,4% a menos que a safra anterior (CONAB, 2017). A produção de etanol para esse mesmo período deverá se manter

acima de 27 bilhões de litros, enquanto que a produção de açúcar deve atingir 39,46 milhões de toneladas (CONAB, 2017).

Nas rotas de processamento da cana-de-açúcar para produção de etanol são gerados bagaço de cana, levedura seca, vinhaça e melaço. Esses subprodutos possuem baixo valor de mercado, podendo ser reaproveitados em processos anaeróbios devido ao seu elevado teor de carbono orgânico para produção de bioenergia e de ácidos orgânicos de alto valor agregado. Nas últimas décadas, as destilarias evoluíram no sentido de obter maior utilização da cana. O bagaço e a palha são utilizados para geração de energia elétrica que, além de atender às demandas da destilaria, pode ser comercializada para a rede pública. O melaço pode ser utilizado na produção de etanol a partir de uma mistura de caldo e melaço, enquanto que a vinhaça, principal água residuária gerada pela produção de etanol, é utilizada para fertirrigação dos canaviais após a digestão anaeróbia da matéria orgânica.

Apesar da modernização do setor sucroalcooleiro, o etanol ainda é o produto responsável pela maior parte da receita. A maneira habitual de diversificação desta cadeia é a produção de açúcar e/ou etanol, de modo que as destilarias dependem de dois produtos apenas. Além disso, o gerenciamento dos subprodutos e águas residuárias do processo de produção do etanol é um fator relevante para que este biocombustível seja de fato considerado como “ambientalmente amigável”. Nesse contexto, surge o conceito de biorrefinarias, que buscam obter uma diversidade de produtos, incluindo a bioenergia, bioquímicos e biomateriais, a partir da biomassa vegetal. Esses produtos são obtidos a partir de processos biotecnológicos que dependem principalmente do metabolismo microbiano sendo, por vezes, instáveis e imprevisíveis, necessitando de variáveis de controle e estudos aprofundados sobre o tema.

A Figura 1 sintetiza as etapas de uma destilaria moderna de etanol, em que diferentes subprodutos e resíduos podem ser utilizados para geração de energia na forma de hidrogênio e para produção de ácidos orgânicos de alto valor agregado.

Figura 1 - Fluxograma do processamento de cana-de-açúcar para produção de etanol, com destaque às etapas geradoras de melaço.

Fonte: Adaptado de Paiva et al., (2009); Van Haandel et al., (2000).

O interesse na utilização energética do hidrogênio surge de dois fatores principais: o seu poder calorífico elevado (Tabela 1), que proporciona propriedades combustíveis ótimas, e a geração de somente água como “resíduo” da combustão. Apesar de apresentar características que potencializem o seu emprego como fonte de energia, o hidrogênio é obtido atualmente por métodos que utilizam combustíveis fósseis como matéria-prima (eletrólise da água, reforma a vapor do metano, gaseificação do carvão, etc) (KIRTAY, 2011), o que requer quantidades elevadas de energia, temperaturas altas, além de produzir resíduos que não são considerados “ambientalmente amigáveis” (KAPDAN et al., 2006).

Tabela 1 - Valores caloríficos de alguns combustíveis.

Combustível	H ₂	CH ₄	Gás natural	Gasolina	Diesel	Etanol	Metanol	Carvão	Madeira
Poder calorífico (MJ kg ⁻¹)	142	56	54	47	45	30	23	27	15

Fonte: Santos e Santos (2007); Lam e Lee (2011).

A produção de hidrogênio passa a depender, portanto, do desenvolvimento de processos de baixo custo e menos prejudiciais do ponto de vista ambiental. Neste contexto, a produção biológica de hidrogênio vem ganhando destaque nos últimos anos, podendo ocorrer por biofotólise direta e indireta, foto-fermentação e fermentação escura (DAS et al., 2001). Dos processos biológicos apresentados, a fermentação escura apresenta maiores vantagens, uma vez que independem da presença de energia luminosa, possui baixo custo de operação, simplicidade no controle, podendo ser realizada em condições de temperatura e pressão ambientes a partir de diversos substratos orgânicos. (MANISH et al., 2008).

3.1.1 Melaço da cana-de-açúcar: Características gerais

O melaço, também chamado de mel fino, é um subproduto resultante da etapa de cristalização do caldo para produção de açúcar. Esse subproduto possui em sua composição, principalmente, açúcares, como glicose e frutose (Tabela 2), possui valor de mercado menor do que a glicose e é gerado em grande quantidade pela indústria sucroalcooleira. Contém também teor elevado de nitrogênio orgânico, que surge a partir do processamento da cana-de-açúcar, não havendo necessidade de adição de fontes externas de nitrogênio orgânico, como extrato de levedura e peptona, nos processos de fermentação escura (BESHAY et al., 2005).

Geralmente, é utilizado para produção de etanol por meio da fermentação conjunta com o caldo (mosto) em períodos de entressafra em destilarias anexas às usinas. Além disso, o melaço também pode ser utilizado para alimentação animal, produção de fermento biológico ou em outros processos de fermentação para obtenção de produtos químicos e fármacos (BNDES e CGEE, 2008). De acordo com previsões disponibilizadas pela *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD-FAO), o melaço oriundo da produção de açúcar, no Brasil, alcançará uma produção aproximada de 13,719 mil toneladas para o ano de 2018 (OECD-FAO, 2018).

Tabela 2 - Composição do melaço relatado pela literatura atual

Componente	(%)
Açúcares totais	45,0 – 58,0
Matéria seca	78,0 – 85,0
COT ^a	28,0 – 34,0
Fe ₂ O ₃	0,001 - 0,020
MgO	0,01 - 0,10
P ₂ O ₅	0,02 - 0,07
Al ₂ O ₃	0,05 - 0,06
CaO	0,15 - 0,80
NKT ^b	0,2 - 2,8
Cinzas	4,0 - 8,0
K ₂ O	2,2 - 4,5
SiO ₂	0,1 - 0,5

^aCarbono orgânico total; ^bNitrogênio kjeldahl total.

Fonte: Ren et al. (2006); Han et al. (2012); Han et al. (2012b); Wang et al. (2013).

No que se refere a rendimentos industriais, para cada tonelada de cana-de-açúcar processada são gerados, aproximadamente, 86 litros de etanol (BNDES e CGEE, 2008) e 40 a 60 kg de melaço (PIACENTE, 2005). Já quando a finalidade é a produção direta do açúcar, são originados 100 kg de açúcar e 20 L de etanol por meio da fermentação do melaço não esgotado, ou seja, ainda rico em sacarose (BNDES e CGEE, 2008). De maneira geral, as possibilidades entre a produção de açúcar e etanol corroboram para a redução de custos e para a melhoria da eficiência da agroindústria (BNDES e CGEE, 2008).

Diante das características apresentadas de produção em volumes elevados, a presença de açúcares fermentescíveis (ENSINAS et al., 2009) e o custo baixo, o melaço da cana-de-açúcar pode ser considerado um subproduto potencial para aplicação em processos de fermentativos.

3.2 FUNDAMENTOS DA DIGESTÃO ANAERÓBIA PARA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO E ÁCIDOS ORGÂNICOS COM VALOR AGREGADO

A digestão anaeróbia é um bioprocessamento natural que envolve a degradação de um material orgânico na ausência de oxigênio livre, obtendo-se como subprodutos gasosos, principalmente, metano (CH₄) e gás carbônico (CO₂). Esse bioprocessamento tem como vantagens principais o baixo

gasto energético e o baixo custo de operação, com potencial utilização em escala industrial não somente para o tratamento de águas residuárias, mas também para obtenção de produtos economicamente relevantes a partir de fontes e processos menos danosos ao meio ambiente.

De maneira geral, o processo de digestão anaeróbia ocorre em quatro etapas principais (Figura 2): hidrólise de polímeros orgânicos em moléculas menores denominadas monômeros e dímeros, capazes de serem absorvidos pelas células microbianas; fermentação primária, em que ocorrem os processos de acidogênese e acetogênese e resultam na produção de ácidos graxos voláteis de cadeia curta, álcoois, CO_2 e H_2 ; e fermentação secundária ou metanogênese, em que os produtos da fermentação primária são convertidos em CH_4 ou produtos líquidos, como ácidos graxos de cadeia carboxílica média.

A metanogênese ocorre ainda por duas rotas, a hidrogenotrófica, que consiste na transformação de CO_2 e H_2 em CH_4 (30% do metano produzido), e a acetoclástica, em que é utilizado acetato como substrato para formação de CH_4 (70% do metano produzido). Quando há presença de sulfato e nitrato no processo de digestão anaeróbia, o hidrogênio pode ser utilizado como doador de elétrons para formação de sulfeto, pelas bactérias redutoras de sulfato, e amônia, pelas bactérias redutoras de nitrato (VALDEZ-VAZQUEZ et al., 2005)

Figura 2 - Representação esquemática dos principais sítios da digestão anaeróbia (A: bactérias hidrolíticas; B: bactérias acidogênicas; C: bactérias homoacetogênicas; D1: metanogênicas acetoclásticas; D2: metanogênicas hidrogenotróficas).

Fonte: Adaptado de O'Flaherty, Collins e Mahony (2006)

A obtenção de hidrogênio como produto principal da digestão anaeróbia ocorre quando o processo é interrompido na fase acidogênica, uma vez que nas etapas seguintes (acetogênese e metanogênese) há consumo de H_2 devido à associação sintrófica obrigatória entre arqueias metanogênicas (hidrogenotróficas) e bactérias acetogênicas produtoras de H_2 . Esse desequilíbrio entre populações acetogênicas e metanogênicas nos processos de digestão anaeróbia ocorrem por meio da manipulação dos parâmetros operacionais, como pH, TDH, temperatura, material suporte, inóculo e configuração do reator (SHIDA, 2009). O controle das arqueias metanogênicas pode ocorrer em reatores de separação de fases ou por pré-tratamento do inóculo, permitindo a produção e recuperação do H_2 no biogás.

A produção de hidrogênio a partir de substratos ricos em carbono segue vias metabólicas, que, além de geração de bioenergia na forma de H_2 , podem ainda produzir uma variedade de ácidos orgânicos com alto valor agregado, tais quais ilustradas na Figura 3.

Figura 3 - Rotas metabólicas da fermentação de carboidratos.

NAD^+ : nicotinamida adenina dinucleotídeo (oxidado); $NADH$: nicotinamida adenina dinucleotídeo (reduzido); Fd: ferredoxina; CoA: coenzima A.

Fonte: Modificado de Ren et al. (1997).

Inicialmente, um carboidrato complexo é convertido em glicose, que é transformada em piruvato. Em seguida, o piruvato é oxidado a Acetyl-CoA, gerando hidrogênio molecular com auxílio da enzima hidrogenase (REN et al., 2002). Quando um mol de glicose gera um mol de

Piruvato, 2 mols de NAD^+ são utilizados, equilibrando os produtos médios do metabolismo $\text{NADH}^+ + \text{H}^+$ e NAD^+ na reação de oxidação-redução. Para que haja geração contínua de hidrogênio, NAD^+ deve ser regenerado via etanol-acetato ou via butirato-acetato, constituindo as principais vias fermentativas para produção de hidrogênio em cultura mista (GUO et al., 2008).

A formação de hidrogênio está intrinsecamente ligada aos metabólitos produzidos durante a fermentação, na forma de ácidos orgânicos e álcoois. O maior rendimento teórico de hidrogênio é observado quando há formação de ácido acético como ácido orgânico principal da fermentação, gerando 4 mols H_2 mol hexose⁻¹ (Equação 1).

Glicose $\rightarrow$ Ácido acético + Hidrogênio

No entanto, dentro de um sistema fermentativo, as bactérias acidogênicas podem desviar os fluxos metabólicos no sentido de produção de outros ácidos orgânicos, geralmente após algum distúrbio, como variação do pH ou pressão parcial de hidrogênio elevada. Isso ocorre para manutenção do equilíbrio bioquímico entre a célula e o meio, bem como para evitar o acúmulo de equivalentes redutores inibitórios. Quando há formação de ácido butírico, por exemplo, o rendimento de hidrogênio será de 2 mols H_2 mol hexose⁻¹ (Equação 2).

Glicose $\rightarrow$ Ácido butírico + Hidrogênio

A razão entre a concentração de ácido acético e ácido butírico produzidos pode demonstrar o favorecimento da produção de hidrogênio, de modo que quanto maior essa razão, maior o rendimento da produção de hidrogênio. Contudo, este parâmetro pode não ilustrar satisfatoriamente o rendimento de hidrogênio quando outras rotas fermentativas estão envolvidas no processo, como a produção de ácido propiônico (Equação 3) e, ainda, quando há produção de ácido acético proveniente da reação de homoacetogênese (Equação 4). Por exemplo, o excesso de ácido propiônico pode inibir a produção de hidrogênio, uma vez que há consumo de dois moles de hidrogênio para formação desse ácido

Glicose + Hidrogênio → Ácido propiônico

Homoacetogênese

O ácido láctico vem sendo relatado também como via metabólica para produção de hidrogênio (FUESS et al., 2018). Essa via constitui um fator ainda inconclusivo, podendo influenciar o processo tanto positivamente quanto negativamente (SIKORA et al., 2013). Os estudos de Matsumoto e Nishimura, 2007; Baghchehsaraee et al. 2009; Kim et al. 2012 indicaram que a produção de ácido láctico influencia positivamente o metabolismo bacteriano para a produção de hidrogênio. Em contrapartida, nos estudos de Gomes et al. 2016; Gomes et al. 2015 e Noike et al. 2002 a produção de hidrogênio foi desfavorecida em virtude da competição por substrato entre as bactérias produtoras de ácido láctico e as bactérias produtoras de hidrogênio, além de haver excreção de bacteriocinas pelos microrganismos produtores de ácido láctico.

De acordo com Masset et al. (2012), a formação de hidrogênio a partir do ácido láctico pode ocorrer a partir da conversão de ácido láctico a ácido propiônico e ácido acético (Equação 5), ou ainda a partir da combinação de ácido láctico e ácido acético (Equação 6).

Ácido láctico → Ácido propiônico + Ácido acético + Hidrogênio

Ácido láctico + Ácido acético → Ácido butírico + Hidrogênio

Na Figura 4 são representadas as rotas metabólicas simplificadas associadas à produção de ácido láctico e de hidrogênio. De acordo com Fuess et al. (2018), a formação de ácido láctico constitui uma via metabólica alternativa e termodinamicamente favorável que ocorre quando há pouca disponibilidade de carboidrato para obtenção de energia pelas bactérias fermentativas.

Figura 4 – Principais rotas metabólicas da produção de ácido láctico e hidrogênio

Fonte: Adaptado de Matsumoto et al. (2007) e Masset et al. (2012)

Além dos efeitos contraditórios no que diz respeito à produção de ácido láctico nos processos fermentativos para obtenção de hidrogênio, há também discordâncias em relação ao consumo de ácido acético pela reação de homoacetogênese. A presença de ácido acético no meio pode ser favorável quando utilizado para produção de hidrogênio (Equação 1), mas também pode ser desfavorável quando originado a partir da reação de homoacetogênese (Equação 4) (HAWKES et al., 2002). A homoacetogênese consiste na combinação do hidrogênio e dióxido de carbono presentes no meio para produção de ácido acético em condições anaeróbias (OH; VAN GINKEL; LOGAN, 2003).

Alguns autores concluíram que a homoacetogênese não interfere significativamente nos rendimentos de produção de hidrogênio (KRAEMER; BAGLEY, 2008; RYAN et al., 2008), enquanto que outros autores afirmam que a homoacetogênese interferiu negativamente nos processos fermentativos para produção de hidrogênio (OH; VAN GINKEL; LOGAN, 2003). As convergências entre as conclusões obtidas pelos autores podem ser justificadas pelas diferentes condições operacionais de cada pesquisa e, ainda, pela natureza do substrato aplicado (SAADY, 2013).

Os metabólitos produzidos durante a fermentação, apesar de influenciarem o rendimento de hidrogênio obtido, são importantes para diversos tipos de indústrias e possuem alto valor agregado. O ácido láctico, por exemplo, constitui um *commodity* químico e é absorvido principalmente pela indústria de alimentos, como agente antimicrobiano, adjuvante de sabor, solvente, estabilizador, umectante, emulsificador, plasticizante; e na indústria química é empregado como matéria-prima para produção de plásticos biodegradáveis (MARTINEZ et al., 2013). Tem aplicações, ainda, nas indústrias farmacêutica, cosmética, têxtil e de couro (SINGHVI et al., 2010).

O ácido acético é amplamente utilizado na síntese farmacêutica, no curtimento e tingimento do couro. Já o ácido propiônico pode ser aproveitado na manufatura de herbicidas e intermediários químicos e indústria alimentícia (ZHOU et al., 2018).

Apresenta-se na Tabela 3 o valor de mercado aproximado dos principais ácidos obtidos na fermentação acidogênica. Para fins de comparação, os valores respectivos ao etanol também foram adicionados.

Tabela 3 – Principais ácidos orgânicos produzidos pela fermentação, razão estequiométrica entre o produto e o açúcar e o valor aproximado no mercado.

Ácido	Fórmula	Produção (t/t _{açúcar})	Preço (US\$/t _{açúcar})
Acético	C ₂ H ₄ O ₂	1,000	600
Butírico	C ₂ H ₆ O ₃	0,587	411
Propiônico	C ₃ H ₅ O ₂	0,704	845
Lático	C ₃ H ₆ O ₃	1,000	1900
Caproico	C ₆ H ₁₀ O ₂	0,483	966
Etanol	C ₂ H ₅ OH	0,511	357

Fonte: Elaborado pela autora (2018)

3.3 PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO A PARTIR DO MELAÇO

Os principais estudos desenvolvidos para produção de hidrogênio utilizam efluentes sintéticos ricos em carboidratos como substrato (sacarose e glicose). A partir de resultados com efluentes mais simples e relativamente fáceis de serem consumidos pelos microrganismos, a literatura passou a apresentar trabalhos que avaliam as melhores condições operacionais em reatores que utilizam águas residuárias ou subprodutos complexos como fonte de carbono, principalmente, o soro de leite, melaço da beterraba, efluentes de indústria de alimentos e de bebidas e manipueira. Embora o número de estudos utilizando fontes complexas de carbono

como substrato tenha crescido nos últimos anos, a literatura científica ainda pode ser considerada deficiente no que diz respeito à utilização de melaço da cana-de-açúcar.

Ren et al. (1997) realizaram experimento em CSTR inoculado com cultura de lodos ativados, utilizando como substrato água residuária composta por melaço de beterraba (4,2 a 29,7 gDQO L⁻¹ e relação DQO:N:P de 800:5:1), coletado em uma indústria produtora de açúcar a partir da beterraba. O sistema foi operado com TDH de 4,6 h a 3,6 h, TCO de 19,4 e 107, 0 kgDQO m⁻³ d⁻¹, em temperatura de 30 °C e pH entre 4,3 e 4,9. O biogás foi composto por H₂ e CO₂, enquanto que uma fermentação especial de tipo etanol foi mantida em reator acidogênico. A maior parte dos metabólitos produzidos foram etanol (50%) e acetato (35%), confirmando a hipótese proposta inicialmente de que a rota fermentativa etanólica pode ser a principal responsável pela bioprodução de hidrogênio.

Ren et al. (2006) operaram um reator de lodo ativado floculado (HBR) em escala piloto inoculado com lodo de estação de tratamento de esgoto. Foi verificado o efeito do TDH (10,57 h a 3,9 h) e da TCO (3,11 - 85,6 kgDQO m⁻³ d⁻¹) na produção de hidrogênio a partir de melaço de beterraba (3 gDQO L⁻¹ e DQO:N:P de 200-300:5:1). A temperatura de operação foi de 35 °C e pH de 4,5. Os principais metabólitos produzidos foram etanol (60%), acetato (35%) e butirato (2,5%). A concentração de hidrogênio máxima no biogás foi de 52% e produção volumétrica de hidrogênio (PVH) máxima de 5,57 L d⁻¹ L⁻¹ e rendimento de hidrogênio (HY) máximo de 26,13 molH₂ kgDQO_{removida}⁻¹ em TCO de 68,21 kgDQO m⁻³ d⁻¹. Foi verificado diminuição do rendimento de H₂ em TCOs maiores que 68,21 kgDQO m⁻³ d⁻¹.

Li et al. (2007) utilizaram reator anaeróbio compartimentado (ABR) inoculado com lodo aeróbio de uma estação de tratamento (ETE) e alimentado com melaço oriundo da produção de açúcar a partir da beterraba (5 gDQO L⁻¹ e DQO:N:P de 300-500:5:1). A operação se deu em TDH de 13,5 h, TCO de 8,89 kg m⁻³ d⁻¹, temperatura de 35 °C e pH entre 4,3 e 4,4. A concentração máxima de hidrogênio obtida no biogás foi de 54%, com HY máximo de 1,04 mol H₂ mol hexose⁻¹ e PVH máxima de 4,33 L d⁻¹ L⁻¹. Os metabólitos predominantes foram etanol (35,3 %), ácido acético (34,4) e ácido propiônico (19,5) e ácido butírico (8,5). Os autores concluíram que a configuração do compartimento individual no sistema ABR forneceu um ambiente favorável para diferentes tipos de bactérias anaeróbicas, demonstrando resultados melhores que o CSTR em termos de estabilidade de operação e atividade microbiana.

Wang e Jin (2009) realizaram experimento em bateladas utilizando melaço de beterraba como substrato. Foi avaliado o efeito da concentração do substrato (2 a 120 g L⁻¹), nitrogênio (0 a 1,5 g L⁻¹, temperatura (30 - 45 °C), pH (5,5 a 7,5) e concentração inicial microbiana a partir da introdução de *Clostridium butyricum* W5 (3,0 × 10⁴ - 1,2 × 10⁵ células ml⁻¹). A PVH

máxima foi de $10,11 \text{ L d}^{-1} \text{ L}^{-1}$, e o melhor HY teve pico de $1,85 \text{ molH}_2 \text{ molhexose}^{-1}$, em condições de concentração de melaço de 100 g L^{-1} , temperatura de $39 \text{ }^\circ\text{C}$ e pH a 6,5. A distribuição dos metabólitos foi de ácido butírico (68%), ácido láctico (17%) e ácido acético (15%). Ao final dos experimentos concluíram que a produção de hidrogênio pela *Clostridium butyricum* W5 é influenciada pela concentração do substrato aplicado, enquanto que a complementação com nitrogênio inorgânico não apresenta grandes vantagens. O pH e a temperatura são fatores relevantes a serem considerados na otimização do processo.

Ren et al. (2010) analisaram a produção de H_2 em dois reatores CSTR, um com biomassa suspensa e outro com biomassa imobilizada, inoculados com lodo de ETE. Carvão ativado granular foi utilizado como material suporte para adesão da biomassa. O substrato utilizado foi melaço de beterraba de uma refinaria de açúcar, com concentração variando de 2,0 a $10,0 \text{ gDQO L}^{-1}$. As condições de operação foram: TDH de 6 h, TCO de 8 - $40 \text{ gDQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, temperatura de $35 \text{ }^\circ\text{C}$, e pH 4,5-4,8 e 3,8-4,4, para o reator de lodo suspenso e fixo, respectivamente. O reator de biomassa imobilizada obteve melhores resultados, com PVH de $9,72 \text{ L d}^{-1} \text{ L}^{-1}$ em TCO de $40 \text{ gDQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. A maior parte dos metabólitos foi composta por etanol e acetato (80-85%) em ambos os reatores. Para o sistema com crescimento imobilizado, a composição dos metabólitos foi semelhante para todos os pHs e TCOs testados, caracterizando-o como menos sensível à mudança desses parâmetros, e eficiente no que diz respeito à produção de hidrogênio e utilização do substrato.

Han et al. (2011) analisaram o efeito da TCO para produção de H_2 e etanol em reator CSTR inoculado com lodo anaeróbico de ETE e pré-tratado por método de aeração. Água residuária a base de melaço de beterraba ($2,0$ a $8,0 \text{ gDQO L}^{-1}$ e DQO:N:P de 1002:5:1) foi utilizada como fonte de carbono. A operação ocorreu em TDH fixo de 6 h, TCO de 8 a $32 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, temperatura de $35 \text{ }^\circ\text{C}$, e pH em torno de 4,0. A PVH máxima foi de $7,21 \text{ L d}^{-1} \text{ L}^{-1}$, e a taxa máxima de produção de etanol foi de $20,27 \text{ mmol h}^{-1}$, ambos os resultados em TCO de $24 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. A taxa de produção de H_2 e etanol em CSTR aumentou inicialmente com o aumento de TCO (de 8 a $24 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$), tendendo a diminuir com o aumento da TCO para $32 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. Os principais metabólitos solúveis produzidos foram etanol (31 a 59% dos metabólitos totais) ácido acético (23 a 33% dos metabólitos totais) e ácido butírico (11 a 20% dos metabólitos totais).

Chang et al. (2011) estudaram o efeito da TCO na produção de H_2 em reator de contato anaeróbico (ABR), que compreende um reator CSTR com defletores para dissociação do TRC e TDH. O reator foi inoculado com lodo de ETE e alimentado com água residuária contendo melaço de beterraba ($5,0$ a $11,0 \text{ gDQO L}^{-1}$ e DQO:N:P de 300-500:5:1). A operação se deu em

TDH de 6 h, TCO de 20 a 44 kg m⁻³ d⁻¹, temperatura de 35 °C e pH de 4,7. A máxima concentração de H₂ no biogás foi de 44% em TCO de 28 kg m⁻³ d⁻¹, a PVH máxima foi de 3,51 L d⁻¹ L⁻¹, obtida com TCO de 44 kg m⁻³ d⁻¹ e o HY máximo de 1,4 mol H₂ mol hexose⁻¹. O etanol e o acetato foram os produtos dissolvidos predominantes, representando 80,7% dos produtos solúveis totais. Este estudo sugeriu que o reator de contato anaeróbio pode ser um bioprocessamento promissor para a produção de hidrogênio fermentativo.

Cappelletti et al. (2012) realizaram experimento em batelada com objetivo de avaliar a produção de H₂ a partir de soro de glicose, melão de beterraba e queijo utilizando bactérias hipertermofílicas (*T. neapolitana*, *T. marítima*, *T. naphthophila*, *T. petrophila*). Suportes comerciais cerâmicos e vidro sinterizado foram utilizados para imobilização da biomassa. A operação se deu em temperatura de 77 °C e pH inicial de 8,5. Todas as cepas de *Thermotoga* testadas foram capazes de produzir H₂ a partir de soro de glicose, melão e queijo sob condições de células suspensas e anexadas. *T. neapolitana* foi a que obteve melhor desempenho com os três substratos avaliados. A melhor taxa de produção de H₂ foi maior no melão (0,99 L d⁻¹ L⁻¹) do que no soro de queijo (0,54 L d⁻¹ L⁻¹), enquanto os maiores rendimentos de H₂/substrato foram semelhantes para os dois substratos (2,95 mol H₂ mol hexose⁻¹ em melão e 2,50 mol H₂ mol hexose⁻¹ em soro de queijo).

Mariakakis et al. (2012) operaram um CSTR com recirculação, inoculado com lodo de ETE pré-tratado termicamente. Melão de beterraba foi utilizado como fonte de carbono na concentração de 63,0 a 101,0 g DQO L⁻¹. O sistema foi operado com TCO de 11,6 a 69,6 kg m⁻³ d⁻¹, TDH de 96 a 8 h, temperatura de 37°C e pH em torno de 5,0. A máxima produção volumétrica de H₂ foi de 2,42 L h⁻¹, obtida com TCO de 36,1 kg m⁻³ d⁻¹ e TDH de 12 h, enquanto que o máximo HY (1,53 mol H₂ mol hexose⁻¹) foi obtido em TCO 11,6 kg m⁻³ d⁻¹ e TDH de 96h. A máxima concentração de H₂ no biogás foi 35%. Houve predominância da rota butírica, com 92,66% dos metabólitos totais composto por ácido butírico e ácido acético.

Han et al. (2012a) avaliaram a possibilidade de usar carvão ativado como material suporte em reator CSTR, inoculado com lodo de uma ETE, pré-tratado por aeração. A água residuária a base de melão de beterraba utilizada como fonte de carbono tinha 10,0 gDQO L⁻¹ e relação DQO:N:P de 1000:5:1. As condições de operação foram: TCO de 8 a 24 kg m⁻³ d⁻¹, TDH de 6 h, temperatura de 36 °C e pH de 4,28. A PVH máxima foi de 1,13 L d⁻¹ L⁻¹ em TCO de 24 kg m⁻³ d⁻¹. Os metabólitos produzidos foram: etanol (48,2%), ácido acético (39,5%), ácido butírico (10%), ácido propiônico (1%). Este estudo demonstrou que a utilização do carbono ativado granular é um método de imobilização de células viável para o aprisionamento de lodo ativado para a produção de hidrogênio fermentativo a partir do melão.

Han et al. (2012b) operaram um reator de mistura completa de leito imobilizado (CMISR), inoculado com lodo de ETE e carvão vegetal como meio suporte. Água residuária à base de melaço de beterraba foi utilizada como substrato (2.000 e $6.000 \text{ mgDQO L}^{-1}$) com relação DQO:N:P de $1000:5:1$. A operação ocorreu com TCO de 8 a $32 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, TDH de 6 h, temperatura de 35°C e pH de $3,4$ a $4,4$. A máxima PVH foi de $7,27 \text{ L h}^{-1} \text{ L}^{-1}$ obtida com a máxima TCO testada ($32 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$). Porém, o máximo HY ($0,68 \text{ mol H}_2 \text{ mol hexose}^{-1}$) foi descrito em $16 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. A taxa de produção de H_2 aumentou com o incremento da TCO, porém, o rendimento de H_2 por substrato consumido (DQO), diminuiu quando TCO ultrapassou $16 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. Os principais metabólitos observados foram etanol e acetato, correspondendo a $89,3\%$ dos metabólitos totais.

Li et al. (2013) avaliaram a produção de H_2 sob efeito da taxa de carregamento de lodo (TCL) para estabelecimento da fermentação etanólica em CSTR, utilizando melaço de beterraba ($2,0 \text{ gDQOL}^{-1}$ e DQO:N:P de $200:5:1$). O inóculo utilizado foi proveniente de lodo de cervejaria. O sistema foi operado com três concentrações de inóculo ($4,09$; $8,01$ e $9,52 \text{ gMLVSS.L}^{-1}$), TCO de $6 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, TDH de 8 h, temperatura de 35°C e pH de $4,57$. A TCL de $1,47 \text{ kgDQO kgMLSVV}^{-1} \text{ d}^{-1}$ obteve a concentração máxima de H_2 no biogás ($55,91\%$), bem como PVH máxima de $0,5 \text{ L d}^{-1} \text{ L}^{-1}$). Observou-se que as alterações da TCL afetaram o processo de formação da fermentação do tipo etanol no CSTR e uma TCL mais baixa foi mais favorável à aclimatização de lodo ativado. Concluíram também que a fermentação do tipo etanol poderia ser estabelecida em uma faixa maior de pH ($4,0$ - $5,3$) em comparação com o relatado em outros trabalhos (Ren et al., 1997; Li et al., 2007).

Zhu et al. (2013) operaram CSTR inoculado com lodo aeróbio de cervejaria, utilizando como substrato orgânico água residuária composta por melaço oriundo de indústria produtora de açúcar a partir da beterraba ($4,0 \text{ gDQO L}^{-1}$ e relação DQO:N:P de $100:10:1$). O sistema foi operado com TCO de 12 e $18 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, TDH de 8 h, temperatura de 35°C e pH entre $4,1$ e $4,5$. A máxima concentração de H_2 no biogás foi de $50,4\%$, e máxima conversão de DQO 45% . A produção volumétrica máxima de hidrogênio ficou entre de $8,0$ – $10,0 \text{ L d}^{-1}$, e a PVH máxima foi de $1,12 \text{ L d}^{-1} \text{ L}^{-1}$. A rota fermentativa predominante foi etanólica, em que 77% dos metabólitos foi composta por etanol e acetato.

Wang et al. (2013) verificaram a influência do TDH na produção de H_2 em reator CSTR, o qual foi inoculado com lodo de ETE, pré-tratado pelo método de aeração, utilizando melaço de beterraba ($8,0 \text{ GdQO L}^{-1}$ e DQO:N:P de $1000:5:1$) como substrato. A operação se deu em TCO de 30 a $48 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, TDH de 10 a 4 h, temperatura de 35°C e pH em torno de $4,3$. A máxima PVH foi de $0,29 \text{ L d}^{-1} \text{ L}^{-1}$ em TDH de 5 h, e a concentração máxima de H_2 no biogás

foi de 62% em TDH de 6h. A concentração de etanol teve concentração máxima ($5,1 \text{ L d}^{-1} \text{ L}^{-1}$) também em TDH de 5h. O etanol e o acetato representaram 73,3% dos metabólitos solúveis totais. A regressão linear mostrou que a taxa de produção de hidrogênio e etanol foi proporcionalmente correlacionada em todos os TDH, ou seja, é considerável que a recuperação de hidrogênio e etanol do processo de fermentação pode melhorar a taxa de produção de energia.

Abd-Alla et al. (2014) tiveram como objetivo maximizar a produção de biocombustíveis de baixo custo a partir de melaço de cana-de-açúcar por meio fermentação sequencial de três estágios. O primeiro estágio consistiu na produção de biodiesel por esterificação direta de massa seca de *Cunninghamella echinulata* usando melaço de cana como substrato, o segundo a produção de H_2 com meio de cultura de *C. echinulata* por *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 e o terceiro a produção de CH_4 por bactérias metanogênicas utilizando meio gasto de *Clostridium*. A produção volumétrica máxima H_2 foi de $1,45 \text{ ml L}^{-1}$, após 48h de fermentação. A maior produção de metano acumulada foi de $1,69 \text{ ml L}^{-1}$ obtida após 48h. Os resultados apresentados sugerem o aumento da viabilidade econômica da produção de bioenergia a partir de melaço. Os resultados demonstraram que os microorganismos analisados tem potencial para produzir biocombustíveis a partir de melaço de cana-de-açúcar e pode converter quase todos os açúcares em biodiesel, hidrogênio e metano.

Han et al. (2016) realizaram análise técnico-econômica de produção de hidrogênio a partir do melaço de beterraba em reator CMISR, que foi operado em estudo relatado anteriormente (Han et al., 2012), a fim de fornecer informações básicas para a produção de H_2 em escala industrial. Para tal, assumiu-se uma planta de produção de hidrogênio a ser construída em Hangzhou, com vida útil de 10 anos. O efeito do volume de trabalho (10 e 50 m^3) sobre o desempenho econômico da planta de produção de hidrogênio também foi investigado, e o balanço de massa e energia do bioprocessos foi simulada usando o *software* Super-Pro Designer. Os autores concluíram que o retorno sobre o investimento da planta de produção de hidrogênio aumenta com o aumento de escalas de 10 m^3 e 50 m^3 , e a última foi considerada a mais economicamente viável, com valor líquido, período de retorno e taxa interna de retorno de 526,551 USD, 6,9 anos e 9,25%, respectivamente.

Tunçay et al. (2017) realizaram experimento em batelada utilizando sacarose e melaço de beterraba como substratos. Este estudo investigou os efeitos combinados da concentração de substrato inicial, pH e relação substrato/microorganismo na produção de hidrogênio. O inóculo utilizado foi proveniente de digestor anaeróbio, pré-tratado termicamente para eliminação das bactérias metanogênicas. Os testes foram conduzidos a 35°C e pH inicial de 7,0. Os resultados

revelaram que na utilização do melaço como substrato a concentração inicial de DQO foi a única variável que afetou HY e HPR. O HY máximo foi $0,015 \text{ mol H}_2 \text{ mol hexose}^{-1}$, alcançado a DQO inicial de 10 g L^{-1} . Os valores iniciais VSS estudados ($2,5\text{-}7,5 \text{ g / L}$) não tiveram efeito sobre HPR e HY. Os resultados também indicaram que o melaço leva à homoacetogênese, que deve ser levada em consideração e prevenida se o substrato for uma fonte de carbono natural, para otimização do processo e rendimentos maiores de H_2 .

Apresenta-se na Tabela 44 um resumo dos principais estudos realizados utilizando o melaço como substrato para produção de hidrogênio.

Tabela 4 - Resumo da literatura para produção de hidrogênio a partir de melaço.

Reator	Inóculo	T (° C)	TDH (h)	TCO (kg DQO m ⁻³ d ⁻¹)	HY (mol H ₂ mol ⁻¹ hex)	HPR (L d ⁻¹ L ⁻¹)	Principais metabólitos	Autores (ano)
CSTR	Lodos ativados	30	4,6 - 3,6	19,4 - 107,0	-	-	EtOH, HAc	Ren, Wang, Huang (1997)
HBR-piloto	ETE (anaeróbio)	35	10,57 - 3,9	3,11 - 85,6	26,13 ^a	5,57	EtOH, HAc, HBu	Ren et al. (2006)
ABR	Lodo ativado aeróbio	35	13,5	8,89	1,04	4,33	EtOH, HAc, HPr	Li et al. (2007)
Batelada	<i>Clostridium butyricum</i>	30-45	-	-	1,85	10,11	HBu, HLa, HAc	Wang e Jin (2009)
CSTR e CSTRimob	ETE	35	6	8 – 40	-	6,65 e 9,72	EtOH, HAc	Ren et al. (2010)
CSTR	ETE	35	6	8 – 32	-	7,21	EtOH, HAc, HBu	Han et al. (2011)
ABR	ETE	35	6	20 – 44	1,4	3,51	EtOH, HAc	Chang et al. (2011)
Batelada	<i>Thermotoga</i> ssp.	75	-	-	2,95	0,98	-	Cappelletti et al. (2012)
CSTR com recirculação	ETE (anaeróbio)	37	96 - 8	11,6 - 69,6	1,53		HBu, HAc	Mariakakis et al. (2012)
CSTR	ETE (anaeróbio)	36	6	8 – 24		1,13	EtOH, HAc, HBu	Han et al. (2012a)
CMISR	ETE (anaeróbio)	35	6	8 – 32	0,678	7,27	EtOH, HAc	Han et al. (2012b)
CSTR	Cervejaria (aeróbio)	35	8	6	-	0,5	EtOH, HAc	Li et al. (2013)
CSTR	Cervejaria (aeróbio)	35	8	12 e 18	-	1,12	EtOH, HAc	Zhu et al. (2013)
CSTR	ETE (anaeróbio)	35	4 - 10	30 - 48	-	0,29	EtOH, HAc	Wang et al. (2013)
Batelada	ETE (anaeróbio)	35	-	-	0,015	0,1982	HAc, HBu, HLa	Tunçay et al. (2017)

^aunidade: mol_{H2} Kg_{DQOrem}⁻¹

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

3.4 PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO E ÁCIDOS ORGÂNICOS EM REATOR DE LEITO GRANULAR EXPANDIDO

A maioria dos biorreatores anaeróbios testados para produção de H_2 a partir do melaço são tanques de agitação completa, sendo o CSTR a principal configuração de reator utilizada. Nesse tipo de reator, o sistema celular encontra pouca resistência à transferência de massa, uma vez que as células bacterianas estão suspensas e bem misturadas (REN et al., 2010). Embora, a agitação/mistura possa melhorar a transferência de massa, a igualdade entre o TRC e o TDH pode diminuir a concentração de biomassa dentro do reator e limitar a utilização do substrato e taxas de produção de hidrogênio e ácidos orgânicos, pois as células são lavadas a um baixo TDH (CHANG et al., 2011).

Dessa forma, uma variedade de sistemas de biorreatores de alta taxa, incluindo reator de leito fixo, reator de leito compactado, reator de leito granular expandido e reator de leito fluidificado foram desenvolvidos, a fim de desvincular o TRC e o TDH. Os sistemas de células imobilizadas, embora não sejam adequados para efluentes com alta concentração de sólidos suspensos, permitem melhor retenção da biomassa microbiana, TDHs menores e, em muitos casos, são menos suscetíveis à inibição por produto quando comparado com o crescimento em suspensão (REN et al., 2010). Dessa forma, é possível aplicar TDHs baixos sem que ocorra lavagem da biomassa do reator.

Considerado uma variação do reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB), o reator EGSB apresenta características hidrodinâmicas semelhantes ao RALF, exceto pela forma de imobilização da biomassa, uma vez que o reator EGSB não utiliza material suporte artificial para adesão e desenvolvimento da biomassa. A imobilização dos microrganismos ocorre, portanto, espontaneamente, por meio da formação de grânulos com estrutura e composição interna bem definida, que funcionam como micro reatores. Os grânulos possuem diâmetro que variam de 0,14 a 5,0 mm, fator que depende das condições de operação e características do substrato utilizado.

Guo et al. (2008a) utilizaram reator EGSB para avaliar o efeito da variação da TCO na produção de H_2 a partir de água residuária composta por melaço de beterraba (2,0 a 10,0 gDQO L^{-1} e relação DQO:N:P de 500-1000:5:1). A inoculação ocorreu com uma mistura de lodo aeróbio de ETE e lodo acidogênico de planta farmacêutica na proporção 1:1, submetidos a pré-tratamento por aeração, utilizando carvão ativado como material suporte. A operação se deu em TCO de 8 a 192 kgDQO $m^{-3} d^{-1}$, TDH de 6 h a 1 h, temperatura de 35 °C, e pH entre 4,2 e 4,4. Conclui-se que a PVH e o HY sofreram influência direta da variação da TCO, uma vez que a

variação ascendente de TCO permitiu que a PVH e o HY atingissem valores de pico de $17,0 \text{ L d}^{-1} \text{ L}^{-1}$ e $3,47 \text{ mols H}_2 \text{ mol hexose}^{-1}$. Nesse estudo, o efeito sobrecarga do substrato ocorreu quando COV foi tão elevada quanto $192 \text{ kgDQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. O biogás foi composto de 30% a 53% de H_2 , e os principais metabólitos detectados foram acetato e etanol, correspondente a 91% dos metabólitos totais. Verificou-se que rendimentos altos de hidrogênio estão sempre associados a um nível elevado de produção de etanol.

Guo et al. (2008b) utilizaram reator EGSB para tratar as águas residuais contendo amido e simultaneamente recuperar hidrogênio por cultura microbiana mista proveniente de CSTR utilizado para tratamento de água residual de melaço. O reator foi operado com TCO variando de $0,125$ a $1,0 \text{ g}_{\text{amido}} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, TDH de 24 h a 4 h, temperatura a 30°C e pH de 3,6 a 4,9. A PVH máxima foi de $1,64 \text{ L d}^{-1} \text{ L}^{-1}$ em TCO de $1,0 \text{ g}_{\text{amido}} \text{ L}^{-3} \text{ d}^{-1}$ e TDH de 4 h, o HY máximo foi de $0,88 \text{ mol H}_2 \text{ mol hexose}^{-1}$, obtido em TCO de $0,5 \text{ g}_{\text{amido}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ e TDH de 8 h. Em relação à remoção de DQO o máximo valor verificado foi 31,1%, em TDH de 24 h e TCO de $0,125 \text{ g}_{\text{amido}} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Os principais produtos de fermentação dissolvidos foram etanol, acetato e butirato. Os resultados experimentais permitiram inferir que a acidogênese das águas residuais de amido em EGSB pode, simultaneamente, produzir H_2 e tratar águas residuais de forma eficiente.

Liu et al. (2010) operaram reator EGSB para produção de hidrogênio a partir de lixiviado fresco originado de resíduos sólidos municipais ($12,0 \text{ gDQO L}^{-1}$), pela primeira vez. O reator foi inoculado com lodo de um biorreator de uma fábrica de produção de ácido cítrico, e operado com TCO de 1,4 a $40 \text{ gDQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, TDH de 24 h - 6 h, temperatura de 35°C , pH entre 5,0 e 5,5. Os autores descobriram que a fermentação do lixiviado gerou H_2 e teve melhora quando foi adicionado fosfato ao sistema. A maior eficiência de remoção DQO foi de 66,9% em TDH de 12 h. A PVH máxima observada foi de $2,15 \text{ L d}^{-1} \text{ L}^{-1}$). Os metabólitos solúveis foram compostos em sua maioria por ácido acético e etanol (80 %), sugerindo que a fermentação do tipo etanol foi dominante no processo. Os resultados sugeriram que o lixiviado fresco pode ser utilizado como substrato para produção contínua de hidrogênio.

Guo et al. (2013) estudaram de que modo a adição de L-cisteína afetaria a produção de H_2 no processo de partida de reatores EGSB. Foram operados três reatores EGSB, inoculados com lodo de ETE, pré-tratado pelo método de aeração, um sem adição de L-Cis e os outros com 0,5 e $1,0 \text{ g L}^{-1}$ do aminoácido, respectivamente. O TDH variou de 6 h a 2 h, a temperatura de operação foi de 35°C . O rendimento máximo de produção de hidrogênio foi de $1,93 \text{ mol H}_2 \text{ mol hexose}^{-1}$, que foi 20,6% superior ao controle. Os principais metabolitos líquidos foram etanol e acetato. Os resultados obtidos mostraram que a suplementação de L-Cis tem efeitos

positivos no processo de partida de reatores EGSB produtores de H_2 , podendo melhorar a estrutura do grânulo, aumentar a transferência de massa e a utilização do substrato.

Gallardo et al. (2014) analisaram a produção de 1,3-propanodiol (1,3-PDO) utilizando glicerol como fonte de carbono em três reatores EGSB. O reator 1, 2 e 3 foram inoculados com lodo granular, lodo granular tratado termicamente e lodo granular fragmentado, respectivamente. Avaliou-se diferentes TDH (24 h a 3 h), com concentração de glicerol afluyente constante em $25,0 \text{ g L}^{-1}$, em temperatura de 37°C e pH efluyente na faixa de 5,0 – 6,0 (TDH de 24 h a 12 h) e 4,0 – 5,0 (TDH de 6 h a 3 h). A conversão de glicerol em 1,3-PDO em todos os reatores não teve influência do pré-tratamento aplicado ao inóculo, nem no rendimento de 1,3-PDO. O rendimento máximo ($0,52 \text{ mol mol}^{-1}$) e a maior produtividade ($57 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) foram obtidas no R1 sob TDH de 12 h e 3 h respectivamente. Em análise do biogás, o H_2 foi detectado somente no R1 (13%) e R2 (39%), ambos em TDH de 24 h.

Tem-se na Tabela 5 um resumo da literatura para produção de hidrogênio e ácidos orgânicos em reatores EGSB.

Tabela 5 - Resumo da literatura para produção de hidrogênio e ácidos orgânicos em reatores EGSB.

Substrato	Inóculo	T (° C)	TDH (h)	TCO (kg DQO m ⁻³ d ⁻¹)	HY (mol H ₂ mol _{hexose} ⁻¹)	HPR (L d ⁻¹ L ⁻¹)	Principais metabólitos	Autores (ano)
Melaço	ETE + farmácia	35	6 - 1	8 - 192	3,47	17	EtOH, HAc	Guo et al. (2008a)
Amido	Lodo tratamento melaço	30	24 - 4	0,125 a 1,0 ^a	0,88	1,64	EtOH, HAc, HBU	Guo et al. (2008b)
Glicose	ETE + L-cis	35	6 - 2	40 - 120	1,93	-	EtOH, HAc	Guo et al. (2013)
Lixiviado	Biorreator ácido cítrico	35	24 - 6	1,4 - 40	-	2,15	EtOH, HAc	Li et al. (2010)
Glicerol	Lodo granular	37	24 - 3	-	-	-	1,3-PDO	Gallardo et al. (2014)

EtOH: etanol; HAc: ácido acético; HBU: ácido butírico; 1,3-PDO: 1,3-propanodiol

Fonte: Elaborado pela Autora (2018)

3.5 CONSIDERAÇÕES PRELIMINARES

O cenário da indústria sucroalcooleira vigente requer alternativas para diversificação da cadeia produtiva, tornando-se mais interessante quando há reaproveitamento dos subprodutos e resíduos da produção de etanol que, no fluxo original, ficariam sem utilidade específica em alguns períodos ou não seriam absorvidos completamente por outros processos. O melaço da cana-de-açúcar é utilizado para produção de etanol nos períodos de entressafra. No entanto, quando o etanol é proveniente do caldo, como ocorre na maior parte do ano de ciclo da cana-de-açúcar, este subproduto é acumulado. Dessa forma, a utilização do melaço nesse período seria uma alternativa para aproveitamento do melaço residual e geração de energia na forma de hidrogênio.

No que se refere aos sistemas utilizados para produção fermentativa de hidrogênio a partir do melaço, a maior parte das pesquisas desenvolvidas utilizaram cultura de células suspensas, enquanto que os sistemas com células imobilizadas foram pouco explorados. Os reatores com sistema celular imobilizado foram aplicados com sucesso no tratamento de águas residuais, incluindo reatores de leito fluidificado (BARROS E SILVA, 2012), leitos de lodo granular induzidos por transportador (LEE et al., 2008) e camas de lodo anaeróbico de fluxo ascendente (CHENG et al., 2012). No entanto, as informações acerca da utilização de células imobilizadas em reatores EGSB para a produção de hidrogênio fermentativo utilizando melaço como substrato são limitadas.

Frente à escassez de pesquisas envolvendo a utilização do melaço da cana-de-açúcar como substrato orgânico em reatores EGSB, investigou-se a produção contínua de ácidos orgânicos e hidrogênio a partir da combinação melaço da cana-de-açúcar + EGSB. Este estudo teve o intuito de complementar os conhecimentos acerca das rotas metabólicas envolvidas no processo de produção de hidrogênio, bem como sugerir alternativas para ampliação da cadeia produtiva da cana-de-açúcar.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este capítulo refere-se à descrição dos equipamentos e métodos utilizados na pesquisa. Apresenta-se a configuração dos reatores utilizados no experimento, a caracterização do substrato, meio nutriente utilizado, a inoculação, procedimento de partida dos sistemas e condições operacionais. As análises físico-químicas para monitoramento dos sistemas, e as fórmulas dos indicadores de desempenho da produção de hidrogênio e ácidos orgânicos também estão descritas. Os reatores operados foram denominados conforme apresentado na Figura 5, de acordo com suas respectivas condições de operação.

Figura 5 - Identificação dos reatores por siglas.

EGSB-5	• Reator EGSB acidogênico mesofílico com 5 g L ⁻¹ de melaço
EGSB-10	• Reator EGSB acidogênico mesofílico com 10 g L ⁻¹ de melaço
EGSB-15	• Reator EGSB acidogênico mesofílico com 15 g L ⁻¹ de melaço

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

4.1 UNIDADE EXPERIMENTAL

Neste estudo foram operados três reatores EGSB em escala laboratorial com configurações idênticas. Os reatores foram confeccionados em acrílico transparente, com dimensões descritas na Tabela 6. Todos os reatores foram operados em condição mesofílica de 30 ± 2 °C, regulada pela presença de banho termoeestático. A recirculação da água do banho se deu por meio do encamisamento da parte externa dos reatores e de serpentina (tubo em “U”) na parte interna. Para a alimentação dos reatores foram empregadas bombas dosadoras, enquanto que para recirculação do efluente foram utilizadas bombas do tipo diafragma.

Apresenta-se na Figura 6 o esquema da instalação experimental dos reatores EGSB, compostos por: (1) tanque de água residuária afluyente (barrilete), (2) bomba de alimentação do afluyente, (3) reator de leito fluidificado, (4) banho termoeestático, (5) bomba de recirculação, (6) compartimento de separação gás-líquido, (7) saída para medição e análise de gases e (8) saída do efluente.

Tabela 6 - Dimensões e volumes dos reatores EGSB

Reator	Altura (cm)	Diâmetro interno (cm)	Volume (cm ³)
EGSB-5	151,5	3,6	1542,1
EGSB-10	151,5	3,4	1375,5
EGSB-15	150,0	4,3	2177,0

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

Figura 6- Instalação experimental dos reatores EGSB

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

² Bomba dosadora ETATRON, modelo DLX – MA/AD. Vazão_{máxima}: 8 L h⁻¹. Pressão: 10 bar;

⁴ Banho ultratermostático Marconi, modelo MA-184;

⁵ Bomba de recirculação ECOSAN. Vazão: 10 a 200 L h⁻¹. Pressão: 6 kg cm⁻².

4.2 MATERIAL SUPORTE E INÓCULO

O material suporte e o inóculo utilizado nos reatores foi proveniente de reator UASB usado no tratamento de água residuária de abatedouro de aves (Avícola Dakar S/A, Tietê/SP). Parte do lodo coletado foi peneirado para separação dos grânulos (Figura 7) que foram utilizados para imobilização e adesão dos microrganismos após pré-tratamento térmico. O tratamento térmico dos grânulos consistiu no aquecimento dos grânulos a 90 °C por uma hora e posterior resfriamento em banho de gelo até temperatura ambiente (25 °C) (KIM et al., 2006).

Figura 7 - Grânulos utilizados como material suporte para adesão dos microrganismos.

Fonte: Autora (2018).

Na etapa de inoculação dos sistemas, outra parte do lodo foi triturada até obtenção de uma mistura homogênea (Figura 8), também submetida a pré-tratamento térmico. O lodo foi submetido a um choque térmico, constituindo em seu aquecimento prévio por 10 minutos a 90 °C com monitoramento de um termômetro e, em seguida, seu resfriamento em banho de gelo até que a temperatura atingisse 25 °C (KIM et al., 2006). O pré-tratamento térmico, em ambos os casos, objetivou a eliminação das arqueias metanogênicas e consequente supressão da metanogênese, para favorecer a seleção das bactérias acidogênicas esporulantes.

Figura 8 - Grânulos triturados utilizados como inóculo.

Fonte: Autora (2018).

Apresenta-se na Figura 9 um resumo correspondente às etapas do pré-tratamento térmico a que foram submetidos o material suporte (grânulos) e o inóculo utilizados nos reatores.

Figura 9 - Esquematisação do pré-tratamento térmico do material suporte (grânulos) e inóculo dos reatores.

Fonte: Elaborado pela autora (2018).

4.3 SUBSTRATO

O substrato orgânico utilizado como fonte de carbono foi o melaço, coletado na Usina São Martinho, localizada no município de Pradópolis (SP), produtora de etanol e açúcar, a partir

da cana-de-açúcar. O pH do melaço *in natura* foi de 6,04, e a sua caracterização físico-química está descrita na Tabela 77.

Tabela 7 - Caracterização físico-química do melaço da cana-de-açúcar

Componente	Concentração (g L ⁻¹)
Carboidratos totais	564,659
DQO total	844,680
N-NTK	12,900
Potássio	24,500
P-PO ₄ ⁻³	0,001
Cálcio	6,280
Magnésio	2,896
Zinco	0,011
Cobre	0,002
SST	6,214
SSV	1,343

Fonte: Ferreira (2016).

4.4 MEIO NUTRICIONAL

Com o intuito de suprir as necessidades metabólicas dos microrganismos e garantir melhores condições de funcionamento da enzima hidrogenase, foi adicionado, além do melaço diluído em água de abastecimento nas concentrações estabelecidas e apresentadas na Figura 5, meio nutricional à alimentação dos reatores. O meio nutricional utilizado no preparo da alimentação dos reatores foi o proposto por Del Nery (1987), conforme descrito na Tabela 88.

Tabela 8 – Composição do meio nutricional adicionado ao afluyente dos reatores

Componentes da solução nutritiva	Concentração (g L ⁻¹)
CH ₄ N ₂ O	150,00
K ₂ HPO ₄	102,00
CaC ₁₂ .6H ₂ O	112,80
NaHPO ₄ .4H ₂ O	40,08
KH ₂ PO ₄	26,04
FeSO ₄ .7H ₂ O	60,00
NiSO ₄ .7H ₂ O	12,00
SeO ₂	0,84
FeCl ₃ .6H ₂ O	6,00
CoC ₁₂ .2H ₂ O	0,96

Fonte: Adaptado de Del Nery (1987).

4.5 PROCEDIMENTO DE PARTIDA DOS REATORES

Inicialmente, foram realizados os ajustes das vazões das bombas de alimentação e de recirculação dos reatores. A vazão de recirculação dos reatores foi mantida entre 10 L h⁻¹ e 13 L h⁻¹, calibrada de modo a alcançar expansão de 20% a 30% do leito. A partida se deu de maneira semelhante para EGSB-5, EGSB-10, EGSB-15, realizada em modo batelada (recirculação), a fim de promover a acomodação da biomassa no material suporte e adaptá-la ao substrato.

Os afluentes preparados para a fase de inoculação foram constituídos de melaço e meio nutritivo, em concentrações previamente estabelecidas, e de inóculo pré-tratado termicamente na concentração de 10% do volume total do barrilete preparado para inoculação (8 L). A concentração de melaço inicial da partida foi de 2,5 g L⁻¹ em todos os reatores. Essa concentração foi elevada com adição de 2,5 g L⁻¹ a mais de melaço em relação à quantidade inicial. A concentração foi aumentada quando houve consumo de 80% do carboidrato adicionado anteriormente, até atingir a concentração de operação estabelecida para cada reator.

O pH da alimentação preparada para o procedimento de partida dos reatores foi de ~5,0, valor alcançado por meio da adição de ácido clorídrico (30% v/v). Adicionou-se, em todos os reatores, o volume máximo permitido de 16 ml de HCl para 8 L de alimentação (2,0 ml HCl L alimentação⁻¹), o qual foi suficiente para ajuste do pH, não sendo necessária a adição de ácido

acético puro ($C_2H_4O_2$). Para estabelecer a condição anaeróbia nos sistemas, gás nitrogênio foi injetado nos barriletes e no topo dos reatores, durante 15 minutos.

Após a conexão dos barriletes de alimentação aos respectivos reatores e consequente início da inoculação, o pH foi ajustado, se necessário, para a faixa entre 4,0 e 4,5, ideal para o desenvolvimento dos microrganismos acidogênicos e limitante aos metanogênicos. Durante o período de inoculação, o pH, a DQO e a concentração de carboidratos foram monitoradas diariamente em todos os reatores. A inoculação do EGSB-10 foi realizada durante 24 dias, enquanto que a do EGSB-5 e EGSB-15 teve duração de 25 dias.

Após atingir a concentração de substrato estabelecida para cada reator e constatar a adaptação do inóculo ao substrato aplicado, os sistemas foram abertos e passaram a operar em modo contínuo, com renovação diária da alimentação. Os reatores EGSB-5, EGSB-10 e EGSB-15 foram operados durante 191, 201 e 210 dias, respectivamente.

A Figura 10 resume a estratégia de operação adotada para os reatores EGSB-5, EGSB-10 e EGSB-15.

Figura 10 - Representação esquemática da estratégia de operação dos reatores, incluindo as etapas de inoculação, operação em modo de recirculação e operação em modo contínuo.

Fonte: Elaborado pela autora (2018).

4.6 CONDIÇÕES OPERACIONAIS

As fases de operação dos reatores foram estabelecidas em função da diminuição do TDH e consequente aumento da TCO, conforme descrito na Tabela 9.

Tabela 9 - Fases operacionais dos reatores EGSB				
Fase	TDH (h)	EGSB-5	EGSB-10	EGSB-15
		TCO (kgDQO m ⁻³ d ⁻¹)		
1	24	5,0	10,0	15,0
2	16	7,5	15,0	22,5
3	8	15,0	30,0	45,0
4	4	30,0	60,0	90,0
5	2	60,0	120,0	180,0
6	1	120,0	240,0	360,0

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

A distinção entre os três reatores foi a concentração de substrato aplicada, ou seja, a taxa de carregamento orgânico (TCO) a que foi submetido cada reator. O TDH inicial de operação elevado foi adotado como medida de segurança devido à ausência de pesquisas realizadas utilizando melaço da cana-de-açúcar em reator EGSB.

A mudança de fase dos reatores foi realizada após atingir estado estacionário (variação inferior a 10% durante período de 10 dias) dos parâmetros de consumo de carboidratos e produção de hidrogênio (composição, rendimento, produção volumétrica), não necessariamente em tempos iguais, uma vez que cada reator se comportou de maneira distinta. Nas fases em que não houve produção de hidrogênio, somente a estabilização do parâmetro de consumo de carboidratos foi considerado para mudança de fase.

A manutenção do pH efluente na faixa de 4,0 e 4,5 foi controlada pela adição de bicarbonato de sódio (NaHCO₃) no afluente de acordo com a relação de 0,5 g NaHCO₃ gDQOaplicada⁻¹. Ao longo dos dias de operação, essa relação variou em função do pH efluente observado.

4.7 MÉTODOS ANALÍTICOS

As determinações das análises foram realizadas periodicamente nas amostras coletadas de afluente e de efluente dos três reatores. Todas as análises foram executadas em triplicata.

4.7.1 Determinação da concentração de carboidratos

A concentração de carboidratos afluente e efluente dos reatores foi quantificada com base no método proposto por Dubois et al. (1956).

4.7.2 Análises físico-químicas

As determinações de pH, demanda química de oxigênio (DQO), sólidos suspensos voláteis (SSV) e sólidos suspensos totais (SST), foram realizadas de acordo com o descrito no *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (EATON et al., 2005).

4.7.3 Determinação da produção e composição do biogás

A produção volumétrica de biogás formado durante a fermentação foi estimada por meio do conceito de deslocamento de líquido, segundo proposto por Walker et al. (2009). A determinação dos componentes do biogás foi realizada por CG (Shimadzu GC-2010), equipado com detector de condutividade térmica, utilizando a coluna SigmaAldrich modelo Carboxen® 1010 Plot (30 m de comprimento e diâmetro interno de 0,53 mm). Para tal, a amostra, com volume de 1 mL, foi coletada no topo dos reatores por uma seringa *gas tight* com trava e, em seguida, injetada no cromatógrafo gasoso. As condições cromatográficas estão apresentadas na Tabela 10.

Tabela 10 - Condições do CG para determinação da composição do biogás

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

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

4.7.4 Análise de ácidos orgânicos voláteis e álcoois

As concentrações dos ácidos orgânicos (cítrico, málico, succínico, láctico, fórmico, acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico e caproico) e álcoois (etanol, metanol e n-butanol) foram determinadas por cromatografia líquida de elevado desempenho (HPLC Shimadzu®). O equipamento é composto por bomba (LC-10ADVP), amostrador automático (SIL-20A HT), coluna CTO-20A, a 43 °C, detector de arraste (SDP-M10 AVP), e coluna Aminex HPX-87H (300 mm, 7,8 mm, BioRad). A fase móvel foi representada pelo H₂SO₄ (0.01 N) a 0,5 mL min⁻¹.

4.8 FREQUÊNCIA DE ANÁLISES

Na Tabela 11 está descrita a frequência de realização das análises e respectivos métodos ou instrumentos analíticos empregados no monitoramento dos reatores.

Tabela 11 - Programa de monitoramento dos reatores EGSB

Análise	Frequência	Método
Vazão efluente	Diária	
pH	Diária	
DQO	3 x por semana	<i>Standard Methods</i>
SST ¹ , SSV ²	3 x por semana	
Carboidratos	3 x por semana	Dubois et al. (1956)
Ácidos orgânicos voláteis	3 x por semana	Penteado et al. (2013)
Vazão do biogás	3 x por semana	Walker et al. (2009)
Conteúdo do biogás (H ₂ , N ₂ , CH ₄ e CO ₂)	3 x por semana	Rosa et al. (2014)

¹sólidos suspensos totais, ²sólidos suspensos voláteis

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

4.9 CÁLCULOS UTILIZADOS NA AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DOS REATORES

Este item apresenta as principais equações utilizadas neste estudo, tais quais a TCO (7), a PVH (8), o HY (9), o rendimento de ácido láctico (LaY) (10) e a concentração de ácido acético proveniente da homoacetogênese (11).

$$TCO = \left[\frac{C_{DQO}}{TDH} \right] \quad (7)$$

Em que:

TCO é a Taxa de carregamento orgânico KgDQO m⁻³ d⁻¹;

C_{DQO} é a Concentração de DQO em Kg m⁻³;

TDH é o Tempo de Detenção Hidráulica em dias;

$$PVH = \left[\frac{\frac{V_{H_2}}{t}}{V_r} \right] \quad (8)$$

Em que:

PVH é a Produção volumétrica de hidrogênio em L d⁻¹ L⁻¹;

V H₂ é o Volume de hidrogênio produzido em L;

t é o Tempo em dias;

V_r é o Volume do reator em L;

$$HY = \frac{\left[\frac{P \text{ molar}}{Q \times (C_{af} - C_{ef})} \right]}{2} \quad (9)$$

Em que:

HY é o Rendimento de hidrogênio em mol H₂ mol hexose⁻¹;

P molar é a Produção molar de hidrogênio em mol H₂ d⁻¹;

Q é a Vazão em m³ d⁻¹;

C_{af} é a Concentração de carboidrato afluente em mol m^{-3} ;

C_{ef} é a Concentração de carboidrato efluente em mol m^{-3} ;

$$LaY = \left[\frac{C_{HLA} \text{ produzido} \times Q}{C_{ef}} \right] \quad (10)$$

Em que:

LaY é o Rendimento de ácido láctico em $\text{mol HLa mol hexose}^{-1}$;

C_{HLA} é a Concentração de ácido láctico efluente em mol L^{-1} ;

Q é a Vazão média em L d^{-1} ;

C_{ef} é a Concentração de carboidrato efluente em mol m^{-3} ;

$$Ac_{\text{homoac}} = \frac{(2 \times [HAc] + 2 \times [HBu] - [HPr] - H_2)}{6} \quad (11)$$

Em que:

Ac_{homoac} é o ácido acético homoacetogênico em mmol L^{-1} ;

$[HAc]$ é a concentração de ácido acético em mmol L^{-1} ;

$[HBu]$ é a concentração de ácido butírico em mmol L^{-1} ;

$[HPr]$ é a concentração de ácido propiônico em mmol L^{-1} ;

H_2 é a Produção de hidrogênio em mmol L^{-1} ;

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Este item apresenta os resultados e suas respectivas interpretações referentes a operação dos três reatores EGSB acidogênicos mesofílicos (EGSB-5, EGSB-10 e EGSB-15), utilizados nesta pesquisa para produção de hidrogênio e ácidos orgânicos com valor agregado.

5.1 CONSUMO DE CARBOIDRATOS

Apresenta-se nas Tabelas 12, 13 e 14, respectivamente, as concentrações de carboidratos afluente e efluente e suas conversões médias referentes ao EGSB-5, EGSB-10 e EGSB-15 em cada fase operacional. As concentrações de carboidratos afluente tiveram variações dentro da concentração fixa pré-estabelecida no início da pesquisa e se mantiveram entre $5,14 \pm 0,58 \text{ g L}^{-1}$ e $6,13 \pm 0,43 \text{ g L}^{-1}$ para o EGSB-5; entre $9,08 \pm 0,54 \text{ g L}^{-1}$ e $11,11 \pm 1,38 \text{ g L}^{-1}$ no EGSB-10; e entre $13,11 \pm 0,8 \text{ g L}^{-1}$ e $16,15 \pm 0,63 \text{ g L}^{-1}$ no EGSB-15. As concentrações de carboidratos efluente ficaram entre $0,06 \text{ g L}^{-1} \pm 0,04$ e $0,39 \pm 0,10 \text{ g L}^{-1}$ para o EGSB-5; entre $0,04 \text{ g L}^{-1} \pm 0,10$ e $1,09 \pm 0,77 \text{ g L}^{-1}$ no EGSB-10; e entre $0,82 \pm 0,13 \text{ g L}^{-1}$ e $4,16 \pm 1,23 \text{ g L}^{-1}$ no EGSB-15.

De acordo com as Figuras 11, 12 e 13 é possível observar que houve estabilidade no consumo de carboidratos dos três reatores ao longo das fases operacionais. O EGSB-5 obteve conversão média de carboidratos acima de 90%, com valor máximo de 100% no TDH de 24 h e valor mínimo de 88,75% no TDH de 1 h; o EGSB- 10 valores médios acima de 85%, com valor máximo de 98,26% no TDH de 8 h e valor mínimo de 73,19% no TDH de 1 h; e o EGSB-15 alcançou média de valores acima de 70%, com valor máximo de 96,16 no TDH de 16 h e valor mínimo de 61,78% no TDH de 1 h.

Tabela 12 - Concentrações e conversões médias de carboidratos para o EGSB-5.

Fase	TDH (h)	TCO (kgDQO m ⁻³ d ⁻¹)	C _{aflu} (g L ⁻¹)	C _{eflu} (g L ⁻¹)	Conversão (%)
1	24	5,0	5,45 ± 0,31 ⁽⁸⁾	0,06 ± 0,04 ⁽⁸⁾	98,92 ± 0,81 ⁽⁸⁾
2	16	7,5	6,13 ± 0,43 ⁽⁸⁾	0,30 ± 0,08 ⁽⁸⁾	95,11 ± 1,29 ⁽⁸⁾
3	8	15,0	5,14 ± 0,58 ⁽⁸⁾	0,28 ± 0,06 ⁽⁸⁾	95,64 ± 1,90 ⁽⁸⁾
4	4	30,0	5,28 ± 0,48 ⁽⁸⁾	0,28 ± 0,06 ⁽⁸⁾	94,63 ± 1,41 ⁽⁸⁾
5	2	60,0	5,66 ± 0,47 ⁽⁸⁾	0,32 ± 0,09 ⁽⁸⁾	94,29 ± 1,60 ⁽⁸⁾
6	1	120,0	5,23 ± 0,38 ⁽⁸⁾	0,39 ± 0,10 ⁽⁸⁾	92,39 ± 2,10 ⁽⁸⁾

C_{aflu}: carboidrato afluente; C_{eflu}: carboidrato efluente.

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

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

Tabela 13 - Concentrações e conversões médias de carboidratos para o EGSB-10.

Fase	TDH (h)	TCO (kgDQO m ⁻³ d ⁻¹)	C _{aflu} (g L ⁻¹)	C _{eflu} (g L ⁻¹)	Conversão (%)
1	24	10,0	10,33 ± 0,72 ⁽⁸⁾	0,04 ± 0,10 ⁽⁸⁾	96,15 ± 0,79 ⁽⁸⁾
2	16	15,0	11,04 ± 0,72 ⁽⁸⁾	0,50 ± 0,12 ⁽⁸⁾	95,50 ± 0,97 ⁽⁸⁾
3	8	30,0	9,58 ± 0,54 ⁽⁸⁾	0,44 ± 0,15 ⁽⁸⁾	95,40 ± 1,36 ⁽⁸⁾
4	4	60,0	9,08 ± 0,45 ⁽⁸⁾	0,35 ± 0,09 ⁽⁸⁾	96,14 ± 0,99 ⁽⁸⁾
5	2	120,0	11,11 ± 1,38 ⁽⁸⁾	0,53 ± 0,43 ⁽⁸⁾	95,23 ± 3,83 ⁽⁸⁾
6	1	240,0	9,33 ± 0,79 ⁽⁸⁾	1,09 ± 0,77 ⁽⁸⁾	88,66 ± 7,55 ⁽⁸⁾

C_{aflu}: carboidrato afluente; C_{eflu}: carboidrato efluente.

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

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

Tabela 14 - Concentrações e conversões médias de carboidratos para o EGSB-15.

Fase	TDH (h)	TCO (kgDQO m ⁻³ d ⁻¹)	C _{aflu} (g L ⁻¹)	C _{eflu} (g L ⁻¹)	Conversão (%)
1	24	15,0	14,88 ± 1,32 ⁽⁸⁾	0,82 ± 0,13 ⁽⁸⁾	94,50 ± 1,32 ⁽⁸⁾
2	16	22,5	16,15 ± 0,63 ⁽⁸⁾	2,26 ± 2,26 ⁽⁸⁾	86,08 ± 6,76 ⁽⁸⁾
3	8	45,0	15,89 ± 1,11 ⁽⁸⁾	1,27 ± 0,98 ⁽⁸⁾	91,06 ± 6,34 ⁽⁸⁾
4	4	90,0	14,92 ± 0,89 ⁽⁸⁾	1,32 ± 0,49 ⁽⁸⁾	91,26 ± 3,06 ⁽⁸⁾
5	2	180,0	13,11 ± 0,80 ⁽⁸⁾	1,30 ± 0,36 ⁽⁸⁾	90,02 ± 2,89 ⁽⁸⁾
6	1	360,0	14,35 ± 1,13 ⁽⁸⁾	4,16 ± 1,23 ⁽⁸⁾	71,38 ± 7,11 ⁽⁸⁾

C_{aflu}: carboidrato afluente; C_{eflu}: carboidrato efluente.

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

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

Figura 11 - Boxplot das conversões de carboidratos no EGSB-5.

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

Figura 12 - Boxplot das conversões de carboidratos no EGSB-10.

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

Figura 13 - Boxplot das conversões de carboidratos no EGSB-15.

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

Os valores elevados de conversão de carboidratos nos três reatores podem ser explicados pela composição do substrato utilizado na pesquisa. O melaço é constituído, principalmente, por açúcares de fácil conversão pelos microrganismos em processos fermentativos. Chang et al. (2011) avaliaram a produção de H_2 em CSTR, utilizando melaço de beterraba como substrato

e temperatura de 35 °C. Os autores obtiveram consumo de carboidrato entre 80 % e 85 %, valores menores aos alcançados nos reatores operados nesta pesquisa. Lima et al. (2013) operaram dois reatores anaeróbios de leito fixo utilizando sacarose e glicose como fonte de carbono (2 g L^{-1}), TDH de 2 h e temperatura de 25 °C. As conversões máximas de carboidratos foram de 98,28% e 100% para glicose e sacarose, respectivamente. A conversão superior observada no trabalho de Lima et al. (2013) pode ter ocorrido devido a concentração de substrato ter sido menor do que a utilizada neste trabalho e por Chang et al. (2011). Além disso, a utilização de substrato sintético por Lima et al. (2013), uma fonte de carbono mais simples e, portanto, de degradação mais fácil que o melaço também pode ter contribuído para as maiores conversões de carboidratos observadas por esses autores.

A composição do substrato utilizado é um fator relevante, principalmente, quando se trata de pesquisas desenvolvidas com culturas mistas anaeróbias, uma vez que em culturas mistas há, num primeiro momento, uma diversidade de microrganismos que podem não estar adaptados ao substrato. Fazendo um paralelo com trabalho em que foram utilizadas culturas puras, Wang e Jin (2009) realizaram experimento em batelada inoculadas com *Clostridium butyricum* W5, utilizando melaço de beterraba como substrato ($20 - 120 \text{ gDQO L}^{-1}$), pH na faixa entre 5,5 - 7,5 e temperatura de 30 °C. Os autores obtiveram valores de conversão do substrato acima de 85%, resultados semelhantes aos obtidos no EGSB-5, EGSB-10 e EGSB-15.

Os valores similares de conversão de carboidratos obtidos na pesquisa de Wang e Jin (2009) e neste trabalho permitem afirmar que, neste caso, a inoculação com microrganismos específicos não obteve resultados melhores com relação à conversão de carboidratos. Vale ressaltar que, apesar da conversão de substratos ser semelhante entre os dois trabalhos, outros parâmetros devem ser analisados concomitantemente, como o HY e a PVH.

Outro aspecto que pode ser associado à elevada conversão de carboidratos é o efeito da temperatura mesofílica de operação dos reatores. Sabe-se que a temperatura promove seleção de microrganismos que são capazes de converter o substrato em outros produtos. Temperaturas próximas à faixa mesofílica afetam positivamente o crescimento dos microrganismos no meio, uma vez que esses não estão submetidos a estresses ambientais causados pela temperatura.

Semelhante à esta pesquisa, Lay et al. (2010) avaliaram a produção de H_2 em um CSTR com concentração de melaço de beterraba de 40 gDQO L^{-1} , TDH entre 24 h - 3 h e temperatura de 35 °C. Os autores obtiveram média de consumo de carboidratos de 74%, valor um pouco menor do que as médias de conversão de carboidratos observadas neste trabalho. Os valores de conversão um pouco mais baixos obtidos por Lay et al. (2010) podem ser explicados pela

diferença de temperatura de operação que, apesar de também estar na faixa mesofílica (35 °C), foi um pouco mais alta do que temperatura de operação desta pesquisa (30 °C).

Fazendo um paralelo com o trabalho de Ferreira (2014) realizado no LCAII/DEQ/UFSCar, em que foi avaliada a produção de H₂ em RALF termofílico (55 °C) a partir do melaço da cana-de-açúcar, com variação de TDH entre 14 – 1 h e concentração afluyente de melaço de 5 g L⁻¹, foi observada conversão de carboidratos inferior as pesquisas realizadas em temperaturas mesofílicas, ficando entre 64 % (TDH 8 h) e 26 % (TDH 1 h).

As diferentes composições do melaço também podem ter influenciado na conversão de carboidratos. Os trabalhos realizados para produção de hidrogênio citados nesta pesquisa utilizaram melaço de beterraba como substrato, enquanto que neste trabalho foi utilizado melaço da cana-de-açúcar.

5.2 COMPOSIÇÃO DO BIOGÁS

O EGSB-5 não apresentou composição de H₂ em todo o período de operação. No EGSB-10, a composição de hidrogênio no biogás manteve-se entre 0 e 17,15% ± 3,85, com valor máximo de 20,37% no TDH de 24 h; e entre 4,38% e 19,06% no EGSB-15, com valor máximo de 42,2% também no TDH de 24 h. Nas Tabelas 15, 16 e 17 estão descritas a composição do biogás de cada fase operacional do EGSB-5, EGSB-10 e EGSB-15, respectivamente.

Tabela 15 - Composição do biogás produzido pelo EGSB-5.

Fase	TDH (h)	TCO (kg m ⁻³ d ⁻¹)	C _{CO2} (mmol L ⁻¹)	CO ₂ (%)
1	24	5,0	37,93 ± 9,47 ⁽⁸⁾	100,0 ⁽⁸⁾
2	16	7,5	35,37 ± 5,33 ⁽⁸⁾	100,0 ⁽⁸⁾
3	8	15,0	39,72 ± 8,97 ⁽⁸⁾	100,0 ⁽⁸⁾
4	4	30,0	35,23 ± 7,53 ⁽⁸⁾	100,0 ⁽⁸⁾
5	2	60,0	33,53 ± 4,92 ⁽⁸⁾	100,0 ⁽⁸⁾
6	1	120,0	33,75 ± 13,77 ⁽⁷⁾	100,0 ⁽⁷⁾

C_{CO2}: concentração de CO₂ no biogás.

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

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

Tabela 16 – Composição do biogás produzido pelo EGSB-10.

Fase	TDH (h)	TCO (kg m ⁻³ d ⁻¹)	H ₂ (%)	CO ₂ (%)
1	24	10,0	17,15 ± 3,85 ⁽⁸⁾	82,85 ± 10,45 ⁽⁸⁾
2	16	15,0	0,00 ± 0,00 ⁽⁸⁾	100,0 ⁽⁸⁾
3	8	30,0	4,38 ± 3,88 ⁽⁸⁾	95,62 ± 7,72 ⁽⁸⁾
4	4	60,0	11,84 ± 3,09 ⁽⁸⁾	88,16 ± 14,84 ⁽⁸⁾
5	2	120,0	7,56 ± 3,04 ⁽⁸⁾	92,44 ± 6,81 ⁽⁸⁾
6	1	240,0	8,03 ± 2,43 ⁽⁷⁾	91,97 ± 21,34 ⁽⁷⁾

C_{H2}: concentração de H₂ no biogás; C_{CO2}: concentração de CO₂ no biogás.

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

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

Tabela 17 – Composição do biogás produzido pelo EGSB-15.

Fase	TDH (h)	TCO (kg m ⁻³ d ⁻¹)	H ₂ (%)	CO ₂ (%)
1	24	15,0	19,06 ± 6,26 ⁽⁷⁾	80,94 ± 8,78 ⁽⁷⁾
2	16	22,5	7,42 ± 2,90 ⁽⁸⁾	92,58 ± 10,62 ⁽⁸⁾
3	8	45,0	4,38 ± 3,88 ⁽⁸⁾	95,62 ± 7,72 ⁽⁸⁾
4	4	90,0	11,84 ± 3,09 ⁽⁸⁾	88,16 ± 14,84 ⁽⁸⁾
5	2	180,0	7,56 ± 3,04 ⁽⁸⁾	92,44 ± 6,81 ⁽⁸⁾
6	1	360,0	9,85 ± 2,43 ⁽⁷⁾	90,15 ± 5,60 ⁽⁷⁾

C_{H2}: concentração de H₂ no biogás; C_{CO2}: concentração de CO₂ no biogás.

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

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

A composição do biogás dos três reatores evidenciou a eficiência do pré-tratamento térmico aplicado ao inóculo, uma vez que não apresentou metano, sendo composto somente por somente CO₂ e H₂. O não estabelecimento de microrganismos metanogênicos também está associado a fatores como baixo pH de operação dos sistemas, bem como elevadas TCOs aplicadas.

De acordo com as Tabelas 20, 21 e 22, pode-se observar que o conteúdo de H₂ no biogás foi baixo e instável em todos os reatores. O EGSB-5 apresentou somente CO₂ em todas as fases de operação, que, combinado com o hidrogênio na reação de homoacetogênese, pode ter sido

utilizado para formação de ácido acético, como discutido anteriormente. O EGSB-10 e EGSB-15 apresentaram composição semelhante no biogás, com baixos percentuais de H_2 e elevados percentuais de CO_2 .

Wang et al. (2013) operaram reator CSTR alimentado com melaço de beterraba (8 gDQO L^{-1}), verificando o efeito do TDH na produção de H_2 . O teor máximo de H_2 (62%) foi obtido em TDH de 6 h, diminuindo para 51,9% no menor TDH de operação (4 h). De maneira similar, as porcentagens máximas de H_2 observadas no EGSB-10 e EGSB-15 foram conseguidas nos maiores TDHs (24 h), apesar de inferiores às obtidas por Wang et al. (2013). Em TDHs maiores, as bactérias produtoras de hidrogênio possuem tempo suficiente para utilização satisfatória do substrato, o que não ocorre em TDHs mais curtos decorrente da alta velocidade do fluxo de entrada da alimentação.

Na pesquisa realizada por Guo et al. (2008) utilizando EGSB e melaço de beterraba como substrato para produção de H_2 ($2 \text{ a } 10 \text{ gDQO L}^{-1}$), obteve-se concentração de H_2 estável no biogás com valores entre 23 – 33%, sendo maiores do que os encontrados no EGSB-5, EGSB-10 e EGSB-15. A diferença entre os percentuais de H_2 encontrados pode estar relacionada com as diferenças entre as vias fermentativas seguidas em cada pesquisa, visível principalmente na concentração de etanol, o qual foi produzido em quantidades elevadas na pesquisa de Guo et al (2008) e em quantidades muito baixas nesta pesquisa.

Ren et al. (2010) operaram CSTR com biomassa imobilizada e CSTR com biomassa suspensa, utilizando melaço de beterraba como substrato ($2 \text{ a } 10 \text{ gDQO L}^{-1}$). O CSTR imobilizado obteve composição de H_2 entre 63 - 70%, enquanto que o CSTR suspenso teve percentual entre 50 - 57%. Estes autores sugeriram que a composição do biogás pode ter sofrido variação em função do pH, em que os maiores percentuais foram alcançados em pH próximo de 4,0, um pouco abaixo do pH de operação dos reatores desta pesquisa.

5.3 PRODUTIVIDADE VOLUMÉTRICA DE HIDROGÊNIO

A PVH é influenciada por diferentes parâmetros operacionais, como por exemplo a concentração de DQO aplicada, TDH, TCO, pH, temperatura. Neste tópico, as discussões serão realizadas em função do TDH. Os resultados obtidos nesta pesquisa referentes a PVH estão descritos nas Tabelas 18 e 19 e representados graficamente nas Figuras 14 e 15.

O EGSB-5 não obteve valores de PVH. O EGSB-10 obteve PVH na última fase de operação em TDH de 1 h e TCO de $120 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, com média de $3,55 \text{ L d}^{-1} \text{ L}^{-1}$ e valor máximo

de $4,56 \text{ L d}^{-1} \text{ L}^{-1}$. O EGSB-15 apresentou PVH nas duas últimas fases de operação, em TDH de 2 h e TCO de $180 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ com média de $1,94 \text{ L d}^{-1} \text{ L}^{-1}$ e valor máximo de $5,52 \text{ L d}^{-1} \text{ L}^{-1}$, e TDH de 1 h e TCO de $360 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ com média de $8,83 \text{ L d}^{-1} \text{ L}^{-1}$ e valor máximo de $13,92 \text{ L d}^{-1} \text{ L}^{-1}$.

Tabela 18 - Valores médios da PVH para as diferentes fases operacionais no EGSB-10.

Fase	TDH (h)	TCO ($\text{kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$)	PVH ($\text{L d}^{-1} \text{ L}^{-1}$)	PVH' ($\text{mmol h}^{-1} \text{ L}^{-1}$)
1	24	10,0	0 ⁽⁸⁾	0 ⁽⁸⁾
2	16	15,0	0 ⁽⁸⁾	0 ⁽⁸⁾
3	8	30,0	0 ⁽⁸⁾	0 ⁽⁸⁾
4	4	60,0	0 ⁽⁸⁾	0 ⁽⁸⁾
5	2	120,0	0 ⁽⁸⁾	0 ⁽⁸⁾
6	1	240,0	$3,55 \pm 0,86$ ⁽⁸⁾	$6,11 \pm 1,50$ ⁽⁸⁾

PVH: Produção Volumétrica de H_2 em $\text{L d}^{-1} \text{ L}^{-1}$; PVH': Produção Volumétrica de H_2 em $\text{mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

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

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

Tabela 19 - Valores médios da PVH para as diferentes fases operacionais no EGSB-15.

Fase	TDH (h)	TCO ($\text{kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$)	PVH ($\text{L d}^{-1} \text{ L}^{-1}$)	PVH' ($\text{mmol h}^{-1} \text{ L}^{-1}$)
1	24	15,0	0 ⁽⁸⁾	0 ⁽⁸⁾
2	16	22,5	0 ⁽⁸⁾	0 ⁽⁸⁾
3	8	45,0	0 ⁽⁸⁾	0 ⁽⁸⁾
4	4	90,0	0 ⁽⁸⁾	0 ⁽⁸⁾
5	2	180,0	$1,94 \pm 1,63$ ⁽⁸⁾	$3,35 \pm 2,81$ ⁽⁸⁾
6	1	360,0	$8,83 \pm 2,83$ ⁽⁸⁾	$15,17 \pm 4,88$ ⁽⁸⁾

PVH: Produção Volumétrica de H_2 em $\text{L d}^{-1} \text{ L}^{-1}$; PVH': Produção Volumétrica de H_2 em $\text{mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

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

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

Figura 14 - Boxplot da PVH em relação ao TDH aplicado no EGSB-10.

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

Figura 15 - Boxplot da PVH em relação ao TDH aplicado no EGSB-15.

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

A PVH observada nos reatores EGSB-10 e EGSB-15 apresentou uma tendência de elevação em função da TCO aplicada, uma vez que havia maior disponibilidade de substrato para os microrganismos converterem em H_2 a medida que o TDH era diminuído. Outros estudos também relataram comportamento semelhante em condições mesofílicas de operação (REN et

al., 2006; REN et al., 2010; LAY et al., 2010; CHANG et al., 2011; HAN et al., 2011; HAN et al., 2012a; HAN et al., 2012b; ZHU et al., 2013; WANG et al., 2013).

Tunçay et al. (2017) realizaram testes em batelada utilizando sacarose e melaço como substratos. Foram testadas três concentrações iniciais de DQO (10, 30 e 50 g L⁻¹), de modo que a PVH máxima obtida para melaço foi de 0,19 L d⁻¹ L⁻¹ em concentração inicial de DQO de 10 g L⁻¹. Esse valor foi bastante inferior ao valor médio da PVH observada no EGSB-10 (5,52 L d⁻¹ L⁻¹), operado com concentração de DQO semelhante (Tabela 28). No trabalho realizado por Tunçay et al. (2017), a concentração inicial de DQO aplicada na etapa de inoculação dos sistemas não foi aumentada gradativamente, o que pode ter interferido na adaptação dos microrganismos ao substrato (choque de carga).

De forma distinta, a estratégia de inoculação do EGSB-5, EGSB-10 e EGSB-15 ocorreu de maneira que a concentração de carboidratos e DQO aumentaram gradativamente até que fosse atingida a concentração de operação estabelecida para cada reator (descrição detalhada no tópico 4.5). Esses resultados permitem afirmar que a etapa de inoculação é determinante nos processos fermentativos. Guo et al. (2008) utilizaram estratégia de inoculação semelhante aos reatores EGSB operados nesta pesquisa, com aumento da concentração de DQO de 2, 4, 6, 8 e 10 gDQO L⁻¹, alcançando, também, valores de PVH mais altos (17,0 L d⁻¹ L⁻¹) do que os obtidos por Tunçay et al. (2017), e valores aproximados aos obtidos pelo reator EGSB-15 (13,92 L d⁻¹ L⁻¹).

Outro aspecto que pode influenciar a PVH é a configuração do reator utilizado. Lay et al. (2010) operaram reator CSTR alimentado com melaço, TCO de 40 - 320 kg m⁻³ d⁻¹, TDH de 24 h - 3 h e temperatura de 35 °C. A PVH máxima obtida pelos autores foi de 0,67 L d⁻¹ L⁻¹, valor inferior aos obtidos no EGSB-10 e EGSB-15. Os valores obtidos por Lay et al. (2010) foram inferiores aos observados nesta pesquisa (13,92 L d⁻¹ L⁻¹).

Guo et al. (2008), semelhantemente ao realizado nesta pesquisa, utilizaram reator EGSB para produção de H₂ a partir do melaço da beterrada, variando a TCO de 8 a 192 KgDQO m⁻³ d⁻¹ e TDH de 6 - 1 h. A PVH máxima alcançada foi de 17,0 L d⁻¹ L⁻¹ em TCO de 120 kgDQO m⁻³ d⁻¹. Apesar das condições semelhantes de operação, os valores de PVH obtidos por Guo et al. (2008) foram um pouco maiores do que os alcançados nesta pesquisa (13,92 L d⁻¹ L⁻¹).

As maiores PVHs alcançadas por Guo et al. (2018) e pelo EGSB-15 em comparação com Lay et al. (2010) podem ser justificadas pelo tipo de reator utilizado, uma vez que reatores com crescimento aderido (EGSB) podem solucionar os inconvenientes relacionados à agitação em CSTRs. É possível observar que, de modo distinto ao reator EGSB, em que a biomassa se encontra imobilizada na forma de grânulos, a agitação completa nos reatores CSTRs pode

ocasionar lavagem da biomassa, prejudicar o desenvolvimento dos microrganismos e afetar negativamente a PVH (LI et al., 2007).

Ainda considerando o estudo de Guo et al. (2008), a PVH máxima obtida ($17,0 \text{ L d}^{-1} \text{ L}^{-1}$ em TCO de $120 \text{ kgDQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$) foi reduzida quando a TCO aumentou para $192 \text{ kgDQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. Estudos anteriores (CHANG; LIN, 2004; MIZUNO et al., 2000) mostraram que a produção de H_2 pode diminuir em concentrações elevadas de substrato em decorrência da inibição da produção pelos produtos formados. Essa inibição pode bloquear vias metabólicas de produção de H_2 em detrimento da produção de ácidos orgânicos que utilizam os mesmos substratos (EDWARDS, 1970).

O estudo de Guo et al. (2008) demonstrou robustez na operação de cargas orgânicas elevadas (até $120 \text{ kgDQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$) para produção de hidrogênio em comparação com trabalhos que utilizaram sistemas com crescimento celular suspenso (HAN et al., 2011; MARIKAKIS et al., 2012). Nesta pesquisa, a produção de H_2 apresentou valor máximo de PVH na operação do EGSB-15 em TCO de $360 \text{ kgDQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. Esse resultado indica que o EGSB-15 foi mais robusto do que o EGSB operado por Guo et al. (2018), uma vez que não houve inibição por produtos na operação de TCOs maiores do que $120 \text{ kgDQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$.

A capacidade dos reatores com crescimento imobilizado de suportar maiores cargas orgânicas na produção fermentativa de hidrogênio pode ser comprovada ainda pela pesquisa de Ren et al. (2010). Esses autores compararam a produção de hidrogênio em CSTR com crescimento celular suspenso e CSTR com crescimento celular imobilizado, obtendo PVH mais alta em CSTR com biomassa imobilizada ($9,72 \text{ L d}^{-1} \text{ L}^{-1}$), resultado semelhante ao obtido no EGSB-15. O sistema operado com crescimento celular imobilizado, similar ao EGSB-10 e EGSB-15, apresentou também melhor estabilidade do pH, melhor eficiência na utilização do substrato e maior resistência ao acúmulo de metabólitos em TCOs elevadas.

Na Tabela 20 estão descritos alguns trabalhos que utilizaram melaço como substrato, de modo que as maiores PVHs foram obtidas em reatores com crescimento celular imobilizado.

Tabela 20 - Comparação da PVH em diferentes processos.

Reator	Crescimento biomassa	Substrato	PVH _{máx} (L d ⁻¹ L ⁻¹)	Referência
HBR	Suspenso	Melaço	5,57	Ren et al. (2006)
CSTR	Suspenso	Melaço	0,67	Lay et al. (2010)
CSTR	Suspenso	Melaço	7,21	Han et al. (2011)
EGSB	Imobilizado	Melaço	17,0	Guo et al. (2008)
RALF	Imobilizado	Glicose	3,96	Lima et al (2013)
EGSB	Imobilizado	Melaço	13,92	Este estudo

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

Em relação à estabilidade de produção de H₂, Ren et al. (2010) conseguiram valores de PVH constantes ao longo da operação, principalmente no CSTR com biomassa aderida. Nesta pesquisa, a estabilidade de produção de hidrogênio foi afetada pela formação de biopolímeros que proporcionavam um efeito de “cola” nos grânulos e dificultavam a transferência de massa e a liberação dos gases produzidos para o *headspace* do reator. Dessa forma, o hidrogênio produzido estava mais susceptível a deslocamentos de equilíbrio químicos de reações, como a produção de ácido acético.

Os biopolímeros foram observados em TCOs maiores do que 45 kg m⁻³ d⁻¹, especialmente no EGSB-15, o qual foi operado com concentração de carboidratos e DQO maiores e, portanto, TCOs mais elevadas. Os biopolímeros se estabelecem quando o ambiente no reator não é estritamente anaeróbio, que pode ser sido causado pela entrada de ar nas mangueiras de recirculação ou pelo topo do reator. Além disso, os ácidos orgânicos produzidos são substratos utilizados para produção de biopolímeros.

Segundo Van Loosdrecht, Pot, Heijnen (1997), o acúmulo de biopolímeros pode ser favorecido ainda quando o processo fermentativo passa por regimes de grande disponibilidade de substrato seguidos por regimes de pouca disponibilidade de substrato, ocasionados pelo seu consumo. Esses polímeros são, então, utilizados para crescimento bacteriano quando o substrato externo, no caso o melaço, é esgotado. Entretanto, é necessário análise microbiológica para melhor explicação da influência dos biopolímeros na produção de hidrogênio.

5.4 RENDIMENTO DE HIDROGÊNIO

As Tabelas 21 e 22 apresentam os valores de rendimento de H₂ obtidos para o EGSB-10 e EGSB-15, respectivamente. A Figura 16 representa o bloxpot dos rendimentos de H₂ do

EGSB-15 em função do TDH aplicado. O HY médio para o EGSB-10 foi de 0,088 mol H₂ mol hexose⁻¹, com valor máximo de 0,14 mol H₂ mol hexose⁻¹, obtido no TDH de 1 h. O valor máximo de HY no EGSB-15 foi de 0,25 mol H₂ mol hexose⁻¹, alcançado no TDH de 1 h.

Tabela 21 - Valores médios de rendimento de hidrogênio para o EGSB-10.

Fase	TDH (h)	TCO (kgDQO m ⁻³ d ⁻¹)	HY (L d ⁻¹)	HY (mol H ₂ mol hexose ⁻¹)
1	24	10,0	0 ⁽⁸⁾	0 ⁽⁸⁾
2	16	15,0	0 ⁽⁸⁾	0 ⁽⁸⁾
3	8	30,0	0 ⁽⁸⁾	0 ⁽⁸⁾
4	4	60,0	0 ⁽⁸⁾	0 ⁽⁸⁾
5	2	120,0	0 ⁽⁸⁾	0 ⁽⁸⁾
6	1	240,0	6,03 ± 1,48 ⁽⁷⁾	0,088 ± 0,031 ⁽⁷⁾

HY: rendimento de hidrogênio.

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

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

Tabela 22 - Valores médios de rendimento de hidrogênio para o EGSB-15.

Fase	TDH (h)	TCO (kgDQO m ⁻³ d ⁻¹)	HY (L d ⁻¹)	HY (mol H ₂ mol hexose ⁻¹)
1	24	15,0	0 ⁽⁸⁾	0 ⁽⁸⁾
2	16	22,5	0 ⁽⁸⁾	0 ⁽⁸⁾
3	8	45,0	0 ⁽⁸⁾	0 ⁽⁸⁾
4	4	90,0	0 ⁽⁸⁾	0 ⁽⁸⁾
5	2	180,0	2,26 ± 1,89 ⁽⁸⁾	0,050 ± 0,048 ⁽⁸⁾
6	1	360,0	10,23 ± 3,29 ⁽⁸⁾	0,131 ± 0,0039 ⁽⁸⁾

HY: rendimento de hidrogênio.

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

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

Figura 16 - Boxplot dos rendimentos de hidrogênio correspondente ao EGSB-15.

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

Em contrapartida à PVH, o HY é um parâmetro que tem maior influência do inóculo utilizado na partida dos reatores do que da configuração do reator (MARIKAKIS et al., 2012; CHANG et al., 2011. Wang e Jin (2009) tiveram HY de 1,53 mol H₂ mol hexose⁻¹ utilizando *Clostridium butyricum* W5 em batelada (30 - 45°C). Cappelletti et al. (2012) alcançaram HY máximo de 2,95 mol H₂ mol hexose⁻¹ para *Thermotoga neapolitana* em batelada (70°C). Ambos utilizaram melaço como substrato.

Os valores de rendimento obtidos por esses autores foram significativamente mais elevados do que os obtidos no presente trabalho. Isso ocorreu possivelmente pela utilização de microrganismos específicos para produção de H₂. Além disso, a temperatura termofílica nos testes de Cappelletti et al. (2012) também pode ter influenciado, uma vez que temperaturas elevadas possibilitam vantagens termodinâmicas e metabólicas aos microrganismos (OTHONG et al., 2009; DONG et al., 2011).

Utilizando inóculos mistos, os resultados referentes ao HY também foram maiores do que os dessa pesquisa. Mariakakis et al. (2012) alcançaram rendimento de 1,53 mol H₂ mol hexose⁻¹ operando CSTR com melaço de beterraba como substrato, enquanto que Chang et al., (2011) relataram rendimento de 1,40 mol H₂ mol hexose⁻¹ na operação de ABR utilizando, também, melaço de beterraba como substrato.

De acordo com Angenent (2004), os valores teóricos de rendimento de hidrogênio são 4 mols H₂ mol hexose⁻¹ se a hexose for metabolizada a ácido acético, e 2 mols H₂ mol hexose⁻¹ se a hexose tem como produto final o ácido butírico. Quando os produtos da fermentação são

compostos orgânicos mais reduzidos, como ácido lático e etanol, o rendimento de hidrogênio é ainda menor, uma vez que para formação desses produtos a partir da fermentação de carboidratos, as vias metabólicas contornam as principais reações produtoras de hidrogênio.

Dessa forma, os baixos rendimentos de hidrogênio obtidos neste estudo podem estar associados justamente aos principais metabólitos produzidos no EGSB-10 e EGSB-15 (ácido lático, ácido butírico e ácido acético). Tunçay et al. (2017) obtiveram HY máximo de 0,015 mol H_2 mol hexose⁻¹ em teste de batelada utilizando melaço como substrato orgânico, valor mais baixo do que os obtidos no EGSB-10 e EGSB-15 (Tabela 21 e Tabela 22). Nos testes de Tunçay et al. (2017) com concentrações de DQO de 30 e 50 g L⁻¹, os principais metabólitos produzidos foram ácido acético e ácido lático, principais metabólitos também produzidos pelo EGSB-10 e EGSB-15.

Outro fator que pode estar associado aos baixos rendimentos de hidrogênio alcançados no EGSB-10 e EGSB-15 está relacionado com a toxicidade dos metabólitos produzidos (INFANTES et al., 2012). Os ácidos orgânicos tendem a se acumular quando a produção de H_2 ocorre em sistemas com longos períodos de operação, como é o caso dos reatores EGSB operados neste estudo. Neste caso, sistemas de extração de ácidos orgânicos podem ser uma opção a ser considerada e estudada a fim recuperar ácidos com valor agregado, diminuir a toxicidade dos sistemas e, conseqüentemente, aumentando a produção de H_2 .

5.5 PRODUÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS

A produção de hidrogênio por meio de processos fermentativos está diretamente associada à conversão metabólica do substrato orgânico utilizado em intermediários químicos e solventes. A produção de metabólitos solúveis reflete as mudanças ocorridas na comunidade microbiana presente no meio e no seu metabolismo (ZHU et al., 2010). Dessa forma, fornece informações que podem ser interpretadas no sentido de melhorias para o processo de produção de H_2 , uma vez que se compreende as rotas produtoras e consumidoras de H_2 , bem como as rotas que competem por substrato. Além disso, determinados metabólitos, como o ácido acético, butírico e lático, possuem valor agregado podendo ser reaproveitados em diversos tipos de indústrias, como a química e a farmacêutica.

Figura 18 – Concentração dos principais ácidos orgânicos produzidos no EGSB-5 em função do TDH.

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

Observa-se que o ácido acético e o ácido butírico predominaram durante a operação de todas as fases do reator. As concentrações de ácido acético permaneceram praticamente estáveis com a redução do TDH de 24 para 1 h, variando de $0,628 \pm 0,133 \text{ g L}^{-1}$ a $1,061 \pm 0,278 \text{ g L}^{-1}$, com valor máximo de $1,6 \text{ g L}^{-1}$ no TDH de 8 h. As concentrações de ácido butírico foram crescentes com a diminuição do TDH, até alcançar média máxima no TDH de 1 h ($0,924 \pm 0,139 \text{ g L}^{-1}$) e valor máximo de $1,2 \text{ g L}^{-1}$ no TDH de 4 h. O ácido propiônico teve maior concentração alcançada no TDH de 24 h ($1,170 \pm 0,149 \text{ g L}^{-1}$), e o ácido valérico variou de $0,074 \pm 0,026$ e $0,319 \pm 0,065 \text{ g L}^{-1}$.

Os ácidos acético, propiônico e butírico foram responsáveis por 81 a 91% do total de metabólitos produzidos. Concentrações baixas de ácido isobutírico, láctico, caproico e succínico foram observadas (1 a 9% dos produtos totais), enquanto que o etanol foi detectado somente no TDH de 2 h ($0,037 \pm 0,022 \text{ g L}^{-1}$).

O ácido acético, ácido mais representativo na operação do EGSB-5, foi atribuído à ocorrência da homoacetogênese. De acordo com modelo elaborado por Arrojo et al. (2008) e complementado Luo et al. (2011), é possível estimar a porcentagem de ácido acético proveniente da reação homoacetogênica em função do balanço de massa em base molar dos metabólitos produzidos. O modelo proposto pelos autores considera somente a presença de ácido acético, ácido butírico e ácido propiônico como metabólitos principais, o que justifica a

sua aplicação somente na operação do EGSB-5. Na Tabela 23 estão descritos os resultados obtidos pelo teste de homoacetogênese, calculado de acordo com a Equação 11.

Tabela 23 - Quantificação do ácido acético proveniente da homoacetogênese em cada fase operacional do EGSB-5.

TDH (h)	Ac_{homo} (mmol/L)	Ac_{homo}/Ac_{total} (%)
24	2,45	23
16	3,77	39
8	7,59	45
4	6,73	51
2	6,07	51
1	6,02	45

Ac_{homo} : concentração de ácido acético proveniente da homoacetogênese; Ac_{total} : concentração de ácido acético total produzido pelo reator.

Fonte: Elaborado pela Autora (2018)

Observa-se que os valores de ácido acético proveniente da reação de homoacetogênese foram consideráveis na operação do EGSB-5. A produção de ácido acético foi crescente até o TDH de 2 h, apresentando pequeno decréscimo no TDH de 1 h (45 %). Esses valores permitem afirmar que a homoacetogênese desempenhou papel importante na limitação da produção de hidrogênio neste reator. Em TDHs mais curtos, a porcentagem de ácido acético proveniente da reação de homoacetogênese foi quase igual ao ácido acético responsável pela produção de hidrogênio.

Além disso, também houve presença de ácido propiônico em todas as fases de operação, o qual utiliza hidrogênio para sua formação. A formação de ácido propiônico no EGSB-5 pode estar relacionada à pressão parcial de hidrogênio elevada ou, ainda, à faixa de pH de operação do reator, uma vez que a inibição da produção de ácido propiônico ocorre em pHs mais elevados de operação (entre 6,0 e 6,5).

Os resultados obtidos por Tunçay et al. (2017) utilizando melaço de beterraba como substrato (10 a 50 gDQO L⁻¹) em testes de batelada indicaram que fontes de carbono complexas levam à homoacetogênese, a qual deve ser levada em consideração e prevenida durante a operação.

Tabela 24 – Concentração (g L⁻¹) e fração molar (%) dos metabólitos produzidos pelo EGSB-5 em função da TCO.

Metabólitos		TCO (kg DQO m ⁻³ d ⁻¹)					
		5	7,5	15	30	60	120
g L ⁻¹	EtOH	ND	ND	ND	ND	0,037 ± 0,022 ⁽⁸⁾	ND
%		0,0	0,0	0,0	0,0	2,64	0,0
g L ⁻¹	HAc	0,628 ± 0,133 ⁽⁸⁾	0,668 ± 0,186 ⁽⁸⁾	1,061 ± 0,278 ⁽⁸⁾	0,774 ± 0,149 ⁽⁸⁾	0,732 ± 0,230 ⁽⁸⁾	0,865 ± 0,257 ⁽⁷⁾
%		30,83	40,05	50,83	41,46	40,09	34,96
g L ⁻¹	HPr	1,170 ± 0,149 ⁽⁸⁾	0,404 ± 0,068 ⁽⁸⁾	0,445 ± 0,228 ⁽⁸⁾	0,494 ± 0,210 ⁽⁸⁾	0,537 ± 0,203 ⁽⁸⁾	0,859 ± 0,202 ⁽⁷⁾
%		45,49	22,71	15,43	18,38	21,21	29,29
g L ⁻¹	HIsoBu	0,033 ± 0,015 ⁽⁸⁾	0,030 ± 0,008 ⁽⁸⁾	0,035 ± 0,008 ⁽⁸⁾	ND	ND	ND
%		1,24	1,32	1,24	0,0	0,0	0,0
g L ⁻¹	HBu	0,397 ± 0,041 ⁽⁸⁾	0,394 ± 0,050 ⁽⁸⁾	0,714 ± 0,242 ⁽⁸⁾	0,901 ± 0,137 ⁽⁸⁾	0,803 ± 0,255 ⁽⁸⁾	0,924 ± 0,139 ⁽⁷⁾
%		13,60	18,47	25,05	30,73	31,45	26,69
g L ⁻¹	HVa	0,319 ± 0,065 ⁽⁸⁾	0,225 ± 0,043 ⁽⁸⁾	0,137 ± 0,035 ⁽⁸⁾	0,097 ± 0,029 ⁽⁸⁾	0,074 ± 0,026 ⁽⁸⁾	0,081 ± 0,043 ⁽⁷⁾
%		8,85	8,92	4,50	2,72	3,66	3,04
g L ⁻¹	HCa	ND	0,231 ± 0,031 ⁽⁸⁾	0,116 ± 0,081 ⁽⁸⁾	0,150 ± 0,0056 ⁽⁸⁾	0,068 ± 0,045 ⁽⁸⁾	0,065 ± 0,044 ⁽⁷⁾
%		0,0	8,52	2,95	4,07	3,30	2,55
g L ⁻¹	HLa	ND	ND	0,027 ± 0,038 ⁽⁸⁾	0,021 ± 0,053 ⁽⁸⁾	0,007 ± 0,013 ⁽⁸⁾	0,103 ± 0,107 ⁽⁷⁾
%		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,26
g L ⁻¹	HSu	ND	ND	ND	ND	0,011 ± 0,012 ⁽⁸⁾	0,047 ± 0,031 ⁽⁷⁾
%		0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	1,21

EtOH: etanol; HAc: ácido acético; HPr: ácido propiônico; HIsoBu: ácido isobutírico; HBu: ácido butírico; HVa: ácido valérico; HCa: ácido capróico; HLa: ácido láctico; HSu: ácido succínico; ND: não detectado.

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

5.5.2 EGSB-10

Os ácidos orgânicos que predominaram na operação do EGSB-10 foram: ácido propiônico (HPr), ácido acético (HAc), ácido butírico (HBu) e ácido lático (HLa). A Figura 19 representa a distribuição molar dos metabólitos em cada TDH operado, a Figura 20 a distribuição dos produtos da fermentação ao longo do tempo. Ao final, a Tabela 25 descreve os valores da concentração e fração molar dos metabólitos em todas as fases operacionais.

Figura 19 - Porcentagem molar dos principais metabólitos produzidos pelo EGSB-10 em cada fase operacional.

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

Figura 20 – Concentração dos principais ácidos orgânicos produzidos no EGSB-10 em função do TDH

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

De acordo com os resultados expostos, observou-se que o ácido acético e ácido butírico foram predominantes durante a operação de todas as fases do EGSB-10, com valores máximos de $1,383 \pm 0,392$ (TDH 8 h) e $1,898 \pm 0,516$ (TDH 4 h), respectivamente. No TDH de 8 h houve diminuição da concentração de ácido acético e aumento da concentração de ácido láctico. As concentrações de ácido propiônico foram decrescendo com a diminuição do TDH, variando de $1,067 \pm 0,276$ (TDH 24 h) a $0,859 \pm 0,292$ (TDH 1h), com concentração mínima de $0,558 \pm 0,208$ no TDH de 2 h.

Os ácidos acético, butírico, propiônico e láctico foram responsáveis por 82 a 97% do total de metabólitos produzidos. Baixas concentrações de ácido isobutírico, caproico e succínico foram observadas (2 a 19% dos produtos totais). O etanol foi detectado somente no TDH de 8 h e 4 h, também em concentrações muito baixas (3 a 15% dos produtos).

No EGSB-10, a via metabólica para produção de hidrogênio esteve associada à produção de ácido butírico e ácido láctico, rotas comuns ao EGSB-15, as quais serão discutidas no próximo item (5.5.3)

Tabela 25 - Concentração (g L⁻¹) e fração molar (%) dos metabólitos produzidos pelo EGSB-10 em função da TCO.

Metabólitos		TCO (kg DQO m ⁻³ d ⁻¹)					
		10	15	30	60	120	240
g L ⁻¹	EtOH	ND	ND	0,110 ± 0,043 ⁽⁸⁾	0,506 ± 0,187 ⁽⁸⁾	ND	ND
%		0,0	0,0	3,33	15,90	0,0	0,0
g L ⁻¹	HAc	0,386 ± 0,298 ⁽⁸⁾	0,897 ± 0,354 ⁽⁸⁾	1,383 ± 0,392 ⁽⁸⁾	1,099 ± 0,289 ⁽⁸⁾	0,671 ± 0,119 ⁽⁸⁾	0,899 ± 0,410 ⁽⁷⁾
%		11,15	26,28	32,92	29,50	27,71	15,13
g L ⁻¹	HPr	1,067 ± 0,276 ⁽⁸⁾	1,367 ± 0,372 ⁽⁸⁾	1,305 ± 0,373 ⁽⁸⁾	0,858 ± 0,391 ⁽⁸⁾	0,558 ± 0,208 ⁽⁸⁾	0,859 ± 0,292 ⁽⁷⁾
%		32,96	35,21	25,90	17,41	18,12	20,70
g L ⁻¹	HIsoBu	ND	0,093 ± 0,057 ⁽⁸⁾	ND	0,034 ± 0,023 ⁽⁸⁾	ND	ND
%		0,0	1,67	0,0	0,58	0,0	0,0
g L ⁻¹	HBu	1,393 ± 0,611 ⁽⁸⁾	1,382 ± 0,355 ⁽⁸⁾	0,862 ± 0,869 ⁽⁸⁾	1,898 ± 0,516 ⁽⁸⁾	1,617 ± 0,867 ⁽⁸⁾	1,775 ± 0,963 ⁽⁷⁾
%		36,30	28,99	8,48	34,85	51,00	45,73
g L ⁻¹	HVa	0,119 ± 0,076 ⁽⁸⁾	0,415 ± 0,146 ⁽⁸⁾	ND	0,100 ± 0,030 ⁽⁸⁾	0,062 ± 0,034 ⁽⁸⁾	ND
%		2,45	7,85	0,0	2,12	1,94	0,0
g L ⁻¹	HLa	1,020 ± 1,138 ⁽⁸⁾	ND	1,472 ± 0,941 ⁽⁸⁾	0,145 ± 0,272 ⁽⁸⁾	0,286 ± 0,527 ⁽⁸⁾	1,324 ± 1,543 ⁽⁷⁾
%		17,14	0,0	29,37	0,32	0,83	13,56
g L ⁻¹	HSu	ND	ND	ND	ND	0,039 ± 0,047 ⁽⁸⁾	0,158 ± 0,143 ⁽⁷⁾
%		0,0	0,0	0,0	0,0	0,86	1,58
g L ⁻¹	HFo	ND	ND	ND	ND	ND	0,117 ± 0,069 ⁽⁷⁾
%		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,91

EtOH: etanol; HAc: ácido acético; HPr: ácido propiônico; HIsoBu: ácido isobutírico; HBu: ácido butírico; HVa: ácido valérico; HLa: ácido láctico; HSu: ácido succínico; HFo: ácido fórmico; ND: não detectado.

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

5.5.3 EGSB-15

A operação do EGSB-15 teve, semelhante ao EGSB-10, como principais produtos metabólicos o ácido acético, ácido butírico, ácido propiônico e ácido lático. Na Figura 21 está representada a distribuição molar dos produtos da fermentação em cada TDH operado, e na Figura 22 a concentração dos metabólitos em cada TDH operado.

Figura 21 - Porcentagem molar dos principais metabólitos produzidos pelo EGSB-15 em cada fase operacional.

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

Figura 22 - Ácidos orgânicos produzidos no EGSB-15 em função do TDH

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

De acordo com as Figuras 16 e 17, observou-se que no EGSB-15 houve maior variação dos ácidos orgânicos produzidos, com predominância de ácido acético, butírico e propiônico nos TDHs de 24 h, 16 h e 8 h, enquanto que nos TDHs de 4 h, 2 h e 1 h predominaram o ácido acético, butírico e láctico. As concentrações de ácido propiônico decresceram com a diminuição do TDH, variando de $3,629 \pm 969 \text{ g L}^{-1}$ (TDH 24 h) a $0,292 \pm 0,165 \text{ g L}^{-1}$ (TDH 1 h). De maneira oposta, as concentrações de ácido láctico aumentaram a medida que o TDH diminui, variando de $0,500 \pm 0,382 \text{ g L}^{-1}$ (TDH 24 h) a $4,841 \pm 1,444 \text{ g L}^{-1}$ (TDH de 2 h) e decrescendo para $3,446 \pm 0,512 \text{ g L}^{-1}$ no TDH de 1 h.

Semelhante ao ácido láctico, as concentrações de ácido acético também aumentaram com a diminuição do TDH de 24 para 2 h ($0,387 \pm 0,169 \text{ g L}^{-1}$ a $1,751 \pm 0,505 \text{ g L}^{-1}$), decrescendo para $1,311 \pm 0,383 \text{ g L}^{-1}$ no TDH de 1 h. O ácido butírico manteve-se constante ao longo das fases, com valor mínimo de $1,824 \pm 0,598 \text{ g L}^{-1}$ (TDH 1 h) e valor máximo de $3,126 \pm 0,909 \text{ g L}^{-1}$ (TDH 8 h). Os ácidos acético, butírico, propiônico e láctico foram responsáveis por 92% a 97% do total de metabólitos produzidos. Baixas concentrações de ácido caproico, fórmico e succínico foram observadas (até 6% dos produtos totais). O etanol foi detectado somente no TDH de 8 h e 4 h em concentrações baixas ($0,070 \pm 0,184 \text{ g L}^{-1}$ a $0,230 \pm 0,150 \text{ g L}^{-1}$).

Diferentemente da maioria dos estudos que utilizaram melaço como substrato orgânico para produção fermentativa de hidrogênio (REN et al., 1997; REN et al., 2006; LI et al., 2007; GUO et al., 2008; REN et al., 2010; HAN et al., 2011; CHANG et al. 2011; HAN et al., 2012a;

HAN et al., 2012b; LI et al., 2013; ZHU et al., 2013; WANG et al., 2013), a produção de hidrogênio no EGSB-15 não esteve associada à produção de etanol como um dos metabólitos principais pela formação de H_2 .

Assim como o EGSB-10, observou-se na operação do EGSB-15 que as rotas metabólicas preferenciais de produção de hidrogênio foram as vias do ácido láctico e ácido butírico. Em fermentações desse tipo, o equilíbrio de $NADH/NAD^+$ ocorre pelo aumento da produção de ácido láctico, uma vez que a via fermentativa do ácido butírico não possui estabilidade de acumulação dessas enzimas (BRAGA et al., 2015). Ainda de acordo com Braga et al. (2015), as alterações relacionadas ao equilíbrio de $NADH/NAD^+$ são mecanismos microbianos para regeneração do $NADH$ sem que haja aumento da pressão parcial de hidrogênio. No entanto, esse mecanismo proporciona menor formação de hidrogênio em relação as vias de ácido acético e ácido butírico (Equações 1, 2, 5 e 6).

A produção de hidrogênio esteve, portanto, associada ao aumento da concentração de ácido láctico, que aumentou com o decréscimo do TDH aplicado e consequente aumento da TCO, como pode ser observado nas Figuras 16 e 17. De acordo com Chojnacka et al. (2015), concentrações elevadas de ácido láctico podem ser convertidas, juntamente com ácido acético, em ácido butírico e H_2 (Equação 6). O aumento da concentração de ácido láctico foi acompanhado pela diminuição das concentrações de ácido propiônico, rotas que são favoráveis à produção fermentativa de hidrogênio.

Comportamento semelhante foi verificado por Mariakakis et al. (2012) ao operarem CSTR em condição mesofílica ($37^\circ C$) e melaço de beterraba como fonte de carbono (TCO de $11,6 - 69,6 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$). Esses autores indicaram que houve aumento da produção de ácido láctico em condições de disponibilidade de substrato elevada. No entanto, os autores verificaram que o aumento da produção de ácido láctico também proporcionou diminuição da produção de hidrogênio.

Nokie et al. (2012) investigaram a possibilidade de coexistirem bactérias produtoras de hidrogênio e de bactérias produtoras de ácido láctico a partir de resíduo de processamento de tofu. Os autores observaram que a produção de hidrogênio não ocorreu quando houve produção de ácido láctico. Esta inibição foi atribuída à formação de bacteriocinas (antibióticos polipeptídicos) pelas bactérias lácticas durante a competição por substrato.

Adamberg et al. (2003) relataram que os microrganismos produtores de ácido láctico são favorecidos em baixos valores de pH, assim como ocorre com os homoacetógenos. Saady (2013), por sua vez, afirmou que a inibição por substrato pode ser uma das causas para o aumento da produção de ácido láctico. Dessa forma, os microrganismos produtores de ácido

lático podem ter se tornado dominantes na operação do EGSB-15, uma vez que encontraram condições ambientais adequadas de elevada quantidade de substrato, em virtude da TCO elevada, e pH baixo.

Apesar da produção de ácido lático ter sido uma via importante para produção de H_2 , essa pode ter afetado negativamente o rendimento de hidrogênio. Quando são formados butirato, propionato e lactato extensivamente, o HY diminui abaixo de $2 \text{ mol } H_2 \text{ mol hexose}^{-1}$ (LEVIN et al., 2004). A pressão parcial de H_2 também pode reduzir o HY deslocando a via metabólica no sentido de formação de outros subprodutos reduzidos, como o ácido lático e ácido propiônico.

De acordo com a Figura 23, pode-se observar que o rendimento de hidrogênio foi diretamente afetado pela produção de ácido lático no EGSB-15, uma vez que os valores de HY mantiveram-se muito baixos (máximo de $0,25 \text{ mol } H_2 \text{ mol hexose}^{-1}$), enquanto que os valores de rendimento de ácido lático (LaY) foram bastante elevados (máximo de $11,43 \text{ mol HLa mol hexose}^{-1}$). Segundo Collet et al. (2004), a produção de ácido lático utiliza os elétrons provenientes do NADH necessários para a produção de H_2 , reduzindo o HY. Calli et al. (2008) indicaram que os baixos rendimentos de hidrogênio ocorreram em função da pressão parcial elevada de H_2 , que resultou na mudança da via fermentativa da produção de acetato para produção de butirato, e na inibição dos produtores de hidrogênio pelas bactérias produtoras de ácido lático.

Figura 23 - Relação entre o rendimento de hidrogênio (HY) e rendimento de ácido lático (LaY) no EGSB-15.

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

Apesar dos inconvenientes associados à presença de ácido láctico na obtenção de hidrogênio, a produção desse ácido concomitante à produção de H₂ pode ser considerada interessante, uma vez que o ácido láctico é um ácido orgânico de alto valor agregado.

Na Tabela 26 estão descritos os valores da concentração e fração molar dos metabólitos em cada fase de operação, em que é possível observar as concentrações elevadas de ácido láctico produzidas pelo EGSB-15 (valores máximos de $4,841 \pm 1,444 \text{ g L}^{-1}$ no TDH de 2 h).

Tabela 26 - Concentração (g L⁻¹) e fração molar (%) dos metabólitos produzidos pelo EGSB-15 em função da TCO.

Metabólitos		TCO (kg DQO m ⁻³ d ⁻¹)					
		15	22,5	45	90	180	360
g L ⁻¹	EtOH	ND	ND	0,070 ± 0,184 ⁽⁸⁾	0,230 ± 0,150 ⁽⁸⁾	ND	ND
%		0,0	0,0	5,33	3,33	0,0	0,0
g L ⁻¹	HAc	0,387 ± 0,169 ⁽⁸⁾	0,610 ± 0,215 ⁽⁸⁾	0,928 ± 0,142 ⁽⁸⁾	0,348 ± 0,099 ⁽⁸⁾	1,751 ± 0,505 ⁽⁸⁾	1,311 ± 0,383 ⁽⁷⁾
%		6,82	12,94	19,15	10,43	25,18	25,90
g L ⁻¹	HPr	3,629 ± 969 ⁽⁸⁾	2,435 ± 1,106 ⁽⁸⁾	2,967 ± 0,651 ⁽⁸⁾	0,287 ± 0,118 ⁽⁸⁾	0,409 ± 0,158 ⁽⁸⁾	0,292 ± 0,165 ⁽⁷⁾
%		54,10	37,52	25,62	6,73	3,95	3,75
g L ⁻¹	HBu	2,057 ± 0,744 ⁽⁸⁾	1,895 ± 0,885 ⁽⁸⁾	3,126 ± 0,909 ⁽⁸⁾	1,944 ± 0,643 ⁽⁸⁾	2,000 ± 0,379 ⁽⁸⁾	1,824 ± 0,598 ⁽⁷⁾
%		30,66	27,38	24,42	38,33	18,20	22,88
g L ⁻¹	HVa	0,886 ± 0,242 ⁽⁸⁾	0,617 ± 0,210 ⁽⁸⁾	ND	1,148 ± 0,012 ⁽⁸⁾	ND	ND
%		0,88	0,61	0,0	0,95	0,0	0,0
g L ⁻¹	HCa	0,014 ± 0,014 ⁽⁸⁾	ND	ND	ND	ND	ND
%		0,13	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
g L ⁻¹	HLa	0,500 ± 0,382 ⁽⁸⁾	1,712 ± 1,153 ⁽⁸⁾	0,897 ± 0,535 ⁽⁸⁾	1,805 ± 0,407 ⁽⁸⁾	4,841 ± 1,444 ⁽⁸⁾	3,446 ± 0,512 ⁽⁷⁾
%		6,40	20,89	25,47	36,63	49,42	45,32
g L ⁻¹	HSu	ND	0,094 ± 0,241 ⁽⁸⁾	ND	0,251 ± 0,115 ⁽⁸⁾	0,147 ± 0,023 ⁽⁸⁾	0,228 ± 0,067 ⁽⁷⁾
%		0,0	0,59	0,0	4,46	1,01	2,13
g L ⁻¹	HFo	0,049 ± 0,071 ⁽⁸⁾	0,026 ± 0,027 ⁽⁸⁾	ND	0,048 ± 0,023 ⁽⁸⁾	0,100 ± 0,023 ⁽⁸⁾	ND
%		0,84	0,57	0,0	2,13	2,44	0,0

EtOH: etanol; HAc: ácido acético; HPr: ácido propiônico; HIsBu: ácido isobutírico; HBu: ácido butírico; HVa: ácido valérico; HCa: ácido capróico; HLa: ácido láctico; HSu: ácido succínico; HFo: ácido fórmico; ND: não detectado.

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

5.6 PARÂMETROS DE CONTROLE DOS SISTEMAS ACIDOGÊNICOS

5.6.1 Remoção de DQO

Em sistemas acidogênicos, como os operados neste estudo, a DQO é removida através da liberação de, principalmente, H_2 e CO_2 , enquanto que a DQO convertida em intermediários químicos permanecem dentro do sistema. Dessa forma, a eficiência de remoção de DQO em processos acidogênicos é consideravelmente menor do que a eficiência de remoção em processos anaeróbios tradicionais (HAN et al., 2012b).

A remoção de DQO no EGSB-5 teve valores médios entre $0,02 \pm 3,50\%$ a $14,80 \pm 11,47\%$ (Tabela 27), no EGSB-10 a conversão variou de $7,73 \pm 6,92\%$ a $26,28 \pm 14,38\%$ (Tabela 28), e o EGSB-15 converteu de $3,04 \pm 3,27\%$ a $16,42 \pm 8,86\%$ (Tabela 29). As Figuras 24, 25 e 26 demonstram que a remoção de DQO nos três reatores manteve-se constante de até 30%, resultados teóricos esperados em sistemas acidogênicos produtores de hidrogênio (ANTONOPULOU et al., 2008).

Tabela 27 - Concentrações afluenta, efluente e remoção de DQO no EGSB-5.

Fase	TDH (h)	TCO (kgDQO m ⁻³ d ⁻¹)	DQO _{aflu} (g DQO L ⁻¹)	DQO _{eflu} (g DQO L ⁻¹)	Remoção (%)
1	24	5,0	$8,39 \pm 0,67^{(8)}$	$6,54 \pm 0,85^{(8)}$	$10,75 \pm 10,71^{(8)}$
2	16	7,5	$7,00 \pm 0,95^{(8)}$	$6,09 \pm 0,29^{(8)}$	$10,28 \pm 8,89^{(8)}$
3	8	15,0	$6,36 \pm 0,66^{(8)}$	$5,76 \pm 0,68^{(8)}$	$14,02 \pm 5,49^{(8)}$
4	4	30,0	$7,18 \pm 0,67^{(8)}$	$6,79 \pm 0,42^{(8)}$	$4,51 \pm 2,99^{(8)}$
5	2	60,0	$6,73 \pm 0,39^{(8)}$	$6,83 \pm 0,18^{(8)}$	$0,02 \pm 3,50^{(8)}$
6	1	120,0	$7,18 \pm 1,27^{(8)}$	$6,22 \pm 0,35^{(8)}$	$14,80 \pm 11,47^{(8)}$

DQO_{aflu}: DQO afluenta; DQO_{eflu}: DQO efluente.

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

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

Tabela 28 - Concentrações afluentes, efluente e remoção de DQO no EGSB-10.

Fase	TDH (h)	TCO (kgDQO m ⁻³ d ⁻¹)	DQO _{aflu} (g DQO L ⁻¹)	DQO _{eflu} (g DQO L ⁻¹)	Remoção (%)
1	24	10,0	15,79 ± 1,63 ⁽⁸⁾	12,32 ± 1,41 ⁽⁸⁾	8,59 ± 6,01 ⁽⁸⁾
2	16	15,0	14,15 ± 1,37 ⁽⁸⁾	11,44 ± 0,84 ⁽⁸⁾	19,29 ± 6,37 ⁽⁸⁾
3	8	30,0	11,79 ± 1,17 ⁽⁸⁾	10,89 ± 0,94 ⁽⁸⁾	7,73 ± 6,92 ⁽⁸⁾
4	4	60,0	12,73 ± 0,53 ⁽⁸⁾	11,19 ± 0,99 ⁽⁸⁾	10,27 ± 10,11 ⁽⁸⁾
5	2	120,0	15,47 ± 2,49 ⁽⁸⁾	10,51 ± 2,02 ⁽⁸⁾	25,24 ± 9,04 ⁽⁸⁾
6	1	240,0	16,26 ± 2,08 ⁽⁸⁾	10,86 ± 0,95 ⁽⁸⁾	26,28 ± 14,38 ⁽⁸⁾

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

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

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

Tabela 29 - Concentrações afluentes, efluente e remoção de DQO no EGSB-15.

Fase	TDH (h)	TCO (kgDQO m ⁻³ d ⁻¹)	DQO _{aflu} (g DQO L ⁻¹)	DQO _{eflu} (g DQO L ⁻¹)	Remoção (%)
1	24	15,0	24,24 ± 4,35 ⁽⁸⁾	18,81 ± 2,66 ⁽⁸⁾	8,90 ± 5,16 ⁽⁸⁾
2	16	22,5	20,12 ± 2,34 ⁽⁸⁾	17,65 ± 2,34 ⁽⁸⁾	11,72 ± 7,85 ⁽⁸⁾
3	8	45,0	19,32 ± 1,53 ⁽⁸⁾	16,42 ± 1,25 ⁽⁸⁾	14,61 ± 8,44 ⁽⁸⁾
4	4	90,0	19,63 ± 1,22 ⁽⁸⁾	16,38 ± 1,73 ⁽⁸⁾	16,42 ± 8,86 ⁽⁸⁾
5	2	180,0	17,27 ± 1,41 ⁽⁸⁾	18,09 ± 1,08 ⁽⁸⁾	7,44 ± 5,78 ⁽⁸⁾
6	1	360,0	19,52 ± 2,45 ⁽⁷⁾	18,72 ± 1,11 ⁽⁷⁾	3,04 ± 3,27 ⁽⁷⁾

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

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

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

Figura 24 - Boxplot das remoções de DQO no EGSB-5.

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

Figura 25 - Boxplot das remoções de DQO no EGSB-10.

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

Figura 26 - Boxplot das remoções de DQO no EGSB-15.

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

Resultados semelhantes aos desta pesquisa relacionados à conversão de DQO foram obtidos por Han et al. (2010) na operação de CSTR alimentado com melaço de beterraba (10 g L^{-1}). Os autores alcançaram valores de 13% de conversão média de DQO. Han et al., (2012a) relataram também média de 13,25% de conversão de DQO em CSTR com biomassa imobilizada também alimentado com melaço de beterraba ($2 - 8 \text{ g L}^{-1}$).

O somatório da DQO equivalente dos metabólitos solúveis, do carboidrato remanescente e dos sólidos suspensos voláteis (SSV) menos a DQO medida para os reatores EGSB-5, EGSB-10 e EGSB-15 estão dispostos nas Tabelas 30, 31 e 32, respectivamente. Na maioria das fases operacionais dos reatores houve diferença percentual significativa, com diferença positiva, o que pode ser atribuído a metabólitos no efluente que não foram detectados.

Tabela 30 - Somatório da DQO equivalente dos metabólitos solúveis, do carboidrato remanescente e dos sólidos suspensos voláteis (SSV) menos a DQO medida para o EGSB-5.

Fase	DQO (g L ⁻¹)											Carboidrato _{efluente}	SSV	DQO _{total}	DQO _{efluente}	Dif. (%)
	HPr	HAc	HMa	HF	HSu	HisoBu	HBu	HVa	HCa	HLa	EtOH					
1	1,77	0,69	0,00	0,00	0,00	0,06	0,72	0,65	0,00	0,00	0,00	0,1	0,406	4,4	6,54	33,2
2	0,61	0,70	0,00	0,00	0,00	0,05	0,72	0,46	0,51	0,00	0,00	0,3	0,499	3,9	6,09	36,2
3	0,67	1,13	0,00	0,00	0,00	0,06	1,30	0,28	0,26	0,03	0,00	0,3	0,389	4,4	5,76	23,0
4	0,75	0,83	0,00	0,01	0,00	0,01	1,64	0,20	0,33	0,02	0,08	0,3	0,433	4,6	6,95	33,7
5	0,81	0,78	0,00	0,00	0,01	0,00	1,46	0,15	0,15	0,01	0,00	0,4	0,607	4,3	6,83	36,5
6	1,30	0,92	0,00	0,00	0,04	0,00	1,68	0,16	0,14	0,11	0,00	0,4	0,634	5,4	6,23	12,7

HPr: ácido propiônico; HAc: ácido acético; HMa: ácido málico; HF: ácido fórmico; HSu: ácido succínico; HIsobu: ácido isobutírico; HBu: ácido butírico; HVa: ácido valérico; SSV: sólidos suspensos voláteis.

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

Tabela 31 - Somatório da DQO equivalente dos metabólitos solúveis, do carboidrato remanescente e dos sólidos suspensos voláteis (SSV) menos a DQO medida para o EGSB-10.

DQO (g L ⁻¹)																
Fase	HPr	HAc	HMa	HF	HSu	HisoBu	HBu	HVa	HCa	HLa	EtOH	Carboidrato _{efluente}	SSV	DQO _{total}	DQO _{efluente}	Dif. (%)
1	1,61	0,41	0,00	0,00	0,00	0,01	2,53	0,01	0,26	0,04	2,13	0,45	0,57	8,03	12,32	34,8
2	2,07	0,96	0,00	0,00	0,00	0,17	2,51	0,01	0,92	0,00	0,11	0,6	0,59	7,89	11,44	31,1
3	1,97	1,48	0,00	0,00	0,00	0,00	1,57	0,01	0,01	0,00	3,07	0,5	0,71	9,31	10,89	14,4
4	1,30	1,17	0,00	0,00	0,00	0,06	3,45	0,01	0,22	0,00	0,30	0,4	0,87	7,45	11,19	30,4
5	0,84	0,72	0,00	0,00	0,04	0,00	2,94	0,07	0,14	0,00	0,60	0,6	0,84	6,61	10,51	35,5
6	1,30	0,96	0,00	0,04	0,15	0,00	3,23	0,00	0,00	0,00	2,76	1,2	0,76	10,42	10,86	4,0

HPr: ácido propiônico; HAc: ácido acético; HMa: ácido málico; HF: ácido fórmico; HSu: ácido succínico; HisoBu: ácido isobutírico; HBu: ácido butírico; HVa: ácido valérico; SSV: sólidos suspensos voláteis.

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

Tabela 32 - Somatório da DQO equivalente dos metabólitos solúveis, do carboidrato remanescente e dos sólidos suspensos voláteis (SSV) menos a DQO medida para o EGSB-15.

DQO (g L ⁻¹)																
Fase	HPr	HAc	HMa	HF	HSu	HisoBu	HBu	HVa	HCa	HLa	EtOH	Carboidrato _{efluente}	SSV	DQO _{total}	DQO _{efluente}	Dif. (%)
1	5,49	0,41	0,07	0,02	0,01	0,00	3,74	0,31	0,03	1,10	0,00	0,9	0,73	12,84	18,81	31,7
2	3,69	0,65	0,02	0,01	0,09	0,00	3,44	0,11	0,00	3,78	0,07	2,5	0,99	15,39	17,65	12,8
3	4,49	0,99	0,00	0,03	0,00	0,00	5,68	0,10	0,00	1,98	0,23	1,4	0,85	15,79	16,42	3,9
4	0,43	0,37	0,00	0,02	0,24	0,00	3,53	0,10	0,00	3,98	0,00	1,5	1,05	11,21	16,38	31,6
5	0,62	1,87	0,00	0,03	0,14	0,00	3,64	0,00	0,00	10,68	0,00	1,5	0,75	19,19	18,09	-6,1
6	0,44	1,40	0,00	0,00	0,22	0,00	3,32	0,00	0,00	7,60	0,00	4,7	0,83	17,65	18,72	5,7

HPr: ácido propiônico; HAc: ácido acético; HMa: ácido málico; HF: ácido fórmico; HSu: ácido succínico; HisoBu: ácido isobutírico; HBu: ácido butírico; HVa: ácido valérico; SSV: sólidos suspensos voláteis.

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

5.6.2 Influência do pH

As Tabelas 33, 34 e 35 apresentam os valores médios de pH afluente e efluente referentes ao EGSB-5, EGSB-10 e EGSB-15, respectivamente. O pH afluente de todos os reatores manteve-se em torno da neutralidade ($\sim 7,0$), enquanto que o pH efluente se manteve entre 4,4 e 4,5 no EGSB-5 e EGSB-15 e entre 4,3 e 4,7 no EGSB-10. O pH, no geral, manteve-se na faixa de operação estabelecida para a pesquisa e não apresentou grandes variações.

Tabela 33 - Valores médios de pH afluente e efluente para o EGSB-5.

Fase	TDH (h)	TCO (kgDQO m ⁻³ d ⁻¹)	pH _{afluente}	pH _{efluente}
1	24	5,0	7,7 $\pm$ 0,2 ⁽⁸⁾	4,5 $\pm$ 0,1 ⁽⁸⁾
2	16	7,5	7,3 $\pm$ 0,3 ⁽⁸⁾	4,5 $\pm$ 0,1 ⁽⁸⁾
3	8	15,0	7,2 $\pm$ 0,1 ⁽⁸⁾	4,5 $\pm$ 0,1 ⁽⁸⁾
4	4	30,0	7,2 $\pm$ 0,1 ⁽⁸⁾	4,4 $\pm$ 0,1 ⁽⁸⁾
5	2	60,0	7,2 $\pm$ 0,2 ⁽⁸⁾	4,4 $\pm$ 0,1 ⁽⁸⁾
6	1	120,0	7,3 $\pm$ 0,1 ⁽⁸⁾	4,4 $\pm$ 0,2 ⁽⁸⁾

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

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

Tabela 34 - Valores médios de pH afluente e efluente para o EGSB-10.

Fase	TDH (h)	TCO (kgDQO m ⁻³ d ⁻¹)	pH _{afluente}	pH _{efluente}
1	24	10,0	7,5 $\pm$ 0,1 ⁽⁸⁾	4,6 $\pm$ 0,5 ⁽⁸⁾
2	16	15,0	7,4 $\pm$ 0,3 ⁽⁸⁾	4,7 $\pm$ 0,2 ⁽⁸⁾
3	8	30,0	7,4 $\pm$ 0,1 ⁽⁸⁾	4,3 $\pm$ 0,3 ⁽⁸⁾
4	4	60,0	7,5 $\pm$ 0,3 ⁽⁸⁾	4,5 $\pm$ 0,1 ⁽⁸⁾
5	2	120,0	7,4 $\pm$ 0,3 ⁽⁸⁾	4,4 $\pm$ 0,2 ⁽⁸⁾
6	1	240,0	7,4 $\pm$ 0,1 ⁽⁸⁾	4,3 $\pm$ 0,4 ⁽⁸⁾

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

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

Tabela 35 - Valores médios de pH afluyente e efluente para o EGSB-15.

Fase	TDH (h)	TCO (kgDQO m ⁻³ d ⁻¹)	pH _{afluyente}	pH _{efluente}
1	24	15,0	7,3 ± 0,2 ⁽⁸⁾	4,5 ± 0,1 ⁽⁸⁾
2	16	22,5	7,4 ± 0,3 ⁽⁸⁾	4,5 ± 0,2 ⁽⁸⁾
3	8	45,0	7,3 ± 0,1 ⁽⁸⁾	4,5 ± 0,1 ⁽⁸⁾
4	4	90,0	7,4 ± 0,3 ⁽⁸⁾	4,5 ± 0,5 ⁽⁸⁾
5	2	180,0	7,3 ± 0,1 ⁽⁸⁾	4,4 ± 0,2 ⁽⁸⁾
6	1	360,0	7,0 ± 0,2 ⁽⁸⁾	4,5 ± 0,1 ⁽⁸⁾

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

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

O pH tem efeito relevante no metabolismo dos microrganismos, o que pode afetar o consumo de substrato, a atividade enzimática, o funcionamento das bactérias responsáveis pela produção de H₂ e as vias de fermentação (TEMUDO et al., 2008). Pode, ainda, alterar a toxicidade de substâncias nocivas aos microrganismos, principalmente, quando se trata de águas residuárias.

O pH ótimo de produção de H₂ pode variar de acordo com as comunidades microbianas, juntamente com outras condições de operação (TCO, TDH, temperatura). Fang e Liu (2002) afirmaram que o pH ótimo de produção de H₂ fica em torno de 5,5, e Khanal et al. (2004) em testes em batelada também relataram pH ideal entre 5,5 – 5,7. Neste estudo, a produção de H₂ ocorreu em pH ~ 4,5, semelhante ao que ocorreu nos trabalhos de Li et al. (2007), Ren et al. (2012), Zhu et al. (2013) e Tunçay et al. (2017).

Ren et al. (2006) analisaram seus trabalhos em um estudo de revisão e concluíram que pH entre 4,0 – 4,5 é ideal para produção de H₂ utilizando melaço como substrato. Além disso, essa faixa de pH dificulta a fermentação do ácido propiônico, uma vez que essa é dominante na faixa de pH 5,0 - 6,0 (REN et al., 2006; WANG et al., 2006; Guo et al., 2008; Ren et al., 2010). Além disso, sistemas com biomassa imobilizada são capazes de produzir H₂ em pH inferior quando comparado com sistemas de biomassa suspensa (HAN et al., 2012b).

O pH baixo de operação desta pesquisa, aliado à reação de homoacetogênese, pode ter influenciado a ausência de hidrogênio no EGSB-5. pHs baixos tornam o ambiente estressante para o crescimento bacteriano, que, nessas condições, necessitam de quantidades maiores de substrato orgânico para seu crescimento.

O pH baixo também influencia na forma que os intermediários químicos estão presentes no meio. Em pH de ~ 4,5, a maioria dos ácidos está presente na sua forma não dissociada, o

que pode causar efeitos de toxicidade quando presentes em concentrações elevadas. As formas não dissociadas dos ácidos podem ultrapassar a membrana celular, colapsando o gradiente de pH da membrana e causando a morte da célula (DURRE, 2005).

5.6.3 Sólidos suspensos

Nas Tabelas 36, 37 e 38 estão apresentados os valores de sólidos suspensos totais (SST), que se dividem em sólidos suspensos fixo (SSF), referentes pelo conteúdo inorgânico presente no efluente, e sólidos suspensos voláteis (SSV), referentes ao conteúdo orgânico presente no efluente do EGSB-5, EGSB-10 e EGSB-15, respectivamente.

Os SSV tiveram valores relativamente constantes ao longo da operação dos três reatores, variando de $0,290 \pm 0,169 \text{ g L}^{-1}$ a $0,473 \pm 0,126 \text{ g L}^{-1}$ no EGSB-5, $0,427 \pm 0,072 \text{ g L}^{-1}$ a $0,565 \pm 0,133 \text{ g L}^{-1}$ no EGSB-10 e de $0,543 \pm 0,123 \text{ g L}^{-1}$ a $0,780 \pm 0,233 \text{ g L}^{-1}$ no EGSB-15. Dessa forma, pode-se afirmar que não houve perdas significativas de biomassa entre as fases de operação dos reatores, o que indica que o arraste da biomassa em função do aumento da velocidade ascensional não ocorreu.

Tabela 36 - Valores médios de SST, SSF e SSV no efluente do EGSB-5.

Fase	TDH (h)	TCO (kgDQO m ⁻³ d ⁻¹)	SST (g L ⁻¹)	SSF (g L ⁻¹)	SSV (g L ⁻¹)	SSV' (%)
1	24	5,0	$0,38 \pm 0,10^{(8)}$	$0,00 \pm 0,08^{(8)}$	$0,30 \pm 0,09^{(8)}$	$89,93 \pm 17,26^{(8)}$
2	16	7,5	$0,42 \pm 0,01^{(8)}$	$0,04 \pm 0,01^{(8)}$	$0,37 \pm 0,09^{(8)}$	$91,25 \pm 4,68^{(8)}$
3	8	15,0	$0,33 \pm 0,17^{(8)}$	$0,04 \pm 0,01^{(8)}$	$0,29 \pm 0,16^{(8)}$	$85,70 \pm 12,21^{(8)}$
4	4	30,0	$0,40 \pm 0,16^{(8)}$	$0,07 \pm 0,04^{(8)}$	$0,32 \pm 0,14^{(8)}$	$82,42 \pm 7,06^{(8)}$
5	2	60,0	$0,52 \pm 0,24^{(8)}$	$0,04 \pm 0,06^{(8)}$	$0,45 \pm 0,19^{(8)}$	$90,58 \pm 6,82^{(8)}$
6	1	120,0	$0,49 \pm 0,13^{(8)}$	$0,03 \pm 0,02^{(8)}$	$0,47 \pm 0,12^{(8)}$	$94,05 \pm 3,73^{(8)}$

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

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

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

Tabela 37 - Valores médios de SST, SSF e SSV no efluente do EGSB-10.

Fase	TDH (h)	TCO (kgDQO m ⁻³ d ⁻¹)	SST (g L ⁻¹)	SSF (g L ⁻¹)	SSV (g L ⁻¹)	SSV' (%)
1	24	10,0	0,43 ± 0,07 ⁽⁸⁾	0,00 ± 0,00 ⁽⁸⁾	0,42 ± 0,07 ⁽⁸⁾	94,89 ± 7,94 ⁽⁸⁾
2	16	15,0	0,44 ± 0,14 ⁽⁸⁾	0,00 ± 0,00 ⁽⁸⁾	0,44 ± 0,14 ⁽⁸⁾	99,40 ± 1,45 ⁽⁸⁾
3	8	30,0	0,49 ± 0,31 ⁽⁸⁾	0,06 ± 0,04 ⁽⁸⁾	0,53 ± 0,14 ⁽⁸⁾	88,74 ± 5,08 ⁽⁸⁾
4	4	60,0	0,40 ± 0,16 ⁽⁸⁾	0,00 ± 0,00 ⁽⁸⁾	0,65 ± 0,14 ⁽⁸⁾	97,38 ± 3,39 ⁽⁸⁾
5	2	120,0	0,56 ± 0,14 ⁽⁸⁾	0,06 ± 0,04 ⁽⁸⁾	0,63 ± 0,11 ⁽⁸⁾	92,18 ± 7,33 ⁽⁸⁾
6	1	240,0	0,62 ± 0,15 ⁽⁸⁾	0,07 ± 0,02 ⁽⁸⁾	0,56 ± 0,13 ⁽⁸⁾	89,37 ± 2,14 ⁽⁸⁾

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

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

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

Tabela 38 - Valores médios de SST, SSF e SSV no efluente do EGSB-15.

Fase	TDH (h)	TCO (kgDQO m ⁻³ d ⁻¹)	SST (g L ⁻¹)	SSF (g L ⁻¹)	SSV (g L ⁻¹)	SSV' (%)
1	24	15,0	0,59 ± 0,15 ⁽⁸⁾	0,04 ± 0,09 ⁽⁸⁾	0,54 ± 0,12 ⁽⁸⁾	90,92 ± 10,18 ⁽⁸⁾
2	16	22,5	0,81 ± 0,12 ⁽⁸⁾	0,05 ± 0,06 ⁽⁸⁾	0,74 ± 0,10 ⁽⁸⁾	91,68 ± 6,90 ⁽⁸⁾
3	8	45,0	0,73 ± 0,21 ⁽⁸⁾	0,10 ± 0,03 ⁽⁸⁾	0,64 ± 0,21 ⁽⁸⁾	86,37 ± 6,07 ⁽⁸⁾
4	4	90,0	0,87 ± 0,25 ⁽⁸⁾	0,09 ± 0,06 ⁽⁸⁾	0,78 ± 0,23 ⁽⁸⁾	87,16 ± 7,17 ⁽⁸⁾
5	2	180,0	0,68 ± 0,15 ⁽⁸⁾	0,09 ± 0,04 ⁽⁸⁾	0,56 ± 0,12 ⁽⁸⁾	86,00 ± 4,44 ⁽⁸⁾
6	1	360,0	0,72 ± 0,13 ⁽⁸⁾	0,12 ± 0,02 ⁽⁸⁾	0,62 ± 0,14 ⁽⁸⁾	82,88 ± 5,00 ⁽⁸⁾

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

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

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

6 CONCLUSÕES

Os reatores, apesar de terem tido condições de operação semelhantes, obtiveram resultados distintos de produção de hidrogênio e metabólitos. A partir dos resultados obtidos nesta pesquisa, pôde-se concluir que:

- i. No EGSB-5, a redução do TDH não resultou na produção de hidrogênio, que foi consumido principalmente para produção de ácido acético (homoacetogênese);
- ii. No EGSB-10, houve produção de hidrogênio somente no TDH de 1 h, com média de $3,55 \pm 0,86 \text{ L d}^{-1} \text{ L}^{-1}$, originado principalmente a partir da produção de ácido butírico e ácido láctico;
- iii. No EGSB-15, verificou-se que a redução do TDH foi favorável à produção de hidrogênio, obtendo a PVH máxima da pesquisa, $13,92 \text{ L d}^{-1} \text{ L}^{-1}$, no TDH de 1 h. A produção de hidrogênio ocorreu principalmente via ácido láctico neste reator. A presença de ácido láctico desempenhou um papel duplo, uma vez que esteve associada tanto à produção de hidrogênio (ácido butírico e produção de hidrogênio) quanto a não produção de hidrogênio (produção de ácido propiônico e ácido acético). Foi concluído ainda que a presença de ácido láctico afetou negativamente os rendimentos de hidrogênio (máximo de $0,25 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ hexose}$);
- iv. O melaço da cana-de-açúcar pode ser utilizado como substrato para produção de hidrogênio em reatores EGSB com TDH a partir de 2 h e TCO acima de $180 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- i. Utilização do efluente do EGSB-5 como alimentação em reatores metanogênicos, devido à presença de ácido acético e ácido butírico como principais metabólitos;
- ii. Estudos microbiológicos para compreensão de como e quais microrganismos atuaram no processo;
- iii. Co-digestão do melaço com outros substratos ricos em lactose, como o soro de leite, para melhor compreensão da via do lactato.
- iv. Estudos mais aprofundados sobre como a homoacetogênese afeta o processo de produção de produção de hidrogênio bem como alternativas para sua inibição;

REFERÊNCIAS

- ABD-ALLA, M. H.; BAGY, M. M. K.; MORSY, F. M.; HASSAN, E. A. Enhancement of biodiesel, hydrogen and methane generation from molasses by *Cunninghamella echinulata* and anaerobic bacteria through sequential three-stage fermentation. **Energy**, v. 78, p. 543–554, 2014.
- ADAMBERG K, KASK S, LAHT TM, PAALME T. The effect of temperature and pH on the growth of lactic acid bacteria: a pH-auxostat study. **International Journal of Food Microbiology**, v. 85, p. 171 – 183, 2003
- ADAMBERG, K.; KASK, S.; LAHT, T. M.; PAALME, T. The effect of temperature and pH on the growth of lactic acid bacteria: A pH-auxostat study. **International Journal of Food Microbiology**, v. 85, n. 1-2, p. 171–183, 2003.
- ALBANEZ, R.; LOVATO, G.; ZAIAT, M.; RATUSZNEI, S. M.; RODRIGUES, J. A. D. Optimization, metabolic pathways modeling and scale-up estimative of an AnSBBR applied to biohydrogen production by co-digestion of vinasse and molasses. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 45, p. 20473–20484, 2016.
- ANGENENT, L. T.; KARIM, K.; AL-DAHMAN, M. H.; WRENN, B. A.; DOMÍGUEZ-ESPINOSA, R. Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. **Trends in Biotechnology**, v. 22, n. 9, p. 477–485, 2004.
- ANTONOPOULOU, G.; GAVALA, H. N.; SKIADAS, I. V.; ANGELOPOULOS, K.; LYBERATOS, G. Biofuels generation from sweet sorghum: Fermentative hydrogen production and anaerobic digestion of the remaining biomass. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 1, p. 110–119, 2008.
- AROOJ, M. F.; HAN, S. K.; KIM, S. H.; KIM, D. H.; SHIN, H. S. Continuous biohydrogen production in a CSTR using starch as a substrate. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 13, p. 3289–3294, 2008.
- BAGHCHEHSARAEI, B.; NAKHLA, G.; KARAMANEV, D.; MARGARITIS, A. Effect of extrinsic lactic acid on fermentative hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 6, p. 2573–2579, 2009.
- BALAT, M.; BALAT, H.; ÖZ, C. Progress in bioethanol processing. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 34, n. 5, p. 551–573, 2008.
- BALAT, M.; BALAT, H.; ÖZ, C. Progress in bioethanol processing. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 34, n. 5, p. 551–573, 2008.
- BARROS, A. R.; SILVA, E. L. Hydrogen and ethanol production in anaerobic fluidized bed reactors: Performance evaluation for three support materials under different operating conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 61, p. 59–65, 2012.

BESHAY, U.; MOREIRA, M. Production of alkaline protease with *Teredinobacter turnirae* in controlled fed-batch fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 27, p. 1457 – 1460, 2005.

BNDES, CGEE. **Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável**. 1 ed. Rio de Janeiro, BNDES, 2008.

BRAGA, A.F.M.; FERRAZ JUNIOR, A.D.N.; ZAIAT, M. Thermophilic biohydrogen production using a UASB reactor: performance during long-term operation. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 91, n.4, p. 967-976, 2015.

CALLI, B.; SCHOENMAEKERS, K.; VANBROEKHOVEN, K.; DIELS, L. Dark fermentative H₂ production from xylose and lactose-Effects of on-line pH control. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 2, p. 522–530, 2008.

CAPPELLETTI, M.; BUCCHI, G.; DE SOUSA MENDES, J.; ALBERINI, A.; FEDI, S.; BERTIN, L.; FRASCARI, D. Biohydrogen production from glucose, molasses and cheese whey by suspended and attached cells of four hyperthermophilic *Thermotoga* strains. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 87, n. 9, p. 1291–1301, 2012.

CAPPELLETTI, M.; BUCCHI, G.; MENDES, J.S.; ALBERINI, A.; FEDI, S.; BERTIN, L.; FRASCARI, D. Biohydrogen production from glucose, molasses and cheese whey by suspended and attached cells of four hyperthermophilic *Thermotoga* strains. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.87, p.1291-1301, 2012.

CHANG J. S.; LEE K. S.; LIN P. J. Biohydrogen production with fixed-bed bioreactors. **International Journal Hydrogen Energy**, v. 27, p. 1167 – 74, 2002.

CHANG, F. Y.; LIN, C. Y. Biohydrogen production using an up-flow anaerobic sludge blanket reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 29, n. 1, p. 33–39, 2004.

CHANG, S.; LI, J.; LIU, F. Continuous biohydrogen production from diluted molasses in an anaerobic contact reactor. **Frontiers of Environmental Science and Engineering in China**, v. 5, n. 1, p. 140–148, 2011.

CHENG, H. H.; WHANG, L. M.; WU, C. W.; CHUNG, M. C. A two-stage bioprocess for hydrogen and methane production from rice straw bioethanol residues. **Bioresource Technology**, v. 113, p. 23–29, 2012.

CHOJNACKA, A., SZCZEZSNY, P., BŁASZCZYK, M.K., ZIELENKIEWICZ, U., DETMAN, A., SALAMON, A. AND SIKORA, A. (2015) Noteworthy facts about a methane-producing microbial community processing acidic effluent from sugar beet molasses fermentation. *PLoS ONE* 10, e0128008.

COHEN, A.; VAN GEMERT, J. M.; ZOETEMEYER, R. J.; AND BREURE, A. M. Main characteristics and stoichiometric specs of acidogenesis of soluble carbohydrate containing wastewater. **Process Biochemistry**. v. 19, 228, 1984.

COLLET, C., ADLER, N., SCHWITZGUÉBEL, J.P., PÉRINGER, P. Hydrogen Production by *Clostridium thermolacticum* during Continuous Fermentation of Lactose, **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 29, p. 1479-1485, 2004.

CONAB. (Org.). **Monitoramento agrícola – Cana-de-açúcar**. 3. ed. Brasília, 2017. 81 p.

DAS, D. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 26, n. 1, p. 13–28, 2001.

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

DETMAN, A.; CHOJNACKA, A.; BŁASZCZYK, M.; KAŻMIERCZAK, W.; PIOTROWSKI, J.; SIKORA, A. Biohydrogen and biomethane (Biogas) production in the consecutive stages of anaerobic digestion of molasses. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 26, n. 3, p. 1023–1029, 2017.

DINSDALE, R. M., F. R. HAWKES AND D. L. HAWKES. Anaerobic digestion of short chain organic acids in an expanded granular sludge bed reactor. **Water Research**, 2000.

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

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, p.350-356, 1956.

DURRE P. Sporulation in Clostridia (genetics). In: Durre P, editor. Handbook on clostridia. Boca Raton, FL: Taylor and Francis; 2005. p. 659–69, 2005.

EATON, A.D. APHA/AWWA/WEF. Standard methods for the examination of water and wastewater. 21^a ed. Washington: American Public Health Association. 1082 p, 2005.

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

ENSINAS, A. V.; MODESTO, M.; NEBRA, S. A.; SERRA, L. Reduction of irreversibility generation in sugar and ethanol production from sugarcane. **Energy**, v. 34, n. 5, p. 680–688, 2009.

FANG, C., K. BOE AND I. ANGELIDAKI. Biogas production from potato-juice, a byproduct from potato-starch processing, in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) and expanded granular sludge bed (EGSB) reactors. **Bioresource Technology**, 2011.

FANG, H. H. P.; LIU, H. Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. **Bioresource Technology**, v. 82, n. 1, p. 87–93, 2002.

FERREIRA, T. B. **Produção de hidrogênio e metabólitos solúveis a partir de subprodutos da indústria sucroalcooleira em reator anaeróbio de leito fluidificado termofílico**. 2016. 148p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

FONTES LIMA, D. M.; MOREIRA, W. K.; ZAIAT, M. Comparison of the use of sucrose and glucose as a substrate for hydrogen production in an upflow anaerobic fixed-bed reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 35, p. 15074–15083, 2013.

FUESS, L. T.; FERRAZ, A. D. N.; MACHADO, C. B.; ZAIAT, M. Temporal dynamics and metabolic correlation between lactate-producing and hydrogen-producing bacteria in sugarcane vinasse dark fermentation: The key role of lactate. **Bioresource Technology**, v. 247, n. July 2017, p. 426–433, 2018.

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

GLINWONG, C.; LERTSRIWONG, S.; CHULALAKSANANUKUL, W. Hydrogen producer isolated from agricultural wastewater and molasses. **Energy Procedia**, v. 138, p. 140–144, 2017.

GOMES, B. C.; ROSA, P. R. F.; ETCHEBEHERE, C.; SILVA, E. L.; AMÂNCIOVARESCHE, M. B. Role of homo-and heterofermentative lactic acid bacteria on hydrogen-producing reactors operated with cheese whey wastewater. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, n. 28, p. 8650–8660, 2015.

GOMES, S. D.; FUESS, L. T.; MAÑUNGA, T.; FEITOSA DE LIMA GOMES, P. C.; ZAIAT, M. Bacteriocins of lactic acid bacteria as a hindering factor for biohydrogen production from cassava flour wastewater in a continuous multiple tube reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 19, p. 8120–8131, 2016.

GROOTSCHOLTEN, T. I. M.; STEINBUSCH, K. J. J.; HAMELERS, H. V. M.; BUISMAN, C. J. N. Chain elongation of acetate and ethanol in an upflow anaerobic filter for high rate MCFA production. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 440–445, 2013.

GUO, W. Q.; DING, J.; CAO, G. L.; CHEN, C.; ZHOU, X. J.; REN, N. Q. Accelerated startup of hydrogen production expanded granular sludge bed with l-Cysteine supplementation. **Energy**, v. 60, p. 94–98, 2013.

GUO, W. Q.; REN, N. Q.; CHEN, Z. B.; LIU, B. F.; WANG, X. J.; XIANG, W. S.; DING, J. Simultaneous biohydrogen production and starch wastewater treatment in an acidogenic expanded granular sludge bed reactor by mixed culture for long-term operation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 24, p. 7397–7404, 2008a.

GUO, W. Q.; REN, N. Q.; WANG, X. J.; XIANG, W. S.; MENG, Z. H.; DING, J.; QU, Y. Y.; ZHANG, L. S. Biohydrogen production from ethanol-type fermentation of molasses in an expanded granular sludge bed (EGSB) reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 19, p. 4981–4988, 2008b.

HAN, W.; CHEN, H.; JIAO, A.; WANG, Z.; LI, Y.; REN, N. Biological fermentative hydrogen and ethanol production using continuous stirred tank reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 1, p. 843–847, 2011.

HAN, W.; CHEN, H.; YAO, X.; LI, Y.; YANG, C. Biohydrogen production with anaerobic sludge immobilized by granular activated carbon in a continuous stirred-tank. **Journal of Forestry Research**, v.21, n.4, p.509-513, 2010.

HAN, W.; LIU, Z.; FANG, J.; HUANG, J.; ZHAO, H.; LI, Y. Techno-economic analysis of dark fermentative hydrogen production from molasses in a continuous mixed immobilized sludge reactor. **Journal of Cleaner Production**, v. 127, p. 567–572, 2016.

HAN, W.; WANG, B.; ZHOU, Y.; WANG, D. X.; WANG, Y.; YUE, L. R.; LI, Y. F.; REN, N. Q. Fermentative hydrogen production from molasses wastewater in a continuous mixed immobilized sludge reactor. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 219–223, 2012a.

HAN, W.; WANG, BING.; XIAOYE, L.; CHUNYU, L.; LIRAN, Y.; YONGFENG, L. Fermentative Hydrogen Production from Molasses in an Activated Sludge Immobilized Bioreactor. **International Journal of Energy Engineering**, v. 2, n. 1, p. 28–31, 2012b.

HAWKES, F. R.; DINSDALE, R.; HAWKES, D. L.; HUSSY, I. Sustainable fermentative hydrogen production: Challenges for process optimisation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 27, n. 11-12, p. 1339–1347, 2002.

INFANTES, D.; GONZÁLEZ DEL CAMPO, A.; VILLASEÑOR, J.; FERNÁNDEZ, F. J. Kinetic model and study of the influence of pH, temperature and undissociated acids on acidogenic fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 66, p. 66–72, 2012.

KAPDAN, I. K.; KARGI, F. Bio-hydrogen production from waste materials. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 5, p. 569–582, 2006.

KHANAL, S. K.; CHEN, W. H.; LI, L.; SUNG, S. Biological hydrogen production: Effects of pH and intermediate products. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 29, n. 11, p. 1123–1131, 2004.

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

KIM, T. H.; LEE, Y.; CHANG, K. H.; HWANG, S. J. Effects of initial lactic acid concentration, HRTs, and OLRs on bio-hydrogen production from lactate-type fermentation. **Bioresource Technology**, v. 103, n. 1, p. 136–141, 2012.

KIRTAY, E. Recent advances in production of hydrogen from biomass. **Energy Conversion and Management**, v. 52, n. 4, p. 1778–1789, 2011.

KRAEMER, J. T.; BAGLEY, D. M. Measurement of H₂ consumption and its role in continuous fermentative hydrogen production. **Water Science and Technology**, v. 57, n. 5, p. 681–685, 2008.

KUMAR N, DAS D. Continuo us hydrogen production by immobili zed Enterobacter cloacae IIT-BT08 using lignocellulosic materials as solid matrices. **Enzyme Microbiol**, v. 29, p. 280 – 7, 2001.

- LAM, M. K.; LEE, K. T. Renewable and sustainable bionergies production from palm oil mil effluente (POME): Win-win strategies toward better environmental protection. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 124 – 141, 2011.
- LAY, C. H.; WU, J. H.; HSIAO, C. L.; CHANG, J. J.; CHEN, C. C.; LIN, C. Y. Biohydrogen production from soluble condensed molasses fermentation using anaerobic fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, n. 24, p. 13445–13451, 2010.
- LEE, K. S.; HSU, Y. F.; LO, Y. C.; LIN, P. J.; LIN, C. Y.; CHANG, J. S. Exploring optimal environmental factors for fermentative hydrogen production from starch using mixed anaerobic microflora. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 5, p. 1565–1572, 2008.
- LEVIN, D. B.; PITT, L.; LOVE, M. Biohydrogen production: Prospects and limitations to practical application. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 29, n. 2, p. 173–185, 2004.
- LI, J.; AI, B.; REN, N. Effect of initial sludge loading rate on the formation of ethanol type fermentation for hydrogen production in a continuous stirred-tank reactor. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, v.32, n.4, p.1271-1279, 2013.
- 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**, v. 32, n. 15, p. 3274–3283, 2007.
- LI, J.; REN, N. The operational controlling strategy about the optimal fermentation type of acidogenic phase. **Environment Science**, v. 18, p. 398 – 402, 1998.
- LI, J.; ZHENG, G.; HE, J.; CHANG, S.; QIN, Z. Hydrogen-producing capability of anaerobic activated sludge in three types of fermentations in a continuous stirred-tank reactor, **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 573 – 577, 2009.
- LIMA, D. M. F.; MOREIRA, W. K.; ZAIAT, M. Comparison of the use of sucrose and glucose as a substrate for hydrogen production in an upflow anaerobic fixed-bed reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 35, p. 15074–15083, 2013.
- LIN C. Y.; LEE C. Y.; TSENG I.C.; SHAILO I.Z. Biohydrogen production from sucrose using base-enriched anaerobic mixed microflora. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 915 – 9, 2006.
- LIU, J., J. HU, J. ZHONG, J. LUO, A. ZHAO, F. LIU, R. HONG, G. QIAN AND Z. P. XU. The effect of calcium on the treatment of fresh leachate in an expanded granular sludge bed bioreactor. **Bioresource Technology**, 2011.
- LIU, Q.; ZHANG, X.; YU, L.; ZHAO, A.; TAI, J.; LIU, J.; QIAN, G.; XU, Z. P. Fermentative hydrogen production from fresh leachate in batch and continuous bioreactors. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 9, p. 5411–5417, 2010.
- LUO, G.; KARAKASHEV, D.; XIE, L.; ZHOU, Q.; ANGELIDAKI, I. Long-term effect of inoculum pretreatment on fermentative hydrogen production by repeated batch cultivations: Homoacetogenesis and methanogenesis as competitors to hydrogen production. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 108, n. 8, p. 1816–1827, 2011.

MANISH, S.; BANERJEE, R. Comparison of biohydrogen production processes. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 1, p. 279–286, 2008.

MARIAKAKIS, I.; MEYER, C.; STEINMETZ, H. Fermentative Hydrogen Production by Molasses: Effect of Hydraulic Retention Time, Organic Loading Rate and Microbial Dynamics. **Hydrogen Energy Challenges and Perspectives**, 2012.

MARTINEZ, F. A. C.; BALCIUNAS, E. M.; SALGADO, J. M.; DOMÍNGUEZ GONZÁLEZ, J. M.; CONVERTI, A.; OLIVEIRA, R. P. de S. Lactic acid properties, applications and production: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 30, n. 1, p. 70 - 83, 2013.

MASSET, J.; CALUSINSKA, M.; HAMILTON, C.; HILIGSMANN, S.; JORIS, B.; WILMOTTE, A.; THONART, P. Fermentative hydrogen production from glucose and starch using pure strains and artificial co-cultures of *Clostridium* spp. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 1, p. 35, 2012.

MASSET, J.; CALUSINSKA, M.; HAMILTON, C.; HILIGSMANN, S.; JORIS, B.; WILMOTTE, A.; THONART, P. Fermentative hydrogen production from glucose and starch using pure strains and artificial co-cultures of *Clostridium* spp. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 1, p. 35, 2012.

MATA-ALVAREZ, J.; DOSTA, J.; ROMERO-GÜIZA, M. S.; FONOLL, X.; PECES, M.; ASTALS, S. A critical review on anaerobic co-digestion achievements between 2010 and 2013. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 36, p. 412–427, 2014.

MATSUMOTO, M.; NISHIMURA, Y. Hydrogen production by fermentation using acetic acid and lactic acid. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 103, n. 3, p. 236–241, 2007.

MATSUMOTO, M.; NISHIMURA, Y. Hydrogen production by fermentation using acetic acid and lactic acid. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 103, n. 3, p. 236–241, 2007.

MIODRAG BELOSEVIC, M. G. E. D. Z. S. J. R. B. Degradation of Alizarin Yellow R using UV / H₂O₂ Advanced Oxidation Process. **Environmental science & technology**, v. 33, n. 2, p. 482–489, 2014.

MIZUNO, O.; DINSDALE, R.; HAWKES, F. R.; HAWKES, D. L.; NOIKE, T. Enhancement of hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging. **Bioresource Technology**, v. 73, n. 1, p. 59–65, 2000.

NOIKE, T.; TAKABATAKE, H.; MIZUNO, O.; OHBA, M. Inhibition of hydrogen fermentation of organic wastes by lactic acid bacteria. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 27, n. 11-12, p. 1367–1371, 2002.

NÚÑEZ, L. A. AND B. MARTÍNEZ. Anaerobic treatment of slaughterhouse wastewater in an Expanded Granular Sludge Bed (EGSB) reactor. **Water Science and Technology**, 1999.

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**, v. 5, n. 1, p. 39–55, 2006.

OECD-FAO. **SUGAR - OECD-FAO Agricultural Outlook 2017-2026**. 2018. Disponível em: <<http://stats.oecd.org/Index.aspx?QueryId=76855>>. Acesso em: 13 fev. 2018.

OH, S.-E.; VAN GINKEL, S.; LOGAN, B. E. The Relative Effectiveness of pH Control and Heat Treatment for Enhancing Biohydrogen Gas Production. **Environmental Science & Technology**, v. 37, n. 22, p. 5186–5190, 2003.

ONODERA, T.; SASE, S.; CHOEISAI, P.; YOOCHATCHAVAL, W.; SUMINO, H.; YAMAGUCHI, T.; EBIE, Y.; XU, K.; TOMIOKA, N.; MIZUOCHI, M.; SYUTSUBO, K. Development of a treatment system for molasses wastewater: The effects of cation inhibition on the anaerobic degradation process. **Bioresource Technology**, v. 131, p. 295–302, 2013.

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

PAIVA, R. P. O. Fluxograma do processamento de cana-de-açúcar para a produção de etanol. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 241p, 2009.

PENTEADO, E. D.; LAZARO, C. Z.; SAKAMOTO, I. K.; ZAIAT, M. Influence of seed sludge and pretreatment method on hydrogen production in packed-bed anaerobic reactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 14, p. 6137–6145, 2013.

PIACENTE, F. J. (2005). **Agroindústria canavieira e o sistema de gestão ambiental: o caso das usinas localizadas nas bacias hidrográficas dos rios Piracicaba, Capivari e Jundiá**. 2005. 181 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Econômico), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

REGO, G. C. **Produção de hidrogênio em reatores anaeróbios de leito fluidificado mesofílico a partir de diferentes substratos orgânicos da indústria sucroalcooleira**. 2016. 118 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

REN N. Q.; LI Y. F.; WANG A. J.; LI J. Z.; DING J.; ZADSAR M. Hydrogen production by fermentation: review of a new approach to environmentally safe energy production. **Aquatic Ecosystem Health Manage**, v. 9, p. 39 – 42, 2006.

REN N. Q.; ZHAO D.; CHEN X. L.; LI J. Z. Mechanism and controlling strategy of the production and accumulation of propionic acid for anaerobic wastewater treatment. **Science in China Series B: Chemistry**, v. 45, n. 3, p. 319 - 327, 2002.

REN, N. Q.; TANG, J.; LIU, B. F.; GUO, W. Q. Biological hydrogen production in continuous stirred tank reactor systems with suspended and attached microbial growth. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, n. 7, p. 2807–2813, 2010.

REN, N.; CHUA, H.; CHAN, S.; TSANG, Y.; WANG, Y.; SIN, N. Assessing optimal fermentation type for biohydrogen production in continuous-flow acidogenic reactors, **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1774 – 1780, 2007.

REN, N.; LI, J.; LI, B.; WANG, Y.; LIU, S. Biohydrogen production from molasses by anaerobic fermentation with a pilot-scale bioreactor system. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 31, n. 15, p. 2147–2157, 2006.

REN, N.; LI, J.; LI, B.; WANG, Y.; LIU, S. Biohydrogen production from molasses by anaerobic fermentation with a pilot-scale bioreactor system. **International Journal Hydrogen Energy**, v. 31, p. 2147 – 2157, 2006.

REN, N.; TANG, J.; LIU, B.; GUO, W. Biological hydrogen production in continuous stirred tank reactor systems with suspended and attached microbial growth. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.35, p.2807-2813, 2010.

REN, N.; WANG, B.; HUANG, J.C. Ethanol-type fermentation from carbohydrate in high rate acidogenic reactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v.54, n.5, p.428-433, 1997.

ROBLEDO-NARVÁEZ, P. N.; MUÑOZ-PÁEZ, K. M.; POGGI-VARALDO, H. M.; RÍOS-LEAL, E.; CALVA-CALVA, G.; ORTEGA-CLEMENTE, L. A.; RINDERKNECHT-SEIJAS, N.; ESTRADA-VÁZQUEZ, C.; PONCE-NOYOLA, M. T.; SALAZAR-MONTOYA, J. A. The influence of total solids content and initial pH on batch biohydrogen production by solid substrate fermentation of agroindustrial wastes. **Journal of Environmental Management**, v. 128, p. 126–137, 2013.

ROSA, P. R. F.; SANTOS, S. C.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B. A.; SILVA, E. L. Hydrogen production from cheese whey with ethanol-type fermentation: Effect of hydraulic retention time on the microbial community composition. **Bioresource Technology**, v. 161, p. 10–19, 2014.

RYAN P.; FORBES C.; COLLERAN E. Investigation of the diversity of homoacetogenic bacteria in mesophilic and thermophilic anaerobic sludges using the formyltetrahydrofolate synthetase gene. **Water Science Technology**, v. 57, n. 5, p. 675-680, 2008.

SANTOS, F. M.; SANTOS, F. A. O combustível “Hidrogênio”. **Educação Ciência e Tecnologia**, p. 252 – 270, 2007.

SAADY, N. M. C. Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 30, p. 13172–13191, 2013.

SCULLY, C., G. COLLINS AND V. O’FLAHERTY. Anaerobic biological treatment of phenol at 9.5–15°C in an expanded granular sludge bed (EGSB)-based bioreactor. **Water Research**, 2006.

SHELDON, M. S.; ERDOGAN, I. G. Multi-stage EGSB/MBR treatment of soft drink industry wastewater. **Chemical Engineering Journal**, v. 285, p. 368–377, 2016.

SHIDA, G. M.; BARROS, A. R.; REIS, C. M. dos; AMORIM, E. L. C. de; DAMIANOVIC, M. H. R. Z.; SILVA, E. L. Long-term stability of hydrogen and organic acids production in an anaerobic fluidized-bed reactor using heat treated anaerobic sludge inoculum. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 9, p. 3679–3688, 2009.

SIKORA, A.; BŁASZCZYK, M.; JURKOWSKI, M.; ZIELENKIEWICZ, U. Lactic Acid Bacteria in Hydrogen-Producing Consortia: On Purpose or by Coincidence?. **Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes**, Cap. 21, 2013

SILVA, N. F. Da et al. Wind energy in Brazil: From the power sector's expansion crisis model to the favorable environment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 22, p. 686–697, 2013.

SINGHVI, M., JOSHI, D., ADSUL, M., VARMA, A., & GOKHALE, D. Lactic acid production from cellobiose and cellulose by *Lactobacillus lactis* mutant RM2-24. **Green Chemistry**, v. 12, p. 1106 - 1109, 2010.

SYUTSUBO, K.; ONODERA, T.; CHOEISAI, P.; KHODPHUVIENG, J.; PRAMMANEE, P.; YOOCHATCHAVAL, W.; KAEWPRADIT, W.; KUBOTA, K. Development of appropriate technology for treatment of molasses-based wastewater. **Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering**, v. 48, n. 9, p. 1114–1121, 2013.

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

TUNÇAY, G. E.; ERGUDER, H. T.; ERO ĞLU, I.; GÜNDÜZ, U. Dark fermentative hydrogen production from sucrose and molasses. **International Journal of Energy Research**, v. 41, n. 13, p. 1891 - 1902, 2017.

VALDEZ-VAZQUEZ, I.; RÍOS-LEAL, E.; ESPARZA-GARCÍA, F.; CECCHI, F.; POGGI-VARALDO, H. M. Semi-continuous solid substrate anaerobic reactors for H₂ production from organic waste: Mesophilic versus thermophilic regime. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 30, n. 13-14, p. 1383–1391, 2005.

VAN HAANDEL, A. C. Aproveitamento dos subprodutos de destilarias de álcool para proteger o meio ambiente e aumentar a rentabilidade. XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental, ABES - Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental. Porto Alegre, 2000.

VAN LOOSDRECHT, M. C. M.; POT, M. A.; HEIJNEN, J. J. Importance of bacterial storage polymers in bioprocesses. **Water Science Technology**, v. 5, n. 1, p. 41–47, 1997.

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

WANG L, ZHOU Q, LI FT. Avoiding propionic acid accumulation in the anaerobic process for biohydrogen production. **Biomass Bioenergy**, v. 30, p. 177 – 82, 2006.

WANG, B.; LI, Y.; REN, N. Biohydrogen from molasses with ethanol-type fermentation: Effect of hydraulic retention time. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 11, p. 4361–4367, 2013.

WANG, X.; JIN, B. Process optimization of biological hydrogen production from molasses by a newly isolated *Clostridium butyricum* W5. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 107, n. 2, p. 138–144, 2009.

WANG, Y.; GUO, W. Q.; XING, D. F.; CHANG, J. S.; REN, N. Q. Hydrogen production using biocathode single-chamber microbial electrolysis cells fed by molasses wastewater at low temperature. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 33, p. 19369–19375, 2014.

WEI, H.; BING, W.; XIAOYE, L.; CHUNYU, L.; LIRAN, Y.; YONGFENG, L. Fermentative Hydrogen Production from Molasses in an Activated Sludge Immobilized Bioreactor. **International Journal of Energy Engineering IJEE IJEE**, v. 2, n. 1, p. 28–31, 2012.

WHITEMAN, J. K.; GUEGUIM KANA, E. B. Comparative Assessment of the Artificial Neural Network and Response Surface Modelling Efficiencies for Biohydrogen Production on Sugar Cane Molasses. **Bioenergy Research**, v. 7, n. 1, p. 295–305, 2014.

YUN, J.; CHO, K. S. Effects of organic loading rate on hydrogen and volatile fatty acid production and microbial community during acidogenic hydrogenesis in a continuous stirred tank reactor using molasses wastewater. **Journal of Applied Microbiology**, v. 121, n. 6, p. 1627–1636, 2016.

ZHANG, Z. P.; TAY, J. H.; SHOW, K. Y.; YAN, R.; TEE LIANG, D.; LEE, D. J.; JIANG, W. J. Biohydrogen production in a granular activated carbon anaerobic fluidized bed reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 32, n. 2, p. 185–191, 2007.

ZHU, G.; LIU, C.; LI, J.; REN, N.; LIU, L.; HUANG, X. Fermentative hydrogen production from beet sugar factory wastewater treatment in a continuous stirred tank reactor using anaerobic mixed consortia. **Frontiers of Environmental Science and Engineering in China**, v. 7, n. 1, p. 143–150, 2013.

ZHOU, M.; YAN, B.; WONG, J. W. C.; ZHANG, Y. Enhanced volatile fatty acids production from anaerobic fermentation of food waste: A mini-review focusing in acidogenic metabolic pathways. **Bioresource Technology**, v. 248, p. 68–78, 2018.