UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS DEPARTAMENTO DE HIDRÁULICA E SANEAMENTO

TIAGO BORGES FERREIRA

Produção de hidrogênio e metabólitos solúveis a partir de subprodutos da indústria sucroalcooleira em reator anaeróbio de leito fluidificado termofílico

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos 2016

TIAGO BORGES FERREIRA

Produção de hidrogênio e metabólitos solúveis a partir de subprodutos da indústria sucroalcooleira em reator anaeróbio de leito fluidificado termofílico

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

São Carlos 2016 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.

Ferreira, Tiago Borges F383p F383p F383p F383p F383p Fondução de hidrogênio e metabólitos solúveis a partir de subprodutos da indústria sucroalcooleira em reator anaeróbio de leito fluidificado termofílico / Tiago Borges Ferreira; orientador Edson Luiz Silva. São Carlos, 2016.

> Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação e Área de Concentração em Hidráulica e Saneamento --Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2016.

 Biohidrogênio. 2. RALF. 3. Caldo de cana-de-açúcar. 4. Melaço. 5. Vinhaça. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Engenheiro TIAGO BORGES FERREIRA.

Título da dissertação: "produção de hidrogênio e metabólitos solúveis a partir de subprodutos da indústria sucroalcooleira em reator anaeróbio de leito fluidificado termofílico".

Data da defesa: 04/04/2016

Comissão Julgadora:

Resultado:

Prof. Dr. Edson Luiz Silva (Orientador) (Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

Prof. Dr. Ariovaldo José da Silva (Universidade Estadual de Campinas/UNICAMP)

Aprovado Aprovado

Profa, Dra, Lorena de Oliveira Pires (Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/UNE\$P - Araraguara)

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento: Profa, Associada Maria Bernadete A. Varesche Silva

Presidente da Comissão de Pós-Graduação: Prof. Associado Paulo César Lima Segantine

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Nivaldo e Geralda, e minha irmã Tatiane:

Pela motivação e suporte de sempre.

"Combati o bom combate, acabei a carreira, guardei a fé."

2 Timóteo 4:7

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela dádiva da vida, pela capacidade de lutar e por mais essa oportunidade de crescimento.

Ao Prof. Dr. Edson Luiz Silva pela orientação, comprometimento e possibilidade de conviver com tamanha experiência. Foi um período muito intenso, de grande crescimento!

À Dra. Bruna Carrer Gomes Malavazi e Dra. Isabel Kimiko Sakamoto pelo cuidado que avaliaram o projeto e pelas modificações sugeridas no momento do exame de qualificação.

Ao Dr. Fabrício Motteran e Profa. Dra. Paula Rúbia Ferreira Rosa pela atenção despendida na correção do texto e ressalvas levantadas no exame de acompanhamento.

Ao Prof. Dr. Marcelo Zaiat, assim como ao meu orientador, Prof. Dr. Edson pela possibilidade de haver participado do Projeto Temático "Produção de Bioenergia no Tratamento de Águas Residuárias e Adequação Ambiental dos Efluentes e Resíduos Gerados", financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo 2009/15.984-0).

Ao CNPq pelo apoio financeiro concedido por meio da Bolsa de Mestrado (Processo 130749/2014-1).

Á Usina São Martinho, por disponibilizar a vinhaça, além de agradecimento especial ao Cláudio e a Michele, os quais sempre foram muito atenciosos.

À Usina Ipiranga, por disponibilizar o melaço e caldo de cana-de-açúcar.

Ao Oscar da Silva, técnico geral do Departamento de Engenharia Qúimica -UFSCar, pelo apoio técnico nas adversidades do laboratório e coleta de substrato. A todos os técnicos do Laboratório de Saneamento da USP, em especial ao Júlio Cesar Trofino e Cidinha, pelos ensinamentos e auxílio.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação do Departamento de Engenharia Hidráulica e Saneamento, que me propiciaram acesso ao elevado grau de conhecimento acadêmico-científico, participando do meu aprimoramento técnico e pessoal. Em especial ao Prof. Dr. Eugenio Foresti, Prof. Dr. Jurandyr Povinelli, Profa. Dra. Márcia Damianovic e Prof. Dr. Marco Antonio Penalva Reali.

Aos funcionários e motoristas do setor de Transportes da Escola de Engenharia da USP, pela atenção e profissionalismo nas coletas de vinhaça.

Às funcionárias da Secretaria do Departamento de Engenharia Hidráulica e Saneamento, Sá, Priscila e Rose, pelas orientações e suporte.

Aos amigos que tive a oportunidade de fazer ao cursar as disciplinas, principalmente aos que tivemos oportunidades de viver momentos de descontração (Rafa, Quixa, Day, Ju, Tainá, Fer e Guilherme) que juntamente com outros amigos são-carlenses (Seu Jorge, Alecrim, Leo) proporcionaram dias (e noites) fantásticos.

Ao pessoal da minha primeira casa em São Carlos, Paulão e Pablito, que juntamente com as meninas do 91 (Mari, Tati e Camila) me receberam muito bem e tornaram minhas semanas mais felizes com as quartas culinárias.

Aos grandes amigos da minha casa de verdade nessa cidade, que me suportaram durante o ano de operação dos reatores e sempre tentaram me incluir na programação da casa, mesmo eu nunca estando lá. Meu muito obrigado pelas conversas, os churrascos, as discussões político-sociais, as pedaladas, os bares e festinhas. Cada um em suas particularidades, mas muito obrigado Giz, Gu e Djava, por proporcionarem momentos que me fizeram sentir incluso em algo maior que apenas uma república. Obrigado também à Carol, por sempre estar conosco na casa, pelo carinho e por sempre trazer aquele olhar feminino aos fatos. Aos "moradores" de estada rápida, Andrea, Leo e Karina, por trazerem alegria a casa, principalmente ao Andrea, pela irreverencia e por me ensinar os cinco segredos da cafeteira italiana.

Aos amigos do Laboratório de Controle Ambiental II, que dividiram os momentos mais duros dessa fase, porém, sempre garantiram felicidade e alegria aos meus dias de operação. As duas amigas que tive pouca oportunidade de conviver, Talita e Camila, pelo rápido, mas marcante convívio. Meu agradecimento ao Helberth e Lucas, por haverem me recebido e repassado seus conhecimentos sobre as técnicas laboratoriais necessárias ao desenvolvimento do experimento, além, é claro, das conversas, festinhas e exemplo de vida. Meu muito obrigado ao Gabri, pela irmandade no desempenhar das atividades do LCAII e por proporcionar assuntos polêmicos para nossos almoços. A Aline, minha irmã, meu muito obrigado pela paciência, companheirismo e discussões, sempre com opiniões pertinentes e sensatas. Ao Lucas em sua nova fase, pelas conversas e por se mostrar disposto a sempre melhorar, isso me motivou bastante. Eu sou suspeito de falar de vocês, esse período que passamos juntos, nessa fase tão intensa e crua, no qual cada sentimento é aflorado da maneira mais real possível, me tornou uma nova pessoa. Agradeço imensamente a cada um de vocês!

Aos amigos de sempre, Vinícius e Márcio, que entenderam minha ausência nesse período. Que apesar de longos períodos longe e tudo mais, sei que posso contar com vocês. À minha família, primeiro no aspecto mais amplo do termo, agradeço aos tios e tias, que muitas vezes não entendem minha vida; nem sempre perto de casa, com poucos contatos, porém, sei que torcem por mim. Ao meu avô (in memoriam) que vibrava com minhas conquista mesmo não entendendo muito bem do que se tratava. Às minhas avós, pelas orações e ternuras de sempre. Aos primos, alguns deles meus melhores amigos, por entenderem os poucos contatos e por sempre fazerem questão das minhas conversas.

Aos meus pais e irmã, Nivaldo, Geralda e Tatiane, pelo carinho, suporte e motivação de sempre. Por me manterem alerta quanto à vida que abro mão em muitas das minhas escolhas. Não consigo expressar em palavras minha gratidão, talvez se as lágrimas que fazem parte deste momento se tornassem expressões, isso se tornaria mais fácil. Esse Título, assim como todos os outros, é muito mais de vocês que meu, ele representam seus ensinamentos, valores e anseios de vida melhor.

A todos aqueles, mesmo que não citados, que de uma forma ou de outra participaram desse intenso período e aos que mesmo longe estão sempre torcendo por mim.

Meus sinceros agradecimentos.

"Não há tempo, tão breve é a vida, para discussões, desculpas, amarguras, prestação de contas, só há tempo para amar e mesmo para isso, é só um instante."

Mark Twain

RESUMO

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.

A indústria sucroalcooleira nacional, fruto da política de autonomia energética da década de 70, busca no aumento de portifólio produtivo a melhora da eficiência produtiva e energética. A produção de hidrogênio e metabólitos dissolvidos por processo biológico é uma linha de pesquisa relativamente recente, porém, que pode representar uma alternativa para esse setor, maximizando a produção de energia e ampliando a produção de compostos de alto valor agregado. Partindo destes preceitos, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de hidrogênio e ácidos orgânicos por meio da fermentação escura a partir de compostos da indústria sucroalcooleira; sacarose (RS), caldo (RC), melaço (RM) e vinhaça (RV) a 5.000 mg DQO L^{-1} , em reatores anaeróbios de leito fluidificado termofílicos (55° C), submetidos a tempos de detenção hidráulica (TDH) de 8, 6, 4, 2 e 1h. O inóculo utilizado foi obtido a partir de lodo de reator de manta de lodo metanogênico empregado na biodigestão de vinhaça de cana-de-açúcar em faixa termofílica de temperatura (55°C). As produtividades volumétricas de hidrogênio (PVH) mais elevadas foram obtidas quando em operação em TDH de 1h, sendo 194,9; 501,4; 303,4 e 40,7 mL H₂ h⁻¹ L⁻¹ para RS, RC, RM e RV, respectivamente. Os melhores rendimentos de hidrogênio (HY) foram logrados em distintos TDH; 1,97; 3,01; 2,5 e 0,65 mol H_2 mol⁻ ¹sacarose quando RS, RC, RM e RV foram operados em 4, 6, 2 e 1h, respectivamente. Na fase de maior PVH, os metabólitos dissolvidos predominantes resumiram-se a ácido lático, ácido acético, ácido butírico, ácido propiônico, ácido málico e etanol, condicionados ao substrato empregado em cada reator. Assim, evidenciou-se a possibilidade de produção de hidrogênio, ácidos orgânicos e etanol por meio da fermentação escura aplicada aos substratos desta indústria, confirmando que a produção de energia e produtos de elevado valor agregado pode ser uma aplicação alternativa para seus compostos.

Palavras-chave: Biohidrogênio, RALF, caldo de cana-de-açúcar, melaço, vinhaça.

ABSTRACT

FERREIRA, T.B. Hydrogen and soluble metabolites production from sugarcane mill byproducts in thermophilic anaerobic fluidized bed reactor. 2016. 148p. Dissertation (Master degree) – Engineering School of São Carlos, University of São Paulo, São Carlos, 2016.

The national sugarcane industry, coming from the energy policy autonomy of the 70s, seeks increase its portfolio productive improvement of productive and energy efficiency. Hydrogen and dissolved metabolites production by biological process is a relatively recent research line, however it, may represent an alternative for this sector, maximizing energy production and increasing the value-added compounds production. Based on these principles, the aim of this study was to evaluate the hydrogen and dissolved metabolites production by means of the dark fermentation from compounds of the sugarcane industry; sucrose (RS), sugarcane juice (RC), molasses (RM) and vinasse (RV) with 5,000 mg COD L⁻¹ in thermophilic anaerobic fluidized bed reactor (55°C) submitted to hydraulic retention time (HRT) of 8, 6, 4, 2, and 1h. The inoculum was obtained from methanogenic upflow anaerobic sludge blanket reactor employed to digestion of sugarcane stillage in thermophilic temperature range (55° C). The highest hydrogen production rates (HPR) of these reactors were obtained when operating in HRT 1h, which were 194.9, 501.4, 303.4, and 40.7 mL H_2 h⁻¹ L⁻¹ to RS, RC, RM, and RV respectively. The best hydrogen yield (HY) were duped in differents HRT; 1.97, 3.01, 0.65, and 2.5 mol H_2 mol⁻¹sacarose when RS, RC, RM, and RV were operated in 4, 6, 2, and 1h, respectively. When were produced the biggest HPR, the predominant dissolved metabolites were lactic acid, acetic acid, butyric acid, propionic acid, malic acid and ethanol, dependent on the substrate used in each reactor. Therefore, evidence of the possibility of hydrogen, organic acids and ethanol production by dark fermentation applied to substrates that industry, confirming that the production of energy and high value-added products may be an alternative application for their compounds.

Keywords: Biohydrogen, AFBR, sugarcane juice, molasses, vinasse.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 3.1. Evolução do cultivo de cana-de-açúcar no Brasil7
Figura 3.2. Fluxograma simplificado e generalizado do processo produtivo de uma
indústria sucroalcooleira8
Figura 3.3. Esquema simplificado da decomposição da glicose no interior da célula
microbiana11
Figura 3.4. Estrutura química da sacarose13
Figura 4.1. Partículas de cinasita utilizadas como material suporte
Figura 4.2. Esquema ilustrativo da instalação do RALF53
Figura 5.1. Concentrações e conversões de carboidratos referentes ao RS
Figura 5.2. Composição do biogás produzido pelo RS segundo TDH aplicado60
Figura 5.3. Produção volumétrica de H ₂ (PVH) e taxa de carregamento orgânico (TCO)62
Figura 5.4. Rendimentos de H ₂ obtidos no RS64
Figura 5.5. Distribuição, em percentual molar, dos metabólitos dissolvidos
Figura 5.6. Concentrações e conversões de carboidratos no RC72
Figura 5.7. Composição do biogás produzido pelo RC segundo TDH73
Figura 5.8. Produção volumétrica de H ₂ (PVH) e taxa de carregamento orgânico (TCO)74
Figura 5.9. Rendimentos de H ₂ obtidos no RC76
Figura 5.10. Distribuição, em percentual molar, dos metabólitos dissolvidos produzidos
no RC
Figura 5.11. Concentrações e conversões de carboidratos no RM
Figura 5.12. Composição do biogás produzido pelo RM segundo o TDH aplicado85
Figura 5.13. Comportamento da PVH condicionado à TCO no RM
Figura 5.14. Rendimentos de H ₂ obtidos no RM
Figura 5.15. Distribuição, em percentual molar, dos metabolitos produzidos pelo RM.91
Figura 5.15. Distribuição, em percentual molar, dos metabolitos produzidos pelo RM.91 Figura 5.16. Concentrações e conversões de carboidratos no RV
Figura 5.15. Distribuição, em percentual molar, dos metabolitos produzidos pelo RM.91 Figura 5.16. Concentrações e conversões de carboidratos no RV
Figura 5.15. Distribuição, em percentual molar, dos metabolitos produzidos pelo RM.91 Figura 5.16. Concentrações e conversões de carboidratos no RV
Figura 5.15. Distribuição, em percentual molar, dos metabolitos produzidos pelo RM.91 Figura 5.16. Concentrações e conversões de carboidratos no RV
Figura 5.15. Distribuição, em percentual molar, dos metabolitos produzidos pelo RM.91 Figura 5.16. Concentrações e conversões de carboidratos no RV
Figura 5.15. Distribuição, em percentual molar, dos metabolitos produzidos pelo RM.91 Figura 5.16. Concentrações e conversões de carboidratos no RV
Figura 5.15. Distribuição, em percentual molar, dos metabolitos produzidos pelo RM.91 Figura 5.16. Concentrações e conversões de carboidratos no RV
Figura 5.15. Distribuição, em percentual molar, dos metabolitos produzidos pelo RM.91 Figura 5.16. Concentrações e conversões de carboidratos no RV

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Resumo dos estudos de produção de H2 com substrato a base de sacarose	. 18
Tabela 3.2. Caracterização geral do caldo de cana-de-açúcar	. 19
Tabela 3.3. Resumo da literatura sobre produção de H ₂ a partir de caldo de cana-de-	
açúcar	.21
Tabela 3.4. Composição do melaço relatado pela literatura atual	.22
Tabela 3.5. Resumo da literatura sobre produção de H ₂ a partir de melaço	. 31
Tabela 3.6. Características gerais da vinhaça de cana-de-açúcar	. 32
Tabela 3.7. Resumo da literatura sobre produção de H ₂ a partir de vinhaça	. 37
Tabela 4.1. Componentes da solução de nutrientes adicionada ao RS	.46
Tabela 4.2. Caracterização do caldo utilizado durante o experimento	.47
Tabela 4.3. Componentes da solução de nutrientes adicionada ao RC	.47
Tabela 4.4. Caracterização do melaço utilizado ao longo do experimento	.48
Tabela 4.5. Características da vinhaça in natura	. 49
Tabela 4.6. Parâmetros do tratamento físico-químico	. 49
Tabela 4.7. Caracterização da vinhaça após pré-tratamento físico-químico	. 50
Tabela 4.8. Componentes da solução de nutrientes adicionada ao RV	. 50
Tabela 4.9. Características físicas da cinasita	.51
Tabela 4.10. Condições operacionais impostas aos RALF	.54
Tabela 4.11. Frequência de coletas e análises, físico-químicas e microbiológicas,	
realizadas ao longo do experimento	.56
Tabela 5.1. Descrição das fases de operação do RS e suas características	. 57
Tabela 5.2. Concentrações médias e conversões de carboidratos no RS	. 58
Tabela 5.3. Concentração dos componentes do biogás produzido pelo RS	. 60
Tabela 5.4. Produção volumétrica de H ₂ (PVH) e taxa de carregamento orgânico (TC	O)
segundo o TDH aplicado	. 62
Tabela 5.5. Metabólitos detectados pelo RS durante as cinco fases operacionais	. 67
Tabela 5.6. Concentração e conversão de DQO promovida no RS	. 69
Tabela 5.7. Valores médios de pH afluente e efluente	.70
Tabela 5.8. Sólidos suspensos totais (SST), suspensos fixos (SSF) e suspensos volátei	is
(SSV) referentes ao RS em suas respectivas fases de operação	.70
Tabela 5.9. Características das fases de operação a que foi submetido o RC	.71
Tabela 5.10. Concentrações médias e conversões de carboidratos no RC	.72
Tabela 5.11. Concentração dos componentes do biogás produzido pelo RC	.73
Tabela 5.12. Produção volumétrica de H ₂ (PVH) e taxa de carregamento orgânico (TO	CO)
segundo o TDH aplicado	.75
Tabela 5.13. Metabólitos produzidos pelo RC nas duas primeiras fases de operação	.79
Tabela 5.14. Concentrações e conversões de DQO promovidas no RC	. 81
Tabela 5.15. Valores médios de pH afluente e efluente	. 82
Tabela 5.16. Sólidos suspensos totais (SST), suspensos fixos (SSF) e suspensos voláte	eis
(SSV) referentes ao RC em suas respectivas fases de operação	. 82

Tabela 5.17. Fases operacionais impostas ao RM	
Tabela 5.18. Concentrações e conversões de carboidratos no RM durante as cinco fases	
operacionais	
Tabela 5.19. Composição do biogás produzido pelo RM85	
Tabela 5.20. Produção volumétrica de H ₂ (PVH) e taxa de carregamento orgânico (TCO)	,
segundo o TDH aplicado	
Tabela 5.21. Metabólitos dissolvidos produzidos pelo RM durante as duas primeiras fase	S
de operação92	
Tabela 5.22. Concentrações e conversões de DQO promovidas pelo RM94	
Tabela 5.23. Valores médios de pH afluente e efluente no RM durante as três primeiras	
fases	
Tabela 5.24. Sólidos suspensos totais (SST), fixos (SSF) e voláteis (SSV) referentes ao	
RM ao longo de sua operação95	
Tabela 5.25. Característica das fases submetidas ao RV96	
Tabela 5.26. Efeito do tratamento físico-químico aplicado à vinhaça, para DQO e sulfato	
Tabela 5.27. Concentrações e conversões de carboidratos no RV durante as cinco fases	
operacionais	
Tabela 5.28. Composição do biogás produzido pelo RV99	
Tabela 5.29. Produção volumétrica de H2 (PVH) e taxa de carregamento orgânico (TCO)	1
segundo o TDH aplicado101	
Tabela 5.30. Metabólitos produzidos no RV durante as duas primeiras fases de operação	
Tabela 5.31. Concentrações e conversões de DQO referentes ao RV durante as cinco	
fases experimentais	
Tabela 5.32. Valores médios de pH afluente e efluente no RV durante as três primeiras	
fases	
Tabela 5.33. Sólidos suspensos totais (SST), fixos (SSF) e voláteis (SSV) referentes ao	
RV nas cinco fases operacionais107	
Tabela 5.34. Estimativa da concentração residual de sulfato segundo o TDH aplicado ao	
RV	
Tabela 5.35. Descrição comparativa dos metabólitos e fatores energéticos relacionados	
aos 4 reatores avaliados111	

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- APBR reator anaeróbio de leito empacotado
- ASBR reator anaeróbio de batelada alimentada
- BRS bactérias redutoras de sulfato
- C/N relação carbono nitrogênio
- CH₄ metano
- CMISR reator anaeróbio de mistura completa e leito imobilizado
- CO2 dióxido de carbono
- CoA coenzima A
- COT carbono orgânico total
- CSTR reator anaeróbio de mistura contínua
- DQO demanda química de oxigênio
- DQO:N:P relação entre a demanda química de oxigênio, nitrogênio e fósforo
- DQO:SO₄⁻² relação entre a demanda química de oxigênio e a concentração de sulfato
- EGSB reator anaeróbio de leito granular expandido
- EtOH etanol
- EVA etileno acetato de vinila
- Fd- ferrodoxina
- FLEX FUEL bicombustível
- FQ tratamento físico-químico
- GC cromatografia gasosa
- GEE gases de efeito estufa
- H₂ hidrogênio
- HAc ácido acético
- HBu ácido butírico
- HCa ácido capróico
- HCi ácido cítrico

HFo - ácido fórmico

- HisoBu ácido isobutírico
- HisoVa ácido isovalérico
- HLa ácido lático
- HMa ácido málico
- HPLC cromatografia líquida de elevado desempenho
- HPr ácido propiônico
- HSu ácido succínico
- HY rendimento de hidrogênio
- MDL mecanismo de desenvolvimento limpo

MeOH - metanol

- MSR metodologia de superfície de resposta
- MTPE milhões de toneladas equivalentes de petróleo
- N₂ nitrogênio
- NAD⁺ nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada
- NADH nicotinamida adenina dinucleotído reduzida

nBuOH-nbutanol

- NTK nitrogênio total kjeldahl
- pH potencial hidrogeniônico
- PH₂ pressão parcial de hidrogênio
- PIB produto interno bruto
- PRO-ÀLCOOL programa de incentivo a produção e uso de etanol como carburante
- PVH produção volumétrica de hidrogênio
- PVHE produção volumétrica específica de hidrogênio
- RALF reator anaeróbio de leito fluidificado
- RALGF reator anaeróbio de leito granular fluidificado
- RC reator anaeróbio de leito fluidificado alimentado com caldo de cana-de-açúcar

RM - reator anaeróbio de leito fluidificado alimentado com melaço de cana-de-açúcar

RN – redes neurais

RS - reator anaeróbio de leito fluidificado alimentado com sacarose

RV – reator anaeróbio de leito fluidificado alimentado com vinhaça de cana-de-açúcar pré-tratada por processo físico-químico

SSF - sólidos suspensos fixos

SST - sólidos suspensos totais

SSV - sólidos suspensos voláteis

TCL – taxa de carregamento de lodo

TCO - taxa de carregamento orgânico

TDC - tempo de detenção celular

TDH - tempo de detenção hidráulica

UASB - reator anaeróbio de manta de lodo

ÚNICA – união da indústria de cana-de-açúcar

USSB - reator anaeróbio de fluxo ascendente e aletas

V/R - volume do reator/volume de recirculação

Vmf - velocidade de mínima fluidização

Vup - velocidade superficial

 σ – desvio padrão

SUMÁRIO

1.	IN	TRODUÇÃO1			
2.	2. OBJETIVOS				
3. REVISÃO DA LITERATURA					
3.1. Matriz energética: origens, cenário atual e tendências			triz energética: origens, cenário atual e tendências	4	
	3.2.	Bio	prrefinarias	5	
3.3. Setor sucroenergético e sua in3.4. Hidrogênio como promissora3.5. Potencial alternativa ao setor			or sucroenergético e sua indústria	6	
			lrogênio como promissora fonte energética e sua obtenção	9	
			rencial alternativa ao setor sucroalcooleiro: produção de H2 a partir de se	eus	
	subpr	odut	os1	3	
	3.5	.1.	Produção de H ₂ a partir de sacarose1	3	
	3.5	.2.	Produção de H ₂ a partir de caldo de cana-de-açúcar1	8	
	3.5	.3.	Produção de H ₂ a partir de melaço2	2	
3.5 3.6. 3.7.		.4.	Produção de H ₂ a partir de vinhaça3	1	
		Pri	ncípios e vantagens da produção de H ₂ sob temperatura termofílica3	8	
		Rea	ator anaeróbio de leito fluidificado3	9	
	3.8.	Co	nsiderações gerais4	.4	
4.	MA	ATE	RIAL E MÉTODOS4	.5	
	4.1.	Inó	culo produtor de hidrogênio: pré-tratamento térmico4	.5	
4.2.		Sub	ostratos orgânicos4	.5	
	4.2	.1.	Sacarose4	·6	
	4.2	.2.	Caldo de cana-de-açúcar4	·6	
	4.2	.3.	Melaço4	.8	
4.2		.4.	Vinhaça4	.8	
	4.3.	Rea	ator aneróbio de leito fluidificado termofílico: RS, RC, RM, RV5	1	
	4.4.	Cor	ndições operacionais e procedimento de partida dos reatores5	3	
4.5. Anál 4.6. Freq		Ana	álises físico-químicas5	4	
		Fre	quência das análises5	5	

4.7. 0	Cálculo dos principais parâmetros56
5. RES	ULTADOS E DISCUSSÃO
5.1. I	RALF alimentado com sacarose – RS
5.1.1	. Conversão de carboidratos
5.1.2	2. Composição do biogás
5.1.3	8. Produção volumétrica de hidrogênio61
5.1.4	Rendimento de hidrogênio63
5.1.5	5. Metabólitos solúveis65
5.1.6	5. Conversão de DQO, pH e sólidos suspensos69
5.2. I	RALF alimentado com caldo – RC71
5.2.1	. Conversão de carboidratos71
5.2.2	2. Composição do biogás73
5.2.3	8. Produção volumétrica de hidrogênio74
5.2.4	Rendimento de hidrogênio76
5.2.5	5. Metabólitos solúveis77
5.2.6	5. Conversão de DQO, pH e sólidos suspensos
5.3. I	RALF alimentado com melaço – RM83
5.3.1	. Conversão de carboidratos
5.3.2	2. Composição do biogás85
5.3.3	8. Produção volumétrica de hidrogênio87
5.3.4	Rendimento de hidrogênio
5.3.5	5. Metabólitos solúveis90
5.3.6	5. Conversão de DQO, pH, sólidos e relação DQO:N:P93
5.4. I	RALF alimentado com vinhaça – RV96
5.4.1	. Efeito do tratamento físico-químico aplicado à vinhaça96
5.4.2	2. Conversão de carboidratos
5.4.3	8. Composição do biogás99

5.4.4.	Produção volumétrica de hidrogênio	
5.4.5.	Rendimento de hidrogênio	101
5.4.6.	Metabólitos solúveis	
5.4.7.	Conversão de DQO, pH e sólidos suspensos	106
5.4.8.	Relação DQO:N:P e DQO:SO4 ⁻²	
5.5. An	álise comparativa dos reatores; RS, RC, RM e RC	110
6. CONCL	LUSÕES	113
7. SUGES	STÕES	114
REFERÊNC	CIAS	115

1. INTRODUÇÃO

O crescente aumento populacional e mudanças no estilo de vida desta têm acarretado em aumento da necessidade energética mundial. Essa demanda energética é suprida em sua maioria por combustíveis de origem fóssil, IEA (2015) cita que cerca de 80% dos 13.541 Milhões de Toneladas Equivalente de Petróleo (MTPE), utilizados como suprimento energético primário de todo o mundo em 2013, teve origem nesta fonte de energia. Com base na extinção destas fontes, além de surgir argumentos ambientais sobre o uso deste recurso, tem-se despertado para viabilização de energias limpas e renováveis.

O setor sucroalcooleiro nacional se desenvolveu com esse intuito, garantir autonomia energética, principalmente para carburantes em veículos. Surgiu na década de 70, se fortalecendo com o Programa nacional do Álcool (PRO-ÁLCOOL), que foi instituído pelo decreto 79.953, de 14 de novembro de 1975. Deste a instituição deste programa o mercado brasileiro de etanol sofre oscilações, condicionado ao preço internacional do petróleo e prioridades energéticas governamentais.

Atualmente, esse setor tem sido reestruturado, com inclusão de alternativas que ampliam seu portfólio produtivo, expandindo sua produção, anteriormente, baseada unicamente na produção de etanol, porém, que hoje se trata apenas de uma das possibilidades produtivas desta indústria, a qual participa no mercado de compostos para setores de alimentação animal, bioplásticos e energia elétrica. Esse fenômeno, extremamente necessário em mercados dinâmicos como os atuais, tem sido relatado em todo o mundo, sendo que essas indústrias são conhecidas como biorrefinarias.

Assim como foi o caso da cogeração de energia elétrica a partir do bagaço da canade-açúcar, maximizando a produção de energia e empregando um resíduo anteriormente tido como problema ao setor, a fermentação escura – fração inicial da digestão anaeróbia - para produzir hidrogênio e ácidos orgânicos voláteis é uma potencial alternativa para os compostos desta cadeia.

O hidrogênio é uma *commodity* industrial importante, a qual é utilizada amplamente para a síntese de amônia, álcoois e aldeídos (Fang *et al.*, 2002), além de ser considerado o combustível do futuro, por conter uma expressiva liberação energética quando queimado -2,75 vezes a energia da gasolina - e emitir somente água como produto final (Kim & Kim, 2011). A produção via fermentação escura de hidrogênio foi avaliada com diversos substratos, sendo alguns deles oriundos de indústrias de açúcar e álcool, tais como sacarose, caldo de cana-de-açúcar, melaço de beterraba e vinhaça de cana-de-açúcar.

Há relatos bem sucedidos de utilização de reatores anaeróbios de alta taxa para a produção biológica de hidrogênio, dentre eles: reator anaeróbio de manta de lodo (UASB), reator anaeróbio de leito fixo e reator anaeróbio de leito fluidificado (RALF).

Os reatores anaeróbios de leito fluidificado têm sido extensivamente estudados no campo do tratamento de águas residuárias devido seu potencial, oferecendo vantagens de acumulação de grande quantidade de biomassa sobre o meio suporte, possibilidade de altas taxas de carregamento orgânico, baixos TDH e boas características de mistura (Wu *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2007).

A temperatura do processo fermentativo pode afetar a produção de hidrogênio, influenciando na cinética das reações, transferência de massa, composição de microrganismos e atividades de enzimas essenciais, como as hidrogenases (Valdez-Vazquez & Poggo-Varaldo, 2009). De acordo com alguns autores (Ueno *et al.*, 1995; Fang & Liu, 2002; Hwang *et al.*, 2004) a condição termofílica resultou em produções cerca de 20% superiores à condição mesofílica.

Dessa forma, o foco deste estudo foi avaliar a produção de H_2 e metabólitos solúveis em um sistema que uni esses dois parâmetros; reator de elevado potencial produtivo e faixa termofílica de temperatura, avaliando a influência do tempo de detenção hidráulica (TDH) (variando de 8 a 1h) nestas produções, utilizando para tanto, alguns compostos da indústria sucroalcooleira - sacarose, caldo, melaço e vinhaça.

2. OBJETIVOS

O objetivo desta pesquisa foi avaliar o desempenho do reator anaeróbio de leito fluidificado termofílico (55°C) na produção de hidrogênio e metabólitos dissolvidos a partir de sacarose, caldo de cana-de-açúcar, melaço e vinhaça.

Como objetivos específicos tiveram-se:

a) Avaliação da influência do tempo de detenção hidráulica (TDH) de 8, 6, 4,
 2 e 1h na produção de hidrogênio;

b) Avaliar o comportamento dos metabólitos dissolvidos em função do TDH empregado no reator.

c) Verificar a remoção de carga orgânica (DQO) e sulfato pelo pré-tratamento físico-químico aplicado à vinhaça;

d) Avaliar a aplicação da vinhaça pré-tratada físico-químicamente na produção de hidrogênio e metabólitos dissolvidos.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Matriz energética: origens, cenário atual e tendências

O desenvolvimento da humanidade ao longo do tempo tem se dado em torno da utilização da energia, inicialmente com a sobrevivência como único motivo, porém, posteriormente agregado os demais interesses, como conforto, geração de renda, entretenimento, entre outros. O período compreendido entre o final do século XVII e a primeira metade do século XIX pode ser considerado o marco desta necessidade energética, promovida principalmente pela Revolução Industrial. Alterando assim os processos produtivos e a necessidade energética destes.

O desenvolvimento industrial e o contínuo desenvolvimento humano, quantitativo e qualitativo, iniciados nesse período influenciaram as necessidades energéticas subsequentes. Acar e Dincer (2014) citam que o incremento do consumo energético mundial do século XX e XXI é devido ao aumento da população global e de seu padrão de vida.

Essa demanda energética é suprida em sua maioria por combustíveis de origem fóssil, IEA (2015) cita que cerca de 80% dos 13.541 Milhões de Toneladas Equivalente de Petróleo (MTPE), utilizados como suprimento energético primário de todo o mundo em 2013, teve origem nessa fonte de energia.

Esse cenário supradescrito descreve a enorme dependência mundial por essas fontes de combustíveis, o que provoca um embate político pelas poucas reservas restantes, por se tratarem de recursos não renováveis, com curto/médio período de extração, além de redisponibilização de substâncias indesejáveis, como é o caso dos compostos de carbono, enxofre e nitrogênio, cujos efeitos e consequências na atmosfera ainda não são totalmente conhecidos.

De acordo com Choi (2014), os Gases de Efeito Estufa (GEE) resultantes do uso de combustíveis fósseis podem causar mudança climática e escassez futura de energia. Como base nessa diminuição dos estoques de petróleo, consequentemente, aumentos dos preços, incremento da demanda energética mundial e esforço global para mitigação do aquecimento global, o interesse por biocombustíveis tem aumentado nos últimos 20 anos, com objetivo de encontrar fontes mais seguras, limpas e diversificadas de energia, (Hallenbeck, 2009; Show *et al.*, 2012; Lee & Lavoie, 2013; Acar & Dincer, 2014).

Segundo Lee e Lavoie (2013) o crescimento do consenso sobre os efeitos danoso dos GEE tem levado os biocombustíveis a críticas, porém, em geral possuem um caráter ambientalmente mais apropriado para o balanço do carbono, além de ser praticamente neutro quando comparado às emissões promovidas por combustíveis derivados de petróleo, como é o caso do diesel, gasolina e querosene. Segundo IEA (2015), a emissão de CO₂, somente pela queima de combustíveis, foi de 32.190 Milhões de toneladas no ano de 2013.

A fim de explanação, os biocombustíveis são combustíveis que podem ser gerados a partir de material biológico, recentemente restringido para fontes renováveis de carbono (Lee & Lavoie, 2013). Analogamente, pode-se analisar as bioenergias como energias oriundas de processos e/ou recursos renováveis, onde incluímos assim, os biocombustíveis. Partindo desta definição, há ampla gama de biocombustíveis, alguns já altamente popularizados, como é o caso do etanol, e outros ainda em fase de consolidação, como por exemplo, o hidrogênio (H₂). Atualmente há necessidade de agrupar algumas dessas bioenergias, além de outros compostos de elevado valor agregado, em uma única unidade, otimizando-as, surgindo assim as biorrefinarias.

3.2.Biorrefinarias

Segundo IEA (2012), biorrefinaria é a unidade de processamento sustentável da biomassa com fins mercadológicos de bioprodutos (ingredientes para alimentos e/ou rações, químicos, materiais) e bioenergia (biocombustíveis e/ou energias em seus diferentes estados). Segundo esse mesmo relatório, as biorrefinarias possuem rentabilidade condicionada ao volume de produção e ao preço de mercado dos produtos produzidos, sendo que o atual valor do combustível fóssil não possibilita a competição destas. Há assim a necessidade de diversificar a produção, atuando em mercado de biocombustíveis líquidos e gasosos, além da coprodução de produtos de alto valor agregado, como ingredientes para alimentos, materiais e químicos.

Assim como citam Ho *et al.* (2014), agregar a produção de biocombustíveis de segunda e até terceira geração em plantas de biocombustíveis já existentes (geralmente de primeira geração) pode ser a forma mais econômica, além de representar a solução contra os combustíveis fósseis e consequentemente a citada mudança climática global.

Segundo IEA (2013a) o Brasil é atualmente o segundo maior produtor mundial de biocombustíveis e a sua produção, composta principalmente por etanol de cana-de-açúcar, tem aumentado expressivamente. Esse mesmo relatório prospecta produções brasileiras de cerca de 0,6 e 1,1 MTEP por dia, para 2020 e 2035, respectivamente, permanecendo

como segundo maior produtor atrás dos Estados Unidos (0,75 e 1,35 MTEP d⁻¹). Essa previsão diz que o biocombustível brasileiro abastecerá um terço da demanda de combustíveis para transporte e representará 40% do comercio mundial de biocombustíveis. Partindo destes preceitos o setor sucroalcooleiro brasileiro necessitará expandir-se sustentavelmente, podendo se beneficiar destas sugestões apresentadas pelos autores, diversificando e agregando valor à sua produção: partindo para a implementação dos biocombustíveis de segunda geração (líquidos e gasosos) além de bioprodutos de alto valor agregados, com foco principal em seus subprodutos e resíduos. Isso a tornará menos dependente de políticas setoriais, que segundo Neves e Trombin (2014) atualmente não atendem as necessidades do setor, principalmente em respeito ao etanol.

3.3. Setor sucroenergético e sua indústria

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) foi introduzida no Brasil no período colonial, com o objetivo de produzir açúcar, se tornando uma das principais culturas da economia nacional. Segundo Unica (2015), o Brasil atualmente é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, com produção de 630 milhões de toneladas por ano além do posto de maior produtor de açúcar, com 36 milhões de toneladas produzidas, o que representa 20% da produção global (safra 2014/2015).

Em relação ao etanol, o Brasil iniciou seu interesse por essa produção com o intuito de, segundo Renó *et al.* (2014), diminuir a dependência de importações de combustíveis fósseis e produzir etanol de cana-de-açúcar. Para isso, o Programa nacional do Álcool (PRO-ÀLCOOL) foi criado e instituído pelo decreto 79.953, de 14 de novembro de 1975.

Segundo Neves e Trombin (2014) desde a instituição do PRO-ÁLCOOL o mercado brasileiro de etanol sofre oscilações, com uma expressiva elevação da produção nos 10 anos posteriores à essa promulgação, diminuição em 1986 com a queda do preço do petróleo, posterior elevação no final da década de 1990 com o surgimento da tecnologia *flex-fuel* incentivada pela preocupação ambiental e previsões de elevação do preço da gasolina.

Após a crise de 2008 e mudanças nos rumos da política energética do país, o mercado brasileiro do etanol enfrentou dificuldades (Neves & Trombin, 2014). Na Figura 3.1 está apresentada a evolução da produção de cana-de-açúcar no Brasil, desde o citado PRO-ÁLCOOL até o ano de 2009.



Figura 3.1. Evolução do cultivo de cana-de-açúcar no Brasil

Fonte: Brasil (2013).

Atualmente há uma tentativa de diversificação dos produtos ofertados por esse setor, com parte das unidades fazendo cogeração de energia, convertendo uma fração do resíduo sólido gerado (bagaço) em energia elétrica. Segundo Ensinas *et al.* (2009) todas as usinas brasileiras são autossuficiente em energia térmica, mecânica e elétrica. Por outro lado, o fornecimento da energia sobressalente para a rede de distribuição é um mercado ainda incipiente. De acordo com Neves e Trombin (2014), cerca de 40% destas unidades estão ligadas à rede de distribuição e comercializando energia elétrica. Há produção de levedura desidratada, que é utilizada como matéria prima para ração animal. Outra fonte de receita são os projetos de Mecanismo de Desenvolvimento Limpo (MDL), os quais, segundo Neves e Trombin (2014), passam por momento de queda nos preços, causada principalmente pelo grande número de submissões. Além de novas tecnologias, como é o caso do bioplástico, atualmente produzido e comercializado por algumas poucas unidades.

Segundo Neves e Trombin (2014), o setor sucroenergético foi responsável por 2% do PIB nacional em 2013, movimentando entre mercado interno e externo, cerca de 43.360 milhões de dólares.

O setor sucroenergético brasileiro, apesar da tentativa de incremento em seu portfólio produtivo, tem como principais produtos açúcar e etanol. A Figura 3.2 descreve de forma simplificada a dinâmica produtiva desta indústria.



Figura 3.2. Fluxograma simplificado e generalizado do processo produtivo de uma indústria sucroalcooleira

Como mostra a Figura 3.2, esta indústria possui diversos substratos intermediários, dos quais podemos dar ênfase ao caldo *in natura* e melaço (após cristalização do açúcar), além de alguns subprodutos, os quais sempre foram foco de discussão, sendo os principais deles a vinhaça e o bagaço. Apesar de terem sido considerados grandes problemas, atualmente são utilizados como fertilizante agrícola (no caso da vinhaça e torta de filtro), e combustível para sistemas de cogeração de energia elétrica, quando se trata do bagaço.

Renó *et al.* (2014) ressaltam a necessidade de se efetuar avaliações ambientais e econômicas a respeito da sustentabilidade atual e futura do setor sucroalcooleiro no Brasil, onde o processamento da cana-de-açúcar deve ser considerado como biorrefinaria, convertendo matéria prima (cana-de-açúcar) em diversa variedade de produtos (açúcar, biocombustíveis de primeira e segunda geração, eletricidade, além de bioprodutos de alto valor agregado).

3.4. Hidrogênio como promissora fonte energética e sua obtenção

O hidrogênio é o elemento químico mais simples e abundante no universo, encontrado em conjunto com outros elementos, com propriedades, como elevado conteúdo energético e facilidade de combustão, que explicam o termo "gás inflamável", cunhado por Henry Cavendish no momento da sua descoberta.

Sua molécula é formada por dois átomos de hidrogênio (H_2) e tem sido considerada nos últimos anos como o combustível capaz de substituir grande parte dos combustíveis convencionais, devido às seguintes características:

Combustível sustentável, renovável e neutro na emissão de carbono (Hallenbeck, 2009; Kim & Kim, 2011, Wang *et al.*, 2013; Acar & Dincer, 2014);

(2) Possibilidade de uso direto em motores de combustão interna ou como combustível para células de hidrogênio (Kotay & Das, 2008);

(3) Quando em combustão, não contribui com emissões de GEE, chuva ácida ou degradação da camada de ozônio, o único subproduto de sua queima é água (Kotay & Das, 2008; Hallenbeck & Gosh, 2009; Acar & Dincer, 2014);

(4) Elevada eficiência na conversão, quando produzido e utilizado corretamente, pois possui 286 kJ mol⁻¹, cerca de 2,7 vezes mais energia que os hidrocarbonetos combustíveis. (Hallenbeck & Gosh, 2009; Kim & Kim, 2011; Pattra *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013);

(5) Garantir segurança energética, evitando a dependência de combustíveis oriundos do petróleo (Acar & Dincer, 2014).

Atualmente os métodos de produção de H_2 podem ser divididos em processos físico-químicos e biológicos (Wang *et al.*, 2013). Alguns destes com grande necessidade energética para que aconteça e outros que não se tratam de processos renováveis. Vale ressaltar que a eletrólise da água, possui dois inconvenientes: necessita de elevada quantidade de energia para que ocorra, resultando em eficiência energética máxima de 65%, além de produzir H_2 de qualidade questionável, utilizando para tanto, energia de elevada qualidade; eletricidade (Hallenbeck, 2009).

Outros processos físico-químicos de produção de H_2 são a reforma a vapor de hidrocarbonetos (geralmente gás natural) e a gaseificação de carvão. A produção destas duas representa mais de 90% do H_2 produzido atualmente e utilizam para isso, combustíveis de origem fóssil, elevadas temperaturas e pressão (Kim & Kim, 2011).

Contudo, a sustentabilidade do processo deve ser verificada, pois produzir o combustível potencialmente substituto das demais fontes energéticas a custo energético

demasiadamente alto não atende os anseios desta alternativa. Assim uma opção para esse entrave é a produção biológica do H_2 por meio da fermentação microbiológica desenvolvida na digestão anaeróbia com a supressão da metanogênese.

O processo de digestão anaeróbia se conclui na produção de CH_4 e CO_2 , porém, com alteração de alguns fatores e aplicação de algumas técnicas esse processo pode ser interrompido em fases que antecedem a metanogênese. Esse é o princípio para a produção de H_2 por meio da fermentação, que pode utilizar resíduos orgânicos como fonte de carbono, atendendo assim duas demandas atuais; produção de energia e tratamento da carga orgânica de efluentes em geral (Wang, 2009; Wang *et al.*, 2013).

O âmbito futuro da sociedade ambientalmente sustentável irá depender do desenvolvimento da tecnologia de produção biológica de hidrogênio, pois como esse processo somente depende de luz solar e água, no caso da utilização de biomassa, representa uma fonte infinita de energia, a baixo custo e sem contribuir para com as mudanças climáticas (Kim & Kim, 2011; Show *et al.*, 2012)

Segundo Hallenbeck e Ghosh (2009), o processo de fermentação de águas residuárias ricas em carboidratos possui grande variedade de microrganismos adaptados a condições específicas, produzindo H_2 e outros compostos químicos, principalmente ácidos orgânicos (láctico, acético, butírico, etc.) e álcoois (etanol, butanol, etc.), sendo que a distribuição destes é condicionada à espécie microbiana, estado de oxidação do substrato e algumas condições ambientais (pH, pressão parcial de H_2).

Kim e Kim (2011) afirmam que os microrganismos produzem H_2 por dois principais motivos. O primeiro para disposição extracelular do excesso de equivalentes reduzidos (elétrons) produzidos durante a fermentação ou atividade anóxica fotossintética. Em segundo lugar, o H_2 é um subproduto da ação da nitrogênase, enzima empregada na fixação de N_2 .

Além da produção de H_2 , como já citado, há produção de compostos reduzidos, ácidos e álcoois, dos quais Guo *et al.* (2014) ressalta o acetato, butirato, propionato, etanol e ácido láctico.

A glicose possui estrutura química potencialmente produtora de 12 mol de H_2 por mol, porém, assim como enfatizam Hallenbeck e Benemann (2002), o maior desafio é melhorar a produção real deste composto. Em termos termodinâmicos, como mostra a Figura 3.3, há possibilidade de produzir 4 mols de H_2 por mol de glicose (Hallenbeck & Benemann, 2002; Chin *et al.*, 2003; Nath & Das, 2004; Ren *et al.*, 2006). Porém, esse rendimento está condicionado à espécie de microrganismos e ao metabólito produzido.



Figura 3.3. Esquema simplificado da decomposição da glicose no interior da célula microbiana

NAD⁺: nicotinamida adenina dinucleotídeo (oxidado); NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo (reduzido); Fd: ferrodoxina; CoA: coenzima A. Fonte: Adaptado de Kim e Kim (2011)

Assim como mostra a Figura 3, após a entrada da molécula de glicose no interior da célula, este sofre a glicólise; transformação deste açúcar em dois mols de piruvato pela rota Embden-Meyerholf (Jones & Wood, 1986).

Partindo de dois mols de piruvato há possibilidade de produzir dois mols de propionato, porém, como fica evidente na Figura 3.3, haverá a oxidação de quatro NADH, o que representa em outras palavras o consumo de quatro elétrons, os quais formariam dois mol de H_2 (rota geralmente utilizada como forma de regenerar NADH em elevadas pressões parciais de H_2). Ou seja, para a produção de propionato como metabólito final, não há produção de H_2 , assim como descreve a Equação 1.

$$C_6H_{12}O_6 + 2H_2 \rightarrow 2CH_3CH_2COOH + 2H_2O$$
(1)

Acetil-CoA é um composto chave, podendo ser convertido a acetato, etanol (Equação 2), butirato, butanol entre outros. A produção de acetato a partir da acetil-CoA

se dá sem necessidade de oxirredução resultando assim na produção de dois mols de acetato e quatro mols de H_2 (Equação 3)

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CH_2OH + 2CO_2 \tag{2}$$

$$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COOH + 2CO_2 + 4H_2$$
(3)

O butirato e o butanol também podem ser produzidos a partir da acetil-CoA, sendo que esta deve passar por acetoacetil-CoA e butiril-CoA, oxidando dois mols de NADH (acetoacetil-CoA para butiril-CoA). Para resultar em butirato, a butiril-CoA não depende de reações de oxirredução, produzindo assim um mol de butirato e dois mols de H_2 (Equação 4). Porém, quando o produto final é o butanol, há oxidação de dois NADH, produzindo assim somente um mol de butanol (Equação 5).

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3(CH_2)_2COOH + 2CO_2 + 2H_2$$
(4)

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3(CH_2)_2CH_2OH + 2CO_2 + H_2O$$
(5)

A produção de baixas quantidades de H_2 se trata da adaptação microbiana para obter maior eficiência na produção de biomassa celular, pois a porção de piruvato destinada à produção de compostos, ácidos ou solventes, é a mesma utilizada na síntese de ATP, desde o intermediário acetil-fosfato, para atendimento de suas necessidades, além da capacidade de produzir uma variedade de compostos reduzidos (etanol, butanol e ácido butírico) que permitem a regeneração de NADH, importante para a continuação da glicólise (Hallenbeck & Benemann, 2002; Nath & Das, 2004; Hallenbeck, 2009; Hallenbeck & Gosh, 2009).

Assim como citado, teoricamente, a classe de microrganismos com possibilidade de produzir quatro mols de H_2 por mol de glicose é a que enquadra as bactérias anaeróbias estritas, sendo o gênero *Clostridium* um dos principais representantes. Partindo dessa premissa, Show *et al.* (2012) realizaram pesquisa sobre esse gênero, observando rendimentos entre 1,1 e 2,6 mol H_2 mol⁻¹glicose, confirmando que o cenário real é muito distinto do teórico, justamente pela soma de diversos fatores influentes na produção de H_2 . Porém, apesar destes entraves de rendimento (produção real de H_2 representar menos
de 50% do teórico) essa é uma alternativa para diversificação de setores que possuem compostos ricos em carboidratos.

3.5.Potencial alternativa ao setor sucroalcooleiro: produção de H₂ a partir de seus subprodutos

Assim como citado pela literatura e relatado anteriormente, a maximização da atividade econômica da indústria sucroalcooleira depende diretamente da diversificação de sua produção, ofertando um maior espectro de produtos de elevado valor agregado. A produção de outras formas de energia, distintas do etanol, é uma ótima opção, sendo que o H_2 uma das mais nobres destas.

3.5.1. Produção de H₂ a partir de sacarose

A sacarose é um dos produtos mais populares da indústria sucroalcooleira, juntamente com o etanol, sendo utilizada na indústria alimentícia, química e residências. A sacarose ou 1-O-(β -D-Frutofuranosil)- α -D-glicopiranose é composta por frutose e glicose unidas por uma ligação glicosídica (Figura 3.4), sendo classificada como um poliol (Ferreira, 1995), com oito grupos hidroxilas reagentes, três primários (6, 1' e 6') e cinco secundários (2, 3, 4, 3' e 4') (Boscolo, 2003).

Figura 3.4. Estrutura química da sacarose



Fonte: Boscolo (2003)

Muitos dos trabalhos fundamentais, realizados com culturas puras e/ou substratos simples, utilizaram a sacarose como fonte de carbono.

Lin e Lay (2004), estudaram a influência da relação carbono/nitrogênio (C/N) na produção de hidrogênio, utilizando para isso um reator de mistura contínua (CSTR), com TDH de 12h, inoculado com lodo anaeróbio de estação de esgoto pré-tratado

termicamente, alimentado com água residuária sintética a base de sacarose com concentração afluente de 20.000 mg DQO L⁻¹, com variação da relação C/N entre 40 e 130. Obtiveram o máximo HY (4,8 mol H₂ mol⁻¹ de sacarose) com C/N de 47, reduzido para cerca de 50% quando C/N foi reduzida para 40 ou aumentada para 98. Para PVH e PVHE o comportamento foi diferente, obtendo 270 mmol H₂ L⁻¹ d⁻¹ e 110 mmol H₂ g⁻¹ SSV d⁻¹, respectivamente, para C/N entre 47 e 98. Segundo estes autores, essa discrepância está relacionada aos diferentes significados de cada um destes indicadores, com o HY exibindo a quantidade de H₂ produzida em relação à degradação de uma porção de carboidrato, sendo que a PVH e PVHE demonstram a eficiência da fermentação. Os principais metabólitos produzidos foram acetato, butirato e propionato, com uma prevalência de butirato, o que remete a via butílica como principal rota para os valores iniciais de C/N. Com o incremento da C/N, houve uma mudança do metabólito de prevalência, passando ao acetato e assim com consequente mudança de via metabólica.

Wang *et al.* (2005) utilizaram metodologia de superfície de resposta para analisar a influência, independente e interação, do pH, temperatura e concentração do substrato na produção de H₂ e ácidos voláteis a partir de água resíduária a base de sacarose com adição de solução de nutrientes suplementar. O reator utilizado foi um CSTR de 3,01 L, inoculado com lodo proveniente de reator de manta de lodo (UASB) pré-tratado termicamente. Relataram a ótima condição para maximização da produção de H₂ com pH 5,5, temperatura 35,1 °C e concentração de sacarose de 26.000 mg L⁻¹, atingindo o rendimento de 3,73 mol H₂ mol⁻¹sacarose. Porém, para a máxima produção de ácidos voláteis as condições são diferentes; pH 5,6, temperatura de 33,5 °C e concentração de substrato de 24.200 mg L⁻¹, os quais são próximos as condições para produção maximizada de butirato; pH 5,5, temperatura de 33,1 e concentração de substrato de 24.200 mg L⁻¹. Os autores concluíram que a interação entre a temperatura e o pH para a produção de H₂ e ácidos voláteis foi significativa, assim como não houve interação entre concentração de sacarose e pH ou temperatura.

Wu *et al.* (2007), operaram RALF e Leito fixo com o objetivo de produzir H₂ e etanol. Para tanto, utilizaram sacarose, glicose e frutose como fonte de carbono, avaliando qual expressaria melhores produtividades. Utilizaram polietileno como material suporte para imobilização da biomassa, a concentração do substrato foi de 20.000 mg DQO L⁻¹. O inóculo utilizado foi obtido em estação de tratamento de esgoto, submetido à pré-tratamento ácido. Os sistemas foram operados em temperatura de 35°C, com variação da velocidade ascensional (0,55-0,91 cm s⁻¹) no caso do RALF e para o Leito fixo foi

estabelecido um único TDH (4h). O pH do afluente foi mantido em 6. Os melhores resultados foram obtidos para o RALF, sendo que a máxima concentração de H₂ (38%) e máximo rendimento de H₂ (HY) (1,04 mol H₂ mol⁻¹ hexose) foram obtidos em vel. ascensional de 0,55 cm s⁻¹, porém, a máxima PVH (59 mmol H₂ L⁻¹ h⁻¹) foi obtida em vel. ascensional de 0,91 cm s⁻¹. Os metabólitos obtidos tiveram a seguinte distribuição (%); etanol (56), ácido acético (26), ácido butírico (15), ácido propiônico (3). Sobre a diferença da produção e rendimento de H₂, os autores concluíram que as diferenças hidrodinâmicas dos reatores selecionam distintos microrganimos, os quais possuem diferentes capacidades de produzir H₂, além de haver vantagens na transferências de massas para o RALF.

Lin et al. (2009) operaram um Reator Anaeróbio de Leito Fluidificado (RALF), no intuito de avaliar as melhores condições, a respeito da concentração da água residuária e TDH para maximização da produção de H₂. Utilizam copolímero de Etileno-Acetato de Vinila (EVA) como material suporte, inóculo anaeróbio de estação de tratamento de esgoto doméstico pré-tratado termicamente, alimentado com água residuária sintética à base de sacarose e solução complementar de nutrientes. A temperatura de operação foi de 40°C, com recirculação de 5 L min⁻¹, o que garantia uma expansão do leito de 23%. As concentrações do substrato e TDH avaliados foram 5, 10, 20 e 40 g DQO L^{-1} , e 6, 4 e 2h, respectivamente. Os autores relataram que a diminuição do TDH com concentração do substrato constante (20 g DQO L⁻¹), representou um incremento na PVH, com valor máximo de 1,57 L h⁻¹ L⁻¹, porém, decréscimo do HY, variando entre 4,26 e 1,1 mol H₂ mol^{-1} sacarose. Sobre a influência da concentração do substrato na produção de H₂, os autores descrevem o mesmo comportamento em relação ao TDH, com valores máximos $(1,80 \text{ L} \text{ h}^{-1} \text{ L}^{-1})$ de PVH quando alimentado com substrato de 40 g DQO L⁻¹ e HY variando entre 4,26 e 2,41 mol H₂ mol⁻¹sacarose. Em respeito aos metabólitos solúveis, os autores descreveram uma prevalência do ácido Butírico (HBu) em todas as fases do experimento, caracterizando a via metabólica utilizada pelos microrganismos, e evidencia a não dependência desta pelos fatores analisados no trabalho.

Com o objetivo de verificar a influência do volume do reator, taxa de recirculação, pH e temperatura na PVH e HY, Obazu *et al.* (2012) operaram 5 reatores anaeróbios de leito granular fluidizado (RALGF). As temperaturas avaliadas foram 45, 60, 65 e 70°C. O volume dos reatores variaram entre 19,1 e 5,74 L e taxas de recirculação avaliadas foram 3,5 e 3,2 L min.⁻¹, resultando em índice volume do reator/recirculação (V/R) de 5,46 a

1,79 minutos. O material suporte utilizado para estimular a granulação da biomassa no interior do reator foi carvão vegetal granular. A água residuária sintética foi composta por 17.800 mg L⁻¹ de sacarose e meio nutriente. Os sistemas anaeróbios foram inoculados com uma mescla de lodo mesofílico e estrume bovino fresco. A concentração máxima de H₂ no biogás (82%) e máxima PVH (420 mmol L⁻¹ h⁻¹) foram obtidas quando a junção dos fatores temperatura (70°C), pH 5,5 e relação V/R foi de 3,61. Porém, para máximo HY (3,55 mol H₂ mol⁻¹ de glicose), a relação V/R foi de 1,79 – mínimo volume do reator e 3,2 L min.⁻¹. Segundo os autores, esses dados reforçam o que relata a literatura; a maximização da produção de H₂ – PVH e HY - está condicionada, principalmente, à temperatura e taxa de recirculação, sendo que o arranjo de maior produção (231,3 mmol H₂ L⁻¹ h⁻¹) e rendimento (3,55 mol H₂ mol⁻¹ glicose) foi obtido nas condições de 70°C e V/R de 1,79.

Muñoz-Páes *et al.* (2013), avaliaram dois reatores anaeróbios de leitos fluidificados (RALF) submetidos à duas diferentes temperaturas – 35°C e ambiente. O substrato utilizado possuía duas diferentes concentrações de sacarose (5 e 8 g de sacarose L⁻¹), definindo as duas fases de operação, além de complemento de macro e micronutrientes. Utilizaram carvão vegetal como material suporte para imobilização da biomassa. A inoculação dos reatores se deu com lodo de digestor anaeróbio metanogênico, operado em faixa mesofílica de temperatura. Os sistemas foram operados em único TDH (24h). Os melhores resultados foram obtidos para o RALF operado em temperatura ambiente, sendo a máxima concentração de H₂ (56%) e PVH (41,1 mmol L⁻¹ h⁻¹) foram obtidos em concentração de 8 mg sac. L⁻¹. Os metabólitos obtidos tiveram a seguinte distribuição (mg L⁻¹); etanol (88,3), ácido acético (1,173), ácido butírico (2,097), ácido propiônico (0,318) e butanol (0,089). Vale ainda ressaltar que o incremento de 5.000 para 8.000 mg sac. L⁻¹ possibilitou o aumento de 21 e 17 vezes na produção de H₂ para os reatores de temperatura ambiente e mesofílico, respectivamente. Além de ficar evidente a produção, cerca de 2 vezes maior, para o reator operado em temperatura ambiente.

Sá *et al.* (2013) avaliou a influência do pré-tratamento do inóculo na produção de H_2 , avaliando o tratamento térmico, tratamento ácido e básico, em reatores CSTR de 100 mL, inoculados com lodo de estação de tratamento de esgoto doméstico pré-tratado. O substrato utilizado foi à base de sacarose, com concentração de 10.000 mg L⁻¹ e adição de micronutrientes suplementar. A sacarose foi completamente consumida após 120h, porém, como era previsto, o inóculo sem pré-tratamento consumiu em tempo inferior (48h) aos inóculos pré-tratados, segundo os autores, por possuir um número maior de

microrganismos. O inóculo acidificado teve um consumo semelhante ao sem tratamento, o inóculo alcalinizado teve um consumo mais lento, somente superior ao pré-tratado termicamente, o qual possui a cinética de consumo mais lenta dos 4 avaliados. Na produção de H₂, o tratamento térmico se demonstrou mais promissor, com HY máximo de 4,62 mol H₂ mol⁻¹sacarose atingido em 72h, cerca de 21% maior que o HY máximo obtido pelo inóculo sem tratamento. Sobre os metabólicos presentes, notaram a produção de ácido acético (HAc) e ácido butírico (HBu), com uma prevalência do butírico, o que aponta para sua rota metabólica. A presença destes dois compostos possibilita a análise da relação HAc/HBu frente ao HY, da qual os autores concluem que para valores maiores desta relação (maiores ou próximos a 1) são os pontos de maior rendimento. Com base nas análises microbiológicas, os autores concluíram que, assim como relatam na literatura, há um prevalência do gênero *Clostridium* sp., após 72h, por terem a capacidade de esporular.

Gomes *et al.* (2015), avaliaram a influência de múltiplos tubos longitudinais na produção de H₂ em reator de leito fixo. O substrato empregado foi a base de sacarose (2.000 e 4.000 mg DQO L⁻¹) com complementação de macro e micronutrientes. Os 12 tubos de PVC fixados longitudinalmente possuíam suas paredes internas lixadas, para possibilitar a fixação dos microrganismos. Além desta estrutura, foi avaliado o benefício de leito fixo composto por polipropileno. O inoculo foi obtido pela auto fermentação do substrato, com operação em faixa mesofílica de temperatura (25°C). O sistema foi operado em TCO de 24 kg DQO m⁻³ d⁻¹, com TDH de 2 e 4h. Os melhores valores de conversão de sacarose (73,8) e HY (2,0 mol H₂ mol⁻¹sac.) foram obtidos quando operado com concentração de 2.000 mg DQO L⁻¹, TDH de 2h e presença de leito fixo. A máxima concentração de H₂ (71,6%) no biogás foi produzida quando operado em concentração de 2.000 mg DQO L⁻¹, TDH de 2h e ausência de leito fixo. Porém, para a máxima conversão de DQO (19,2%) e PVH (44,1 mL h⁻¹ L⁻¹) foram mensurados quando em concentração de 4.000 mg DQO L⁻¹, TDH de 4h e presença de leito fixo.

Com base na literatura atual e Tabela 3.1, pode-se notar a necessidade de avaliar a aplicação da sacarose em reatores de alta taxa operados em temperaturas termofílicas, com o objetivo de verificar a aplicabilidade destes parâmetros operacionais a este substrato, que juntamente com a glicose, representam os substratos-base da produção de H_2 por fermentação escura.

Reator	Conc. (mg DQO L^{-1})	Material suporte	Temp. (°C)	TDH (h), recirculação (L min ⁻¹) ou Vup (cm s ⁻¹)	Autor (ano)
RALF Leito fixo	20.000	Polietileno	35	0,55-0,91 cm s-1 4	Wu <i>et al.</i> (2007)
RALF		Carvão ativado	37	9,3 e 4,6	Thompson <i>et</i> <i>al.</i> (2008)
RALF	5.000 - 40.000	Etil vinilacetato	40	6,4 e 2	Lin <i>et al.</i> (2009)
RALF	20.000	Carvão ativado	45 e 70	1,3 e 3,5 L min-1	Ngoma <i>et al.</i> (2011)
UASB	10.000	Grânulo	55	50, 24, 16, 12	Dong <i>et al</i> . (2011)
RALF	20.000	Carvão vegetal	45-70	1,6	Obazu <i>et al.</i> (2012)
Leito fixo	2.000	Polietileno	25	2	Fontes Lima e Zaiat (2012)
RALF	5.000 e 8.000	Carvão vegetal	ambiente 35°C	24	Muñoz-Páez et al. (2013)
Leito fixo	2.000	Polietileno	25	2	Anzola-Rojas <i>et al.</i> (2015)
UASB	2.000	Grânulo	55	12, 6 e 2	Braga <i>et al.</i> (2015)
Frasco	2.000 e 4.000	Polipropileno	25	2 e 4	Gomes <i>et al</i> . (2015)

Tabela 3.1. Resumo dos estudos de produção de H₂ com substrato a base de sacarose

3.5.2. Produção de H₂ a partir de caldo de cana-de-açúcar

Oriundo da moagem da cana-de-açúcar, o caldo é o composto-base de toda a cadeia sucroalcooleira. Trata-se de um líquido esverdeado, rico em açúcares, segundo Plangklang *et al.* (2012) cerca de 200 g de sacarose L^{-1} , além de possuir pequenas quantidades de glicose e frutose, o que lhe confere características organolépticas agradáveis.

Segundo Mantelatto (2005) a composição química do caldo pode variar em função de uma série de fatores como variedade, estado de maturação, clima, região, idade, tipo de solo, adubação, presença de inflorescência entre outros fatores. Apesar destas variáveis, a Tabela 3.2 traz a caracterização média do caldo de cana-de-açúcar.

	5
Constituintes do Caldo	% Sólidos Solúveis
1. Açúcares	75-93
1.1. Sacarose	70-91
1.2. Glicose	2,0-4,0
1.3. Frutose	2,0-4,0
2. Sais	3,0-5,0
Ácidos inorgânicos	1,5-4,5
 Ácidos orgânicos 	1,0-3,0
4.1. Ácidos carboxílicos	1,1-3,0
4.2. Aminoácidos	0,5-2,5
5. Proteínas	0,5-0,6
6. Amido	0,001-0,05
7. Gomas	0,3-0,6
8. Ceras e graxas	0,05-0,15
9. Corantes e outros	3,0-5,0

Tabela 3.2. Caracterização geral do caldo de cana-de-açúcar

Fonte: Mantelatto, 2005

De acordo com Mantelatto (2005), os elementos inorgânicos estão presentes no caldo em quantidades significativas (entre 3 e 5% dos sólidos solúveis). Segundo esse mesmo autor, os principais cátions são: potássio, cálcio, ferro, alumínio, sódio, magnésio, manganês, cobre, zinco e boro, sendo os principais ânions os fosfatos, cloretos, sulfatos, nitratos, silicatos, oxalatos e outros. O potássio é o elemento que aparece em maior quantidade, constituindo cerca de 60% do total presente nas cinzas.

Alguns países produtores de cana-de-açúcar possuem o mercado de produtos oriundos desta cadeia muito restrito, assim como relata Pattra *et al.* (2011) sobre o cenário sucroalcooleiro na Tailândia, onde existe cerca de 960.000 ha cultivados, em sua maioria com único objetivo; produção de açúcar. Por se tratar de uma cultura robusta e com alta capacidade de produção de um caldo constituído por açúcares de fácil fermentação, além de diversos nutrientes e compostos, o caldo de cana-de-açúcar tem sido empregado em pesquisas na área de bioenergias (fato consolidado no Brasil com a produção de etanol), sendo a produção de H₂ uma delas.

Roychowdhury *et al.* (1988), avaliou a possibilidade de produzir H_2 a partir de substratos reais e substratos simples (mono e polissacarídeos). Utilizaram para tanto, culturas mista, sedimento de aterro sanitário e lodo de estação de tratamento de esgoto, e culturas puras, *Citrobacter freundii* e *Escherichia coli*. Os ensaios foram realizados em batelada e temperaturas de 37°C para culturas puras e 55°C para culturas mistas. O pH afluente foi de 5,5. Para os ensaios com caldo de cana, a concentração de H₂ mais

representativa (48%) foi no 7° dia, com pH reajustado para 7,1. Para os substratos simples, obtiveram maior concentração de H₂ (30%) para cultura mista em concentração de glicose de 1,5%. Em relação à maltose, a maior concentração de H₂ no biogás (53%) foi obtida com concentração de 5% de açúcar. Com isso, os autores ressaltaram a importância do pH, do inóculo, da temperatura ideal para esse inóculo e da concentração do substrato.

A fim de comparar a produção de H_2 por diferentes espécies bacterianas fotossintéticas, Singh *et al.* (1994), avaliaram 4 cepas de *Rhodopseudomonas* sp. em diferentes substratos e temperaturas. O pH afluente foi 6,8. Como suporte para imobilização da biomassa foi utilizado alginato de cálcio. Em relação ao desempenho bacteriano condicionado pelo substrato utilizado, o caldo de cana-de-açúcar proporcionou as maiores produções. A espécie mais produtiva, em 33°C em cultivo suspenso e imobilizado, foi a nomeada como cepa 4, produzindo 47 e 72 µL H₂ h⁻¹ mg⁻¹ célula seca, respectivamente. O mesmo resultado se obteve quando cultivadas em 45°C, produzindo 58 e 88 µL H₂ h⁻¹ mg⁻¹ célula seca, respectivamente. Concluíram que a utilização de compostos agrícolas, caldo de cana-de-açúcar, extrato de batata e proteína de leite, podem ser boas fontes de carbono para a produção de H₂, sendo que o arranjo ideal deste sistema produtivo depende da escolha da espécie utilizada, a imobilização bacteriana, do substrato e da temperatura.

Pattra *et al.* (2011), avaliaram o desempenho do CSTR, não esterilizado e inoculado com *Clostridium butyricum* TISTR 1032, em regime contínuo, utilizando como substrato água residuária com 25.000 mg DQO L⁻¹ baseada em caldo de cana-de-açúcar e micronutrientes. Mantida temperatura e pH constantes, 37° C e 6, respectivamente. Submeteram o sistema a 5 diferentes TDH, 36, 24, 12, 6 e 4h. A PVH e o HY aumentaram com o decréscimo do TDH, atingindo 3,38 mmol H₂ L⁻¹ d⁻¹ e 1,0 mol H₂ mol⁻¹ de hexose consumida, em TDH de 4 h. A concentração de H₂ no biogás variou entre 45 e 17%, não condicionada pelo TDH. O gênero *Clostridium* sp. permaneceu dominante nas fases de maior produção, sendo relatada como a principal causa da elevada produção de H₂, a qual utilizou a via butílica, característica deste gênero.

Plangklang *et al.* (2012) analisaram a influência da imobilização da biomassa na produção de H_2 , utilizando para isso frascos de 100 mL, inoculados com 7g de células livres de *Clostridium butyricum* TISTR 1032 e frascos de 2 L inoculados nas mesmas proporções, porém, com os microrganismos imobilizados na parte sólida residual desta mesma indústria (bagaço de cana-de-açúcar). Alimentado com água residuária à base de

caldo de cana-de-açúcar, com concentração de açúcares totais de 210 g L⁻¹, além de cisteína e micronutrientes. O experimento foi realizado à temperatura de 37 °C, em bateladas continuadas com TDH de 6 h, concentração do substrato de 20.000 a 40.000 mg DQO L⁻¹. O pH inicial do substrato dos frascos com células em suspensão foi entre 4,5 e 7, porém os frascos com microrganismos imobilizados, o pH foi controlado em 6,5. Esta espécie bacteriana em suspensão se mostrou mais produtiva em pH próximo ao neutro (entre 6,5 e 7), produzindo 3,0 L H₂ L⁻¹ d⁻¹ com HY de 1,33 mol H₂ mol⁻¹hexose. A produção de H₂ foi incrementada entre 20.000 e 25.000 g DQO L⁻¹, decrescendo em concentrações superiores a esse valor. Quando imobilizada, essa espécie produziu consideravelmente (2 L H₂ L⁻¹ d⁻¹) nas condições em que os reatores de biomassa livre haviam reduzido sua produção; pH entre 4,5 e 5 e concentração de substrato de 35 a 40 g DQO L^{-1} , ressaltando assim que a imobilização possibilita a produção em faixa mais ampla de pH e com elevadas concentrações de substrato. As máximas PVH e HY obtidas para as culturas imobilizadas foram de 3,50 L H₂ L⁻¹ d⁻¹ e 1,34 mol H₂ mol⁻¹ hexose, em pH 6,5 e concentração de 25.000 mg DQO L⁻¹. Isso os levaram a concluir que culturas imobilizadas tem produção de H_2 melhorada em cerca de 20%, além de produzirem em condições mais agressivas de pH e concentração do substrato.

Apesar dos poucos trabalhos de produção de H_2 utilizando caldo de cana-de-açúcar, nota-se a carência de pesquisas em temperaturas mais elevadas, faixa termofílica, as quais são tidas como mais produtivas para a grande maioria dos substratos (Tabela 3.3). Outro aspecto que vale ressaltar é a operação em reatores com biomassa imobilizada, os quais possuem vantagem produtiva quando comparados à biomassa em suspensão (Plangklang *et al.*, 2012). Surgindo assim a possibilidade de unir esses dois parâmetros operacionais (temperatura termofílica e biomassa imobilizada) para proporcionar um avanço na produção de H_2 a partir deste composto.

Reator	Concentração (mg DQO L ⁻¹)	Inóculo	Material suporte	Temperatura . (°C)	Autores (ano)
Frasco	-	Aterro, esgoto doméstico e cultura pura	-	30	Roychowdhury et al. (1988)
Frasco	-	Rhodopseudomonas sp.	Alginato de cálcio	33 e 45	Singh <i>et al.</i> (1994)
CSTR	25.000	Clostridium butyricum	-	37	Pattra <i>et al.</i> (2011)
Frasco	20.000-40.000	Clostridium butyricum	Bagaço de cana	37	Plangklang <i>et</i> <i>al.</i> (2012)

Tabela 3.3. Resumo da literatura sobre produção de H_2 a partir de caldo de cana-de-açúcar

3.5.3. Produção de H₂ a partir de melaço

Considerado um subproduto oriundo da produção de açúcar, o melaço é constituído de açúcares e não açúcares, separados pela adição de compostos químicos como compostos sulfurosos, cal (CaO) entre outros (Ensinas *et al.*, 2009). Segundo Waal *et al.* (2009), o melaço resulta do processo inicial de produção, sendo extraído após a concentração e cristalização do caldo de cana-de-açúcar.

Em geral, esse composto é utilizado dentro da própria indústria sucroalcooleira na produção de etanol (Ensinas *et al.*, 2007), sendo fermentado separadamente ou em conjunto com o caldo de cana, fato esse que influencia diretamente no rendimento e composição dos compostos subsequentes.

Por se tratar de um composto rico em açúcares e nutrientes (Tabela 3.4), há trabalhos realizados com o intuito de verificar a viabilidade energética deste em outros processos, na tentativa de viabilizar uma possível alternativa a esse subproduto, sendo uma delas a fermentação escura para produção de H_2 .

Componente	(%)	Componente	(%)
Açúcares totais	45-58	P_2O_5	0,02-0,07
Matéria seca	78-85	SiO ₂	0,1-0,5
COT ^a	28-34	Al ₂ O ₃	0,05-0,06
NKT ^b	0,2-2,8	Fe ₂ O ₃	0.001-0,02
CaO	0,15-0,8	MgO	0.01-0.1
K ₂ O	2,2-4,5	Cinzas	4 a 8

Tabela 3.4. Composição do melaço relatado pela literatura atual

^aCarbono orgânico total ^bNitrogênio kjeldahl total

Fontes: Ren et al., 2006; Han et al., 2012a; 2012b; Wang et al., 2013.

Ren *et al.* (1997) efetuou experimento com o intuito de solidificar a rota fermentativa etanólica para a produção de biohidrogênio. Para isso utilizou uma água residuária composta por melaço de um indústria produtora de açúcar a partir de beterraba, com concentração de 5.400 a 23.300 mg DQO L⁻¹ e relação DQO:N:P de 800:5:1. Utilizaram o CSTR inoculado com biomassa oriunda de lodo ativado, pré-tratado com aeração e operado em temperatura de 30°C com TCO de 19,4 e 107 kg DQO m⁻³ d⁻¹ e TDH de 3,6 a 4,6h. Houve o estabelecimento da rota fermentativa etanólica, caracterizada pela maior parte (acima de 60%) dos metabólitos ser composta por etanol e acetato, sendo que obtiveram os seguintes compostos dissolvidos: etanol (50), acetato (35), butirato (5),

propionato (2,5), valetato (2,2) e lactato (5,3%). A concentração máxima de hidrogênio no biogás foi de 49,5% e faixa de pH de 4,3 a 4,9, sendo que seu ótimo foi 4,5.

Ren *et al.* (2006) realizou estudo com o objetivo de verificar o efeito da TCO e do TDH na produção de biohidrogênio a partir de melaço da indústria açucareira em reator fermentativo de fluxo contínuo em escala piloto. Para isso utilizou água residuária composta por melaço, com concentração de 3000 mg DQO L⁻¹ e relação DQO:N:P de 200-300:5:1. O inóculo empregado foi obtido de lodo de estação de tratamento de esgoto local. A temperatura de operação foi 35°C (mesofílica) com TCO de 3,11 a 85,57 kg m⁻³ d⁻¹ e TDH de 10,57 a 3,9 h. Houve predomínio da rota etanólica, caracterizada pela elevada concentração de etanol e acetato dentre os metabólitos, obtendo os seguintes compostos dissolvidos: etanol (60), acetato (35), butirato (2,5), propionato (2), pentanoato (0,5%). O pH do reator ficou em torno de 4,5, resultando em concentração máxima de hidrogênio no biogás de 52% e máxima PVH de 5,57 m³ H₂ m⁻³ d⁻¹, quando operado em TCO de 68,21. Verificaram aumento do rendimento de hidrogênio (HY) até o máximo de 8,25 m³ d⁻¹ quando a TCO foi aumentada de 6,32 a 68,21 kg DQO m⁻³ d⁻¹, sendo que valores superiores a esses provocaram um decréscimo do HY, até o valor de 7,38 m³ d⁻¹ na TCO máxima avaliada (85,57 kg DQO m⁻³ d⁻¹).

Li *et al.* (2007), com o objetivo de verificar o comportamento do reator anaeróbio compartimentado realizaram o experimento utilizando água residuária à base de melaço, com 5000 mg DQO L⁻¹, relação DQO:N:P de 300-500:5:1. O sistema inoculado com lodo aeróbio de cervejaria e operado em temperatura de 35°C (mesofílica) com TCO de 8,89 kg m⁻³ d⁻¹ e TDH de 13,5h. O pH do reator ficou entre 4,3 e 4,4. A concentração máxima de hidrogênio no biogás produzido foi de 54% e a remoção máxima de DQO de 9,4% resultando em uma conversão de 0,13 L H₂ g⁻¹DQO_{removida}. A PVH máxima foi de 4,33 m³ H₂ m⁻³ d⁻¹ para a TCO de 8,89 kg DQO m⁻³ d⁻¹. A rota fermentativa predominante foi etanólica, caracterizada pela maior parte dos metabólitos ser representada por etanol e acetato, sendo verificada a seguinte distribuição: etanol (35,3), ácido acético (34,4), ácido butírico (8,5), ácido propiônico (19,5) e ácido valérico (3,3%). Concluíram que o reator anaeróbio compartimentado operado com água residuária composta por melaço estabilizou a fermentação etanólica com 26 dias de operação, e demonstrou melhores resultados que o CSTR por especificação das populações microbianas de cada compartimento.

Guo *et al.* (2008), operando Reator de Leito Granular Expandido (EGSB) avaliaram o efeito da variação da TCO de 8 a 192 kg DQO m⁻³ d⁻¹, utilizando água residuária composta por melaço (2.000 a 10.000 mg DQO L⁻¹) com relação DQO:N:P de 500-1000:5:1. O inóculo utilizado foi oriundo de uma mescla de lodo aeróbio de estação de tratamento de esgotos doméstico e lodo acidogênico de planta farmacêutica na proporção 1:1 e submetido a pré-tratamento por aeração. Carvão ativado foi utilizado como suporte para os microrganismos. O sistema foi operado em temperatura de 35°C (mesofílica), TDH de 6 a 1h e pH do reator entre 4,2 e 4,4. A concentração máxima de hidrogênio no biogás produzido foi de 53%, com PVH máxima de 0,71 m³ H₂ m⁻³ d⁻¹ e HY de 3,47 mol H₂ mol⁻¹sacarose. A rota fermentativa predominante foi etanólica, caracterizada pela maior parte dos metabólitos composta por etanol e acetato, sendo que obtiveram os seguintes compostos dissolvidos: etanol (47), ácido acético (44), ácido butírico (7), ácido propiônico (1) e ácido valérico (1%). O fato de se tratar de biomassa imobilizada possibilitou o uso de cargas superiores as utilizadas em sistemas de biomassa suspensa.

Com o objetivo de aperfeiçoar o processo de produção de hidrogênio por espécie bacteriana recentemente isolada (Clostridium butyricum W5), Wang e Jin (2009) avaliaram o efeito da concentração do substrato e nitrogênio, pH, temperatura e concentração inicial microbiana. Utilizaram água residuária à base de melaço, com concentração de 20.000 a 120.000 mg_{melaco} L⁻¹ e NH₄NO₃ como fonte de nitrogênio inorgânico, sendo avaliado adições de 0 a 1,5 g L⁻¹. Em respeito ao pH, a faixa avaliada foi de 5,5 a 7,5, além de avaliarem a temperatura de 30 a 45°C (mesofílica). O sistema foi operado em bateladas. A concentração do substrato para máximo HY foi de 100.000 mg_{melaco} L⁻¹, produzindo 1,63 mol H₂ mol⁻¹hexose. A distribuição dos ácidos graxos voláteis foi de ácido butírico (68), ácido lático (17) e ácido acético (15%), resultando em rota fermentativa butírica. A suplementação de nitrogênio se mostrou pouco eficiente. Dentro da faixa de pH avaliada (5,5 a 7,5) o valor que demonstrou melhores resultados foi 6,5, resultando em maiores HY e PVH. A temperatura ideal para a produção de H_2 dentre as avaliadas (30-45°C), está na faixa entre 38 e 40°C. A concentração inicial microbiana não se mostrou influente no HY e PVH. Assim, concluíram que para a produção de hidrogênio pela Clostridium butyricum W5 a concentração do substrato influência de forma incisiva, sendo que a complementação com nitrogênio inorgânico não demonstra grandes vantagens. O pH e a temperatura são fatores extremamente importantes, sendo que a otimização do processo deve incluí-los.

Han *et al.* (2010), verificaram o efeito da imobilização da biomassa na produção de hidrogênio em CSTR. Utilizaram carvão ativado granular como suporte para essa biomassa, água residuária à base de melaço (10.000 mg DQO L⁻¹) com relação DQO:N:P de 1000:5:1. O inóculo utilizado foi lodo de estação de tratamento de esgoto doméstico, pré-tratado por aeração. Os sistemas foram operados em temperatura de 35° C (mesofílica), TCO de 8 a 24 kg m⁻³ d⁻¹ e TDH de 6h. O pH do reator foi de 4,28. A máxima PVH foi de 1,13 m³H₂ m⁻³ d⁻¹ (TCO de 24 kg m⁻³ d⁻¹) e a remoção máxima de DQO de 11,25%. A rota fermentativa predominante foi etanólica, caracterizada pela maior parte dos metabólitos ser composta por etanol e acetato (89%), sendo que obtiveram os seguintes compostos dissolvidos: etanol (48,2%), ácido acético (39,5%), ácido butírico (10%), ácido propiônico (1%) e ácido valérico (1%). Concluíram que o CSTR com biomassa imobilizada possui menos susceptibilidade a bruscas variações da TCO, suporta pH menores.

Com o intuito de verificar o efeito da imobilização da biomassa em CSTR na produção de H₂, Ren et al. (2010), avaliaram esses dois sistemas submetidos a diferentes TCO. Como suporte para imobilização da biomassa foi utilizado carvão ativado granular, água residuária à base de melaço (2.000 a 10.000 mg DQO L⁻¹) com relação DQO:N:P de 1000:5:1 e TDH de 6h, resultando na variação de TCO de 8 a 40 kg m⁻³ d⁻¹. Os sistemas foram inoculados com lodo de estação de tratamento de esgoto doméstico, prétratado por aeração. A temperatura utilizada para operação dos sistemas foi de 35°C (mesofílica). O pH do reator e a máxima PVH se mostraram condicionado ao fato da biomassa estar ou não imobilizada, variando entre 4,5 - 4,8 e 3,8 - 4,4 para pH, e 6,65 e 9,72 m³ H₂ d⁻¹ m⁻³ para PVH, no CSTR suspenso e imobilizado respectivamente. A rota fermentativa predominante foi etanólica, caracterizada pela maior parte dos metabólitos ser composta por etanol e acetato (80-85%), sendo que os metabólicos também foram distintos segundo a forma de crescimento da biomassa. As conclusões alcançadas pelos autores são atribuídas ao fato da imobilização, sendo que essa característica atribuiu capacidade de produzir em elevadas cargas orgânicas, possuir menor variação da composição dos metabólitos e suportar pH inferiores, justificada pela resistência à transferência de massa dessa forma de crescimento (imobilizada).

Chang *et al.* (2011) avaliaram o efeito da TCO na produção de H₂ em CSTR. Para tanto, utilizaram água residuária a base de melaço (2.000 a 10.000 mg DQO L^{-1}) com relação DQO:N:P de 300-500:5:1. O inóculo utilizado foi originário de lodo de estação de

tratamento de esgoto, sem pré-tratamento. O sistema foi operado em temperatura de 35°C (mesofílica), TCO de 20 a 44 kg m⁻³ d⁻¹ e TDH de 6h. A produção de gases nos primeiros 24 dias foi composta por CO₂, H₂ e CH₄, sendo utilizado como artifício para a supressão metanogênica a elevação da concentração do substrato (de 5.000 para 7.000 mg DQO L⁻¹) e incremento adicional de inóculo (97,4; 129,5; 73,5; 51,0; 40,9 e 53,6 g MLVSS). A máxima concentração de H₂ no biogás foi de 44%, quando em TCO de 28 kg m⁻³ d⁻¹. A máxima PVH foi de 3,51 m³H₂ d⁻¹ m⁻³, obtida com TCO de 44 kg m⁻³ d⁻¹. A conversão máxima de DQO (0,58 L H₂ g⁻¹ DQO_{removida}) e o melhor HY (1,40 mol H₂ mol⁻¹glicose) foram obtidos em TCO de 44 kg m⁻³ d⁻¹. A rota fermentativa predominante foi etanólica, caracterizada pela maior parte (90,9%) dos metabólitos ser composta por etanol e acetato. O pH do reator permaneceu em 4,7.

Com o objetivo de avaliar as características relacionadas à produção de hidrogênio a partir de melaço e soro de queijo (20.000 mg DQO L⁻¹) por bactérias hipertemofílicas, Cappelletti *et al.* (2012) realizaram experimentos em batelada, com 4 cepas do gênero *Thermotoga (T. neapolitana, T. marítima, T. naphtophila, T. petrophila*) em crescimento suspenso e imobilizadas em suportes comerciais cerâmicos e vidro sinterizado. O sistema foi operado em temperatura de 77°C (hipertermofílica) e pH inicial de 8,5. O material suporte cerâmico proporcionou melhor fixação da comunidade bacteriana e garantiu produção de H₂ cerca de 10 vezes maior que os demais. Dentre as 4 cepas bacterianas avaliadas, a mais produtiva foi a *T. neapolitana*. A PVH produzida por esta cepa a partir do melaço se mostrou superior, sendo aproximadamente 1,8 mmol H₂ L⁻¹_{meio} d⁻¹. O máximo HY foi justamente com essa configuração (*T. neapolitana* e melaço) produzindo 2,95 mol H₂ mol_{monossacarídeo consumido}, valor esse que representa 74% da máxima teórica.

Mariakakis *et al.* (2012) operaram CSTR com recirculação, com o objetivo de verificar o efeito do TDH e TCO na produção de hidrogênio. Para isso utilizaram água residuária à base de melaço (63.000 e 101.000 mg DQO L⁻¹). Os reatores foram inoculados com lodo anaeróbio de estação de tratamento de esgoto, pré-tratado termicamente. O sistema foi operado em temperatura de 37°C (mesofílica), com TCO de 11,6 a 69,6 kg_{sac}. m⁻³ d⁻¹ e TDH de 96 a 8h. A máxima produção de H₂ foi de 2,42 L h⁻¹, obtida com TCO de 36,1 kg_{sac}. m⁻³ d⁻¹ e TDH 12h. A máxima concentração de H₂ no biogás foi 35%, quando operado em TCO 69,6 kg_{sac}. m⁻³ d⁻¹ e TDH de 96h. Não foi possível determinar a rota fermentativa predominante, pois houveram muitas oscilações, porém, em sua fase mais produtiva (TCO de 36,1 kg_{sacarose} m⁻³ d⁻¹ e TDH de 8h) houve

predominância da rota butírica, caracterizada pela maior parte (92,66%) dos metabólitos ser composta por ácido butírico e ácido acético. O pH do reator ficou em torno de 5,5.

Han *et al.* (2012a), operaram um reator de mistura completa de leito imobilizado (CMISR), inoculado com lodo de estação de tratamento de esgoto doméstico. Utilizaram água residuária à base de melaço (2.000 e 6.000 mg DQO L⁻¹) com relação DQO:N:P de 1000:5:1, carvão vegetal como meio suporte, TDH de 6 h, sem controle de pH e temperatura de 35°C. A fermentação tipo etano-acética estável foi verificada ao 40° dia de operação, quando a soma das concentrações destes dois componentes totalizaram 89% dos metabolitos totais. Nessa etapa obtiveram ,em média, concentração de H₂ no biogás de 49% e produção de H₂ (1,09 m³ H₂ m⁻³ d⁻¹). A máxima PVH foi de 12,51 mmol L⁻¹ h⁻¹ obtida com a máxima TCO testada (32 kg DQO m⁻³ d⁻¹). Porém, o máximo HY (130,57 mmol H₂ mol⁻¹ de DQO_{consumida}) foi descrito em 16 kg m⁻³ d⁻¹. Concluíram que a taxa de produção de H₂ aumentou com o incremento da TCO, porém, o rendimento de H₂ por substrato consumido (DQO), diminuiu quando TCO ultrapassa 16 kg m⁻³ d⁻¹. Como a máxima produção de H₂ é coincidente com as máximas concentrações de etanol e acetato, concluíram que a fermentação etano-acética é benéfica à produção de H₂.

Com o objetivo de avaliar o efeito da TCO na produção de hidrogênio, Han *et al.* (2012b) operaram CSTR no qual utilizaram água residuária à base de melaço (2.000 a 8.000 mg DQO L⁻¹) com relação DQO:N:P de 1002:5:1. O inóculo utilizada foi oriundo de lodo anaeróbio de estação de tratamento de esgoto doméstico, pré-tratado pelo método de aeração. O sistema foi operado em temperatura de 35°C (mesofílica) com TCO de 8 a 32 kg m⁻³ d⁻¹ e TDH de 6h. A máxima PVH foi de 12,4 mmol L⁻¹ h⁻¹ (TCO de 24 kg m⁻³ d⁻¹). A rota fermentativa predominante foi etanólica, caracterizada pela maior parte (82%) dos metabólitos composta por etanol e acetato. A TCO de máxima PVH e máxima produção de etanol (20,27 mmol h⁻¹ L⁻¹) foi a mesma (24 kg m⁻³ d⁻¹) o que resulta em conjunto com a produção de H₂, no máximo rendimento energético (31,23 kJ h⁻¹ L⁻¹). Os autores concluem sobre o ponto da viabilidade energética da produção dos dois biocombustíveis nas condições encontradas (CSTR, 35°C, TDH de 6h e TCO de 24 kg m⁻³ d⁻¹).

Li *et al.* (2013) avaliaram o efeito da Taxa de Carregamento de Lodo (TCL) na produção de hidrogênio, utilizando melaço como substrato, em CSTR. Para tanto utilizaram água residuária (2.000 mg DQO L⁻¹) com relação DQO:N:P de 200:5:1. O sistema foi inoculado com lodo aeróbio de cervejaria, operado em temperatura de 35°C

(mesofílica), 3 diferentes quantidades de inóculo (4,09; 8,01 e 9,52 gMLVSS L⁻¹), TCO de 6 kg m⁻³ d⁻¹ e TDH de 8h. A TCL que permitiu a estabilização da rota etanólica mais rapidamente foi de 0,63 kg DQO kg⁻¹MLVSS d⁻¹, resultando da concentração de inóculo mais elevada (9,52 gMLVSS L⁻¹). A máxima concentração de H₂ no biogás (55,91%), assim como máxima produção específica de H₂ (0,102 m³H₂ kg⁻¹MLVSS d⁻¹) foram obtidas em TCL de 1,47 kgDQO kg⁻¹MLSVV d⁻¹. Como já citado, a rota fermentativa predominante foi etanólica, caracterizada pela maior parte (71,4%) dos metabólitos ser composta por etanol e acetato. O pH do reator foi de 4,57.

Com o intuito de analisar o desempenho do sistema combinado, anaeróbio aeróbio, no tratamento de água residuária e produção de CH₄, Onodera et al. (2013) operaram dois reatores anaeróbios subsequentes; USSB (reator de fluxo ascendente com aletas laterais internas para auxiliar na separação trifásica) e UASB (reator de manta de lodo e fluxo ascendente), antecedidos por um tanque acidificador. Há no sistema dois filtros aeróbios, utilizados como pós-tratamento da parte anaeróbia. A água residuária foi composta por melaço, com concentração 43.000, 80.000 e 120.000 mg DQO L⁻¹ resultando em TCO de 43, 27 e 11-14 kg m⁻³ d⁻¹. O inóculo utilizado foi lodo granular anaeróbio de estação de tratamento de esgoto doméstico. O sistema foi operado em temperatura de 35° C e TDH de 0,96; 2,6; 7,5-10,4h. A máxima produção de CH₄ (0,29 m³CH₄ kg⁻¹DQO_{removida}) foi obtida em TCO de 27 kg m⁻³ d⁻¹. O sulfato afluente (1560 mgSO₄ L^{-1}) contribuindo com remoção de DQO de 1030 mg L^{-1} . Os autores justificam a queda da remoção de DQO pelo aumento da concentração de sais, pois a quantidade de sódio foi de 1,6 para 6,57 gNa L^{-1} e potássio de 2 para 6 gK L^{-1} , quando a DQO da água residuária passou de 43.000 para 120.000 mgDOO L⁻¹. Concluíram assim que o sistema foi eficiente para o tratamento, operado com TCO de 43 e 11 kgDQO m⁻³ d⁻¹, produziu 80 e 62,4% de CH₄, com eficiente remoção de sulfato e nitrificação do nitrogênio, porém, com potencial sensibilidade à inibição por sais.

Zhu *et al.* (2013) operaram CSTR com intuito de avaliar sua aplicabilidade na produção de hidrogênio utilizando água residuária, composta por melaço, de indústria produtora de açúcar a partir de beterraba. Esta possuía 4.000 mg DQO L⁻¹ e relação DQO:N:P de 100:10:1. O inóculo utilizado foi obtido de lodo aeróbio de cervejaria. O sistema foi operado em temperatura de 35°C com TCO de 12 e 18 kg m⁻³ d⁻¹ e TDH de 8h. A máxima concentração de H₂ no biogás e máxima conversão de DQO foram de 50,4 e 45%, respectivamente. O pH se manteve entre 4,1 e 4,5. A rota fermentativa

Syutsubo et al. (2013) operaram sistema anaeróbio-aeróbio com o objetivo de tratar água residuária à base de melaço. O sistema foi composto por tanque acidificador seguido de dois reatores metanogênicos em linha e, posteriormente, dois filtros aeróbios. A ênfase do sistema é o primeiro reator anaeróbio, um USSB, pois é onde acontece a maior remoção de carga orgânica. A água residuária tratada foi composta por melaço, com concentração 43.000, 80.000 e 120.000 mg DQO L^{-1} resultando em TCOs de 43, 27 e 11-14 kg m⁻³ d⁻¹. O inóculo utilizado foi lodo granular anaeróbio de estação de tratamento de esgoto doméstico. O sistema foi operado em temperatura de 35°C, sendo que o reator USSB seguiu os seguintes TDHs; 0,96; 2,6; 7,5-10,4d. Quando operado com TCO de 42,4 kg DQO m⁻³ d⁻¹, a remoção de DQO foi de 86,2%, porém, quando esta carga orgânica foi reduzida para 14 kg DQO m⁻³ d⁻¹ – motivada pela elevada concentração de sais no efluente - a eficiência foi reduzida para 62%. A concentração efluente de sulfato foi de 533 mg L⁻¹, quando em TCO de 14 kg m⁻³d⁻¹, a qual foi reduzida à sulfito e representou cerca de 3% da remoção de DQO. O sistema completo (tanque acidificador, USSB, UASB e dois filtros aeróbios) obteve uma remoção máxima de DQO de 96%, produzindo um efluente com baixo risco de geração de gases de efeito estufa.

Com o intuito de analisar a acurácia de dois métodos de simulação/otimização de dados experimentais, Whiteman e Gueguim Kana (2014) utilizaram Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) e Redes Neurais (RN) para simular o experimento, o qual foi também realizado. Houve variação de 3 parâmetros; concentração do substrato (50.000-150.000 mg L⁻¹), temperatura (35-40°C), pH (4,6 e 8) e quantidade de inóculo (10-50%). Os frascos-reatores foram inoculados com lodo anaeróbio de estação de tratamento de efluente doméstico, com pré-tratamento térmico. Segundo MSR os parâmetros otimizados para o experimento seriam; concentração de melaço (150.000 mg L⁻¹), quantidade de inóculo (10,11%), pH (8) e temperatura (35°C). Para RN a otimização se deu da seguinte forma; concentração de melaço (150.000 mg L⁻¹), inóculo (15%), pH (8) e temperatura (35°C). Essas otimizações resultaram em valores de produção de H₂ com acurácias distintas, sendo que a MSR a superestimou em 119,08% (com produção real de 71,25 ml), porém, a RN superestimou em 15,12% (a qual foi de 84,33 ml).

Wang *et al.*, 2013 avaliaram a produção de H_2 pela fermentação etanólica em CSTR, inoculado com lodo de tratamento de esgoto sanitário, pré-tratado por aeração. A

operação se deu em temperatura de 35°C, em fluxo contínuo e o substrato utilizado foi água residuária preparada a partir de melaço (8.000 mg DQO L⁻¹) com relação DQO:N:P de 1000:5:1. Houve 5 fases de operação, nas quais os valores de TDH eram de 10, 8, 6, 5 e 4h. A PVH aumentou condicionada à diminuição do TDH, porém no intervalo de 5 para 4h esse aumento não teve continuidade, decrescendo. A máxima PVH foi de 12,27 mmol H₂ L⁻¹ d⁻¹ justamente em TDH de 5 h. A máxima concentração de H₂ no gás (62%) foi verificada em TDH de 6 h. Os metabólitos dissolvidos foram acetato, butirato, propionato e etanol, sendo que a concentração deste último variou entre 55,8 e 69,8% do total referente a esses compostos. A soma das concentrações de etanol e acetato representa 73,3% do total, isso explicita que a via fermentativa predominante é etano-acética, a qual ressaltam ser uma ótima opção para a produção de H₂ em culturas mistas. A concentração (8,78 mmol H₂ L⁻¹ h⁻¹) em TDH de 5 h, discutido pelos autores como uma possível "lavagem" das bactérias acidogênicas em TDH menores, influenciando no decréscimo da produção desse componente.

Assim como os demais substratos supracitados, as pesquisas de produção de H_2 utilizando melaço como substrato foram realizadas, em sua maioria, em faixa mesofílica de temperatura e reatores de biomassa suspensa (Tabela 3.5). Identifica-se a carência de aplicações desse composto em reatores de alta taxa com biomassa imobilizada e faixa de temperatura termofílica, haja vista os constantes relatos de produtividade elevada em sistemas operados sob esses parâmetros.

Reator	Conc. (g DQO L ⁻¹)	$\begin{array}{c} TCO \ (kg \\ DQO \ m^{-3} \ d^{-1}) \end{array}$	Inóculo	Temp. (°C)	Autores (ano)
CSTR	2,91-20,5	19,4-107	Lodo ativado	30	Ren et al. (1997)
HBR-piloto	3,0	3,11-85,57	ETE (anaeróbio)	35	Ren et al. (2006)
ABR	5,0	8,89	Cervejaria (aeróbio)	35	Li <i>et al.</i> (2007)
EGSB	2,0-10,0	8-192	ETE (aeróbio) + acidogênico	35	Guo et al. (2008)
Frasco	20,0-120,0		Clostridium butyricum	30-45	Wang <i>et al.</i> (2009)
CSTR	10,0	8,0-24,0	ETE	35	Han et al. (2010)
CSTR imob. CSTR	2,0-10,0	8,0-40,0	ETE	35	Ren et al. (2010)
CSTR	2,0-10,0	20-44	ETE	35	Chang <i>et al</i> . (2011)
Frasco	20,0		Thermotoga ssp.	77	Cappelletti <i>et al.</i> (2012)
CSTR com recirculação	63,0-101,0	11,6-69,6	ETE (anaeróbio)	37	Mariakakis <i>et al.</i> (2012)
CMISR	2,0-6,0	8,0-32,0	ETE (anaeróbio)	35	Han <i>et al</i> . (2012)
CSTR	2,0-8,0	8,0-32,0	ETE (anaeróbio)	35	Han <i>et al</i> . (2012b)
CSTR	2,0	6	Cervejaria (aeróbio)	35	Li <i>et al.</i> (2013)
USSB	43,0; 80,0; 120,0	43, 27, 11-14	UASB	35	Onodera <i>et al.</i> (2013)
CSTR	8,0		ETE (anaeróbio)	35	Wang <i>et al.</i> (2013)
CSTR	4,0	12 e 18	Cervejaria (aeróbio)	35	Zhu et al. (2013)
USSB	43,0, 80,0; 120,0	43, 27, 11-14	UASB	35	Syutsubo <i>et al.</i> (2014)
Frasco	50,0; 100,0; 150,0	-	ETE (anaeróbio)	35-37,5- 40	Whiteman and Gueguim Kana (2014)

Tabela 3.5. Resumo da literatura sobre produção de H₂ a partir de melaço

3.5.4. Produção de H₂ a partir de vinhaça

Considerado um dos principais subprodutos do setor produtor de álcool, a vinhaça trata-se de um composto residual da fermentação alcoólica do caldo, melaço ou mescla destes, apresentando coloração escura e elevada concentração de substâncias orgânicas e inorgânicas, além de temperatura superior a 80 °C (Yeoh, 1997; Waal *et al.*, 2009; Mutton *et al.*, 2010).

Produzida em grandes volumes, há citações na literatura (Yeoh, 1997; Demattê *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2007; España-Gamboa *et al.*, 2011) desde 10 até 18 litros de vinhaça por litro de etanol produzido, dependendo da origem do substrato fermentado ; caldo, melaço ou mistura. Além desta variação quantitativa da vinhaça, a citada composição do substrato fermentado influência incisivamente na variação qualitativa, a qual é relatada na Tabela 3.6.

	0		3		
Componente	Conteúdo (mg L ⁻¹)		Componente	Conteúdo (mg L ⁻¹)	
Componente	Min	Max	Componente	Min	Max
Carboidratos totais	4.100	16.289	Cobre	0,87	1,13
Carbono orgânico total			Sólidos suspensos		
(ppm)	2280	5235	voláteis	1.683	2.095
DQO _{total}	30.406	35.200	N-amoniacal	50	101
Fosfato	147	240	Etanol	N.D.	N.D.
Potássio	3.600	4.800	Butirato	269	4219
Cálcio	532	757	Acetato	348	4917
Magnésio	367	580	Lactato	3.421	5.248
Zinco	0,97	2,45	Succinato	967	3.523
Sulfato	1.400	2.900	Propionato	314	4.680
		(201 1)			

Tabela 3.6. Características gerais da vinhaça de cana-de-açúcar

Fontes: Ferraz Junior (2013); Santos (2014)

Partindo do preceito que a vinhaça, apesar de possuir composição heterogênea, é constituída de elevada carga orgânica, nutrientes e sais, há possibilidade de utilizá-la na produção de H_2 e/ou CH₄, sem o comprometimento das suas características benéficas à fertirrigação, amplamente utilizada atualmente.

Para verificar a influência da concentração de potássio e sulfato na fermentação escura da vinhaça, foi realizado estudo por Searmsirimongkol *et al.* (2011), no qual operaram reatores anaeróbios em regime de batelada alimentada (ASBR). Utilizaram para tal água residuária oriunda de usina produtora de álcool a partir de melaço de cana-de-açúcar (20.000, 40.000 e 60.000 mg DQO L⁻¹). O sistema foi submetido a TDH de 32, 21, 16 e 13h, o que resultou em TCO de 15 a 112,5 kg m⁻³ d⁻¹. A concentração de potássio ficou em 1.173, 2.347 e 3.520 mg L⁻¹, respectivamente às concentrações de DQO supracitadas. Para o sulfato, as concentrações resultantes foram de 933, 1.867 e 2.800 mg L⁻¹, também condicionadas às diluições de referência à DQO. O inóculo utilizado foi obtido a partir de lodo anaeróbio do tratamento desta mesma água residuária, pré-tratado termicamente. A temperatura de operação dos reatores foi ambiente (37°C), e o pH dos

reatores foi mantido em 5,5. A máxima concentração de H₂ (33,7%) no biogás e máxima conversão de DQO (32%) foi obtida com operação em concentração de 60.000 mg DQO L⁻¹, TCO de 112,5 kg m⁻³ d⁻¹ e TDH de 13h. Porém, as condições de operação para o máximo HY (172 ml H₂ g⁻¹DQO_{removida}) foi 40.000 mg DQO L⁻¹, TCO de 60 kg m⁻³ d⁻¹ e TDH de 16h. Foi relatada a influência da concentração dos dois fatores (potássio e sulfato) nesses resultados, pois quando operado em concentração de 60.000 mg DQO L⁻¹ as concentrações destes se encontraram próximas as citadas na literatura como moderadamente inibitórias, além de ser relatado produção de ácidos em concentrações superiores as citadas como inibitórias (22.000 mg Hac. L⁻¹). A rota fermentativa predominante nas condições de melhor produção foi a butírica, sendo que os metabólitos ocorreram na seguinte distribuição (g L⁻¹); ácido butírico (9,1), ácido valérico (4,15), ácido acético (2,05) e ácido propiônico (1,7). Conclui-se que há necessidade de diluir esta água residuária para melhorar a eficiência de sua biodigestão, principalmente pelas elevadas concentrações de sua biodigestão, principalmente pelas

Intanoo et al. (2012), operaram dois reatores ASBR em regime de batelada alimentada com o objetivo de verificar a importância do Nitrogênio (N) e fósforo (P) na produção H₂. Utilizaram para tal água residuária oriunda de usina produtora de álcool a partir de mandioca (60.000 mg DQO L⁻¹). Avaliaram diferentes TDH (32; 25,6; 21,3 e 18,3h), o que resultou em TCO de 45 a 79 kg m⁻³ d⁻¹. O inóculo foi obtido do lodo anaeróbio oriundo do tratamento desta mesma água residuária, pré-tratado termicamente. A temperatura de operação foi 55°C e o pH dos reatores foi mantido em 5,5. A máxima concentração de H₂ (43%) no biogás, máxima conversão de DQO (32%), máxima PVH (2,10 m³ H₂ m⁻³ d⁻¹) e HY (115 ml H₂ g DQO_{aplicada}) foram obtidos com operação em TCO de 68 kg m⁻³ d⁻¹. A necessidade de N e P tida como ideal para a biodigestão metanogênica em temperatura termofílica (100:1:0,4) e para biodigestão acidogênica mesofílica (100:0,5:0,1) foram ambas inferiores a relação encontrada (100:6:0,5), justificada pela maior taxa de crescimento destes microrganismos. O decréscimo da PVH para TCO superiores a 68 kg DQO m⁻³ d⁻¹ foi causada pela inibição por excesso de produto, pois a concentração de ácidos voláteis chega a 13.300 mg Hac. L⁻¹, valor superior ao encontrado pelos autores como limite para esse arsanjo experimental (10.000 mg L⁻¹). A rota fermentativa predominante na condição de melhor produção é a etanólica, sendo que os metabólitos ocorreram na seguinte distribuição (g L^{-1}); etanol (5,6), ácido butírico (0,8), ácido valérico (0,63), ácido acético (0,4) e ácido propiônico

(0,15). Com tanto, concluíram que a produção de H_2 em sistema termofílico é mais produtiva que mesofílico, porém, com necessidade nutricional maior, além de haver afinidade maior com fontes orgânicas de nitrogênio.

Ferraz Junior et al. (2014), analisaram o efeito da TCO na produção de H₂ em reator anaeróbio de leito fixo/empacotado (APBR). Utilizaram polietileno de baixa densidade como suporte para imobilização da biomassa, água residuária à base de vinhaça de cana-de-açúcar (36.200 mg DQO L⁻¹). O inóculo utilizado foi biomassa auto fermentada, em temperatura ambiente, com água residuária sintética. Os sistemas foram operados em temperatura de 55°C, TCO de 36,2 a 108,6 kg DQO m⁻³ d⁻¹, variando TDH de 24 a 8h. O pH do afluente foi de 6,5. A máxima concentração de H₂ (36,9%) foi obtida em TDH de 8h, porém a máxima PVH (0,5268 m³H₂ m⁻³ d⁻¹) e HY (1,4 mol H₂ mol⁻¹ ¹_{carboidrato total}) foram obtidos em TDH de 12h. Os metabólitos obtidos tiveram a seguinte distribuição; etanol (5,26%), ácido acético (29,82%), ácido butírico (26,33%), ácido propiônico (19,3%), ácido valérico (10,52%) e ácido capróico (8,77%). Sobre a biota produtora de H₂, os autores concluíram que diferentes TCO selecionam diferentes microrganismos, os quais possuem diferentes capacidades de produzir H_2 , com presença de Thermoanaeroacterium thermosaccharolyticum na TCO de máxima produção. Concluíram que a TCO ótima para o reator com características e substrato semelhante ao avaliado é 84,2 kg DQO m⁻³ d⁻¹ e TDH de 10h, possibilitando máxima PVH e HY.

Santos *et al.* (2014b), avaliaram o efeito do TDH na produção de H₂ em dois reatores anaeróbios de leito fluidificado (RALF). Utilizaram vinhaça de cana-de-açúcar como substrato, sendo que no RALF₁ foi aplicada vinhaça diluída (10.000 mg DQO L⁻¹) e no RALF₂, vinhaça pura (30.000 mg DQO L⁻¹). O material utilizado com suporte para adesão do biofilme foi cinasita. Os reatores foram inoculados com lodo de UASB metanogênico termofílico, submetido à pré-tratamento térmico. Os sistemas foram operados a temperatura de 55°C, com TCO variando de 40 a 240 e 120 a 720 kg m⁻³ d⁻¹ para RALF₁ e RALF₂, respectivamente. Os TDH avaliados foram 6, 4, 2 e 1 para o RALF₁ e 8, 6, 4, 2, 1 para o RALF₂. A máxima concentração de H₂ (57,1%), máxima PVH (1,96 L h⁻¹ L⁻¹) e máximo HY (2,86 mmol H₂ g⁻¹ DQO _{aplic}.) foram obtidos para o RALF₁. A PVH e HY se mostraram condicionados ao TDH, sendo que o decréscimo deste causou o aumento da PVH e a redução do HY. A distribuição dos metabólitos foram distintas, condicionadas pelo TDH e concentração afluente, sendo que para o TDH e concentração mais produtivos, 1h e 10.000 mg DQO L⁻¹, respectivamente, foi a seguinte (g L⁻¹); ácido succínico (0,300), ácido láctico (1,280), ácido butírico (1,235), ácido acético (0,727), ácido isobutírico (0,182) e ácido propiônico (0,601). Os autores concluíram que é possível produzir H_2 a partir da vinhaça pura, porém, produção e rendimento inferior à diluída, sendo que o máximo rendimento é obtido em TDH maiores (6h) e a máxima produtividade com tempos menores (1h).

Com o intuito de viabilizar a produção de H_2 a partir da vinhaça, Sydney *et al.* (2014), realizaram a otimização do processo utilizando co-substratos em reatores operados em batelada. Avaliaram dois inóculos distintos, sendo o primeiro deles oriundo de fezes de morcegos frugívoros (LPB AH1), e o segundo, lodo proveniente de lagoa de tratamento de efluente leiteiro (LPB AH2). Utilizaram vinhaça de cana-de-açúcar como substrato, porém, com adição de outra fonte de carbono (co-substrato), as quais foram; sacarose, melaço e caldo de cana-de-açúcar, além de incluir o fator pH nesta otimização. Os testes foram realizados em temperatura de 37°C. Como resultado se obteve para LPB AH1 a codigestão com caldo de cana-de-açúcar como a mais produtiva (2,25 L H₂ L⁻¹), diferente do LPB AH2, que apesar de ter sido mais produtivo para melaço (2,17 L H₂ L⁻ ¹), utilizaram o caldo como codigestão, por haver resultado em produção, mesmo que inferior, estatisticamente igual. Ao que toca ao fator pH, os dois inóculos se mostraram mais produtivos para pH afluente de 7. Essas condições otimizadas foram aplicadas em reatores, também operados em bateladas. Para LPB AH1 a concentração final de H₂ no biogás foi de 29,55% e HY de 2,97 mol H2 mol⁻¹glicose. Quanto ao LPB AH2, a concentração final de H_2 foi de 31,2% com HY de 1,41 mol H_2 mol⁻¹glicose. A rota fermentativa em ambos as condições otimizadas foi butiro-acética, além de baixas concentrações de ácido propiônico, o que possibilita elevadas produções de H_2 . Esses dados levaram os autores a concluir que a codigestão da vinhaça para produção de H_2 pode tornar esse processo aplicável industrialmente.

Ferraz Junior *et al.*, (2015a), avaliaram o comportamento do APBR utilizando vinhaça de cana-de-açúcar como substrato para produção de hidrogênio sob faixa de temperatura termofílica (55°C). A vinhaça (36.200 mg DQO L⁻¹), submetida a TDH de 10,2h, resultou em TCO de 84 kg DQO m⁻³ d⁻¹. O pH afluente foi 6,5. O sistema foi inoculado com biomassa auto fermentada, desenvolvida a partir desta mesma vinhaça. A concentração máxima de H₂ no biogás foi 38,7%, máxima PVH de 761 mL d⁻¹ L⁻¹, máximos HY de 1,1 mmol H₂ g⁻¹DQO_{removida} e conversões máximas de carboidratos de 73%. O pH do reator se estabilizou em 5,5. A rota fermentativa predominante foi butiro-acética, caracterizada pela maior parte dos metabólitos ser composta por acetato e butirato

(81%). Ressaltam que a operação em temperatura termofílica garantiu maior produção de H_2 consequente da aplicação de elevada TCO e menor desenvolvimento de biomassa autóctona não produtora de H_2 .

Ferraz Junior et al. (2015b), avaliaram o efeito do material suporte na produção de H_2 em APBR. Utilizaram para tanto, argila expandida (AE), carvão vegetal (CV), cerâmica porosa (CP) e polietileno de baixa densidade (PBD) como materiais suporte para imobilização da biomassa. Os reatores foram alimentados com vinhaça de cana-deacúcar (36.000 mg DOO L^{-1}). O inóculo utilizado foi biomassa auto fermentada. desenvolvida em temperatura ambiente. Os sistemas foram operados em temperatura de 25°C, com TCO de 36,4 kg DQO m⁻³ d⁻¹ e TDH de 24h. O pH do afluente foi de 6,5. A máxima concentração de H₂ (46,3%), assim como a máxima PVH (0,0842 m³H₂ m⁻³ d⁻¹) e HY (1,4 mol H₂ mol⁻¹_{carboidrato}) foram obtidos quando o PBD foi utilizado como material suporte. Os metabólitos obtidos tiveram distintas distribuições, sendo que para o material suporte que proporcionou melhores produções seguiu a seguinte (g L^{-1}); metanol (0,02), etanol (0,16), ácido acético (0,86), ácido butírico (1,24), ácido propiônico (1,45), ácido valérico (0,34) e ácido capróico (0,05). Concluíram que o material suporte seleciona a biota presente no biofilme, os quais possuem diferentes capacidades de produzir H_2 , sendo que, assim como citado, o PBD proporcionou o desenvolvimento de um biofilme mais produtivo.

Com o objetivo de avaliar as vantagens do uso de co-substrato para adaptar o sistema à água residuária complexa (vinhaça), além de verificar o efeito do TDH na produção de H₂, Reis *et al.*, (2015), operaram dois RALF alimentados inicialmente com glicose, sendo introduzido vinhaça gradativamente, até o ponto desta representar a única fonte de carbono. Após essa adaptação, os sistemas passaram a ser submetidos a diferentes TDH (6, 4, 2 e 1h). O material suporte utilizado para imobilização da biomassa foi cinasita e a concentração da água residuária foi de 5.000 (reator R5) e 10.000 mg DQO L⁻¹ (reator R10). Os dois reatores foram inoculados com lodo de UASB mesofílico pré-tratado termicamente. A temperatura de operação dos reatores foi ambiente (22° C), e o pH dos reatores foi mantido entre 4 e 5. A máxima PVH (0,57 L h⁻¹ L⁻¹) foi obtida para o R5 (TDH de 1h). O máximo HY (3,07 mmol H₂ g DQO⁻¹_{aplicada}) também foi obtido para o R5. A rota fermentativa predominante após a utilização da vinhaça como única fonte de carbono foi mista, composta por álcoois e ácidos. As conclusões relatadas dizem respeito à vantagem da utilização de um substrato simples na fase inicial do processo, viabilizando a digestão de águas residuárias complexas, como foi o caso da vinhaça, além da

insuficiência do baixo pH (4–5) para supressão da metanogênese em águas residuárias reais.

Pela vinhaça ser constituída por diversos compostos, muitos deles tóxicos, surge a possibilidade de submeter essa água residuária ao tratamento físico-químico antecedentemente à fermentação. Esse tratamento garantiria a remoção de sulfato, citado por Searmsirimongkol *et al.* (2011) como um fator altamente influente no processo de produção de H_2 , além de carga orgânica (DQO) e outros compostos.

Esse tratamento proporcionaria a produção de duas fases, viscosa e líquida, sendo que a parte viscosa poderia ser utilizada com fertilizante (condicionada à sua composição). A fase líquida, com redução da concentração de compostos potencialmente danosos ao processo de fermentação, seria submetida à produção de H₂.

Outro aspecto que deve ser ressaltado é a operação destes sistemas em faixa termofílica de temperatura, assim como se pode notar em grande parte da literatura (Tabela 3.7).

Reator	Conc. (mg DQO L ⁻¹)	Inóculo	TDH (h)	Temp. (°C)	Autores (ano)
ASBR	20.000, 40.000 e 60.000	Lodo anaeróbio	32 - 13	37	Searmsirimongkol <i>et</i> <i>al.</i> (2011)
ASBR	-	Lodo anaeróbio	32 - 18,3	55	Intanoo <i>et al.</i> (2012)
APBR (leito fixo)	36.200	Biomassa autóctona	24 - 8	55	Ferraz Junior <i>et al.</i> (2014)
Frasco	2.000-12.000	UASB mesofílico	-	37 55	Lazaro <i>et al.</i> (2015)
RALF	5.000	UASB termofílico	8 - 1	55	Santos et al. (2014a)
RALF	10.000 30.000	UASB termofílico	6 - 1 8 - 1	55	Santos et al. (2014b)
Frasco	29600	Fezes de morcego Lodo de lagoa	-	37	Sydney et al. (2014)
APBR (leito fixo)	36.200	Biomassa autóctona	10,2	55	Ferraz Junior <i>et al.</i> (2015a)
APBR (leito fixo)	36.000	Biomassa autóctona	24	25	Ferraz Junior <i>et al.</i> (2015b)
RALF	5.000-10.000	UASB mesofílico	6, 4, 2, 1	22	Reis et al. (2015)

Tabela 3.7. Resumo da literatura sobre produção de H₂ a partir de vinhaça

3.6. Princípios e vantagens da produção de H₂ sob temperatura termofílica

Os microrganismos são capazes de produzir hidrogênio em intervalos de temperatura de 15 a 85°C. Reações fermentativas podem ser operadas a temperaturas mesofílicas, entre 25 e 40°C, termofílicas, entre 40 e 65°C e em condições hipertermofílicas (microrganismos extremófilos), com temperaturas acimas de 80°C. Segundo Wang (2009), a temperatura é um dos mais importantes fatores influentes na atividade das bactérias produtoras de H₂ e consequentemente na produção fermentativa de H₂.

A diversidade de substratos sintéticos e reais tem sido viabilizada para a produção de hidrogênio por meio de processos fermentativos termofílicos e, em sua maioria, a partir de reatores em bateladas, utilizando o óleo de palma (O-Thong *et al.*, 2009), soro de queijo (Kargi *et al.*, 2012), água residuária de mandioca (O-Thong *et al.*, 2011), celulose (Xia *et al.*, 2012), melaço (Cappelletti *et al.*, 2012) e águas residuárias provenientes de destilarias de álcool (Intanoo *et al.*, 2012; Roy *et al.*, 2012). A efetividade da produção de hidrogênio também pôde ser verificada em reatores contínuos, a partir de sacarose (Dong *et al.*, 2011; Obazu *et al.*, 2012), soro de queijo (Azbar *et al.*, 2009a; Azbar *et al.*, 2009b) e vinhaça de destilarias de álcool (Wang *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2014a; 2014b;2014c; Ferraz Junior *et al.*, 2015a).

Sistemas termofílicos operados normalmente sob temperaturas de 55 a 60 °C apresentam elevada produção e rendimento de hidrogênio. Esses fatos são principalmente atribuídos ao maior favorecimento termodinâmico, aumentando as reações químicas e biológicas, à dominância da via metabólica do acetato contrariamente a do etanol ou do lactato e a maior tolerância à pressão parcial do hidrogênio (O-Thong *et al.*, 2009).

O hidrogênio apresenta baixa solubilidade em fase aquosa: $0,017 \text{ cm}^3 \text{ H}_2 \text{ cm}$ de água⁻³ a 1 bar e 37 °C (Guwy *et al.*, 1997), pois levando-se em consideração a Lei de Henry, temperaturas mais elevadas acabam reduzindo a solubilidade do gás na fase aquosa e, consequentemente, a interação do gás com os microrganismos presentes no processo. Isso desfavorece o consumo do gás para geração de outros produtos do processo fermentativo e aumenta a eficiência da transferência líquido-gás deste composto.

A pressão parcial de hidrogênio (PH₂) na fase gasosa é crucial. Quando a concentração de hidrogênio se eleva, a síntese de H₂ torna-se termodinamicamente desfavorável e o metabolismo é deslocado para a produção de produtos finais reduzidos (Levin *et al.*, 2004). Apenas em baixos valores de PH₂, poderá ocorrer a oxidação do NADH para NAD+ por meio da síntese de H₂ (Ciranna *et al.*, 2011)

Outra vantagem de operar sistemas anaeróbios em faixas termofílicas de temperatura diz respeito a fatores econômicos, pois assim como relata Wilkie *et al.* (2000) ao operar reatores alimentados com água residuária à base de melaço e vinhaça de cana-de-açúcar, ressaltaram que sistemas em faixa termofílica suportaram TCO cerca de duas vezes maiores que sistemas em faixa mesofílicas, o que possibilita reatores menores e economia com sistemas de resfriamento destes substratos, haja vista que, assim como já citado, a vinhaça deixa a indústria com temperatura superior a 80 °C.

Assim como se pode notar na literatura supracitada, há diversos arranjos de reatores empregados para na produção de H_2 por fermentação escura em faixa termofílica de temperatura, sendo que na maioria dos casos, há possibilidade de empregar os modelos e materiais já estabelecidos para as condições mesofílicas.

3.7. Reator anaeróbio de leito fluidificado

Há pesquisas com diversas configurações de reatores para a produção biológica de hidrogênio por meio da fermentação em faixa mesofílica e termofílica. Dentre os quais, pode-se citar; reator de mistura contínua (CSTR) (Lin & Lay, 2004; Lay *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2013), reator anaeróbio de leito fixo e/ou empacotado (Chang *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2007; Leite, 2005; Penteado *et al.*, 2013); reator anaeróbio de manta de lodo (UASB) (Dong *et al.*, 2011; Braga *et al.*, 2015); reator anaeróbio de leito fluidificado (RALF) (Wu *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2007; Shida, 2008; Amorim *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2014a; 2014b; 2014c).

Assim como supracitado, diversos reatores têm sido estudados para a produção de hidrogênio. Basicamente eles se classificam em reatores de crescimento microbiano disperso ou suspenso, nos quais se englobam os reatores de agitação contínua (Chen & Lin, 2003; Zhang *et al.*, 2006), reatores de crescimento aderido ou imobilizado como os reatores de manta de lodo (Chang *et al.*, 2002; Dong *et al.*, 2011), os reatores de leito fixo (Chang *et al.*, 2002; Ferraz Junior *et al.*, 2014; 2015a) e reatores de leito fluidificado (Wu *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2007; Shida, 2008; Amorim *et al.*, 2012; Reis *et al.*, 2015).

O RALF tem sido bastante utilizado em pesquisas relacionadas ao tratamento de efluentes. Nesses reatores, o líquido a ser tratado é introduzido na parte inferior, fluindo através de um leito de partículas (argila, areia, carvão ativado, etc.) em velocidade suficiente para causar a fluidificação deste (Nicollela *et al.*, 2000). As partículas sob estado fluidificado atuam como suporte de imobilização, oferecendo área superficial

necessária para a adesão dos microrganismos responsáveis pela formação do biofilme. O fato de possuir biomassa aderida ao material suporte permite a desvinculação do tempo de detenção celular (TDC) do tempo de detenção hidráulica (TDH), fato que maximiza o potencial fermentativo do sistema.

Nos sistemas de leito fluidificado, a turbulência criada pelo fluido ascendente e pelo gás produzido contribui para a elevada taxa de transferência de massa nas partículas. Devido a esse maior grau de agitação em comparação com os outros modelos de reatores, há grande interação entre o líquido e a biomassa.

O uso de partículas resulta em maior área superficial e alta concentração de biomassa ativa. Para leitos expandidos, como é o caso deste, essa área aumenta. A área superficial mais elevada propicia maior desenvolvimento de biomassa, levando a necessidade de menor tempo de detenção hidráulica, a depender da concentração do afluente, e permite ainda que o reator de leito fluidificado seja mais compacto que os outros reatores para a mesma função (Grady Junior *et al.*, 1999).

Segundo Henze e Harremoes (1983) a expansão do leito é controlada pela velocidade vertical (ascensional ou descensional) e pela proporção volumétrica da recirculação. Ainda segundo estes mesmos autores, a espessura do biofilme é controlada pela estratégia de regeneração do leito, condicionada pelo tamanho e densidade do material suporte em conjunto com a velocidade vertical.

Segundo alguns autores (Lin *et al.*, 2009; Ren *et al.*, 2011), biomassa aderida à superfície do material suporte é frequentemente utilizada para produção de H_2 por meio da fermentação, pois isso garante maior retenção de biomassa sob baixos TDH (inferiores a 4h) e cria um microambiente de proteção aos microrganismos mais sensíveis.

Com relação à presença de sólidos suspensos na água residuária, o fato de se encontrar em estado fluidificado não enfrenta problemas de colmatação do leito, como é comum acontecer com alguns outros modelos de biomassa aderida (Henze & Harremoes, 1983).

Segundo Henze e Harremoes (1983) reatores que possuem biofilme, como é o caso do RALF, ou grânulos enfrentam menores problemas com sobrecarga orgânica, pois há resistência à transferência de massa característica, o que possibilita a formação de gradiente protetor.

Hallenbeck (2009) ressalta que esse modelo de reator pode alcançar PVH cerca de 10 vezes superior ao CSTR. Fato que segundo Show *et al.* (2012) tem relação com maior retenção de biomassa no interior do RALF quando comparado ao CSTR.

Entre outras vantagens do sistema de leito fluidificado, pode-se ressaltar o fato do reator ser de fácil controle e automação, além de melhor controle da temperatura tendo em vista que não há pontos de empacotamento do leito (Grady Junior *et al.*, 1999).

Segundo España-Gamboa *et al.* (2011) reatores de leito fixo são indicados para tratamento de vinhaças de fácil degradação ou quando não se necessita elevadas taxas de remoção de DQO. Porém, para vinhaças de difícil degradação, compostas por componentes recalcitrantes o arranjo do reator mais adequado é o RALF.

Algumas pesquisas em produção de hidrogênio tem sido realizadas em reatores de leito fluidificado (Koskinen *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2007; Shida, 2008; Rosa *et al.*, 2014) devido às vantagens conferidas ao processo anaeróbio pela fluidificação do meio.

Zhang *et al.* (2007) estudaram a produção de hidrogênio em RALF (37°C) tendo carvão ativado granular como material suporte, inóculo obtido de mescla de lodo aeróbio e anaeróbio oriundo de estação de tratamento de esgoto doméstico e água residuária à base de glicose como substrato. A operação se deu em concentração de substrato fixa (10.000 mg L⁻¹) e outra variando a concentração do substrato (10.000-30.000 mg L⁻¹) sob um TDH fixo de 1h. A temperatura de operação foi 37 °C e o pH foi mantido em 4. A taxa de produção aumentou de 2,4 para 4 L h⁻¹ L⁻¹ com redução do TDH. A composição de hidrogênio no biogás variou (61 a 57%) com a redução do TDH e foi observada a estabilidade na composição a níveis de 59% sob a variação da carga orgânica. Não houve produção de metano e foram formados acetato (43-46%), butirato (20-30%), etanol (14-21%), hexanoato (7-10%) com poucos traços de propionato (0-3%). Os metabólitos encontrados diminuíam a sua parcela na solução à medida que era diminuído o TDH. Foi observado que o RALF possui grande capacidade de operar sob altas taxas orgânicas, aumentando a produção de hidrogênio e que a ausência de ação metanogênica se deve à manutenção dos níveis de pH próximos a 4.

Wu *et al.* (2007) avaliaram dois modelos de reatores com biomassa imobilizada (RALF e Reator de Leito Fixo), para produzir H₂ e etanol simultaneamente. O inóculo utilizado foi oriundo do tratamento de esgoto municipal, com pré-tratamento ácido, água residuária a base de 3 açúcares diferentes (sacarose, glicose ou frutose) com 20.000 mg DQO L⁻¹ e adição de solução suplementar de nutrientes. As condições de operação para o RALF; temperatura foi mantida em 35 °C, pH entre 5,8 e 6,8 com velocidade ascensional entre 0,55 e 0,91 cm s⁻¹. Para o reator de leito fixo, a temperatura foi de 35 °C, TDH de 4

horas e pH 6. A sacarose no RALF proporcionou incremento da produção de H₂ (45-59 mmol h⁻¹ L⁻¹) e etanol (86-287 mmol h⁻¹ L⁻¹) com o aumento da velocidade ascensional (0,55-0,91 cm s⁻¹), com melhor HY (1,04 mol H₂ mol hexose⁻¹) para velocidade ascensional de 0,55 cm s⁻¹, porém, para o rendimento de etanol, o melhor substrato foi a frutose, com rendimento máximo de 0,65 mol H₂ mol⁻¹hexose. Para o leito fixo, o substrato que proporcionou a melhor produção de H₂ (16,1 mmol h⁻¹ L⁻¹) foi glicose. Para o etanol, sua maior produtividade (6,2 mmol h⁻¹ L⁻¹) foi proporcionada pela sacarose. Concluem que há possibilidade de produzir H₂ e etanol simultaneamente, com valores superiores para o RALF, por se tratar de um sistema que favorece a transferência de massas.

Amorim *et al.* (2009) estudaram a produção de H₂ em RALF alimentado com água residuária sintética a base de glicose (2.000 mg L⁻¹). Cinasita como material suporte. A faixa de TDH avaliada foi de 8 a 1h e temperatura de operação de 30°C. Houve acréscimo do HY de 1,41 para 2,49 mol H₂ mol⁻¹glicose, quando avaliado sob redução de TDH de 8 para 2h, porém, para TDH de 1h houve redução deste parâmetro para 2,41 mol H₂ mol⁻¹glicose. O biogás produzido foi composto por H₂ e CO₂, sendo que a redução do TDH causou incremento da concentração de H₂ de 8 para 35%. A fermentação obtida pode ser caracterizada como butílico-acética, com a maior parte de metabólitos produzidos representada por ácido acético (36,1-53,3%) e ácido butírico (36,1-44,9%).

Com o objeto de avaliar a produção de H₂ e ácidos orgânicos por longo período, Shida *et al.* (2009) operaram RALF mesofílico (30°C) alimentado com água residuária sintética a base de glicose (2.000 mg L⁻¹), pH 3,8, variação de TDH de 8 a 1h e cinasita como material suporte para os microrganismos. Houve de 92 a 98% de conversão do substrato, com acréscimo da PVH condicionada a redução do TDH, com valor máximo de 1,28 L h⁻¹ L⁻¹ quando operado em TDH de 1h. O HY seguiu comportamento semelhante, com máximo rendimento (2,29 mol H₂ mol⁻¹glicose) quando operado em TDH de 2h, porém, com posterior redução do rendimento para TDH de 1h. A máxima concentração de H₂ no biogás foi de 37%. A rota fermentativa predominante foi a butírico-acética, com valores de ácido acético e ácido butírico de 46,94-53,84% e 34,51-42,16% respectivamente.

Barros *et al.* (2010) estudaram a influência de dois diferentes materiais suportes e do TDH na produção de H₂ em RALF. Para tanto utilizaram polietileno (R1) e cinasita (R2) como material suporte, variação do TDH de 8 a 1h e água residuária sintética a base de glicose (4.000 mg L⁻¹). A temperatura de operação foi 30°C e pH 5,5. Para o R1, o

máximo HY (1,90 mol H_2 mol⁻¹glicose) foi logrado quando operado em TDH de 2h. Em respeito ao R2, o HY máximo obtido foi 2,59 mol H_2 mol⁻¹glicose, também para operação em TDH de 2h. A máxima PVH foi 0,95 e 1,21 L h⁻¹ L⁻¹ para R1 e R2, respectivamente, quando operado em TDH de 1h. A concentração de H_2 no biogás foi incrementada com a redução do TDH, alterando de 16 para 47 e 22 para 51%, para o R1e R2, respectivamente. Concluindo que a cinasita garante desempenho superior que o polietileno, quando utilizados como material suporte em RALF.

Com o intuito de avaliar o efeito da concentração do substrato na produção de H₂ em RALF, Amorim *et al.* (2012) operaram quatro RALF alimentados com água residuária sintética a base de glicose (2.000-25.000 mg L⁻¹) e variação de TDH de 8 a 1h. A temperatura e pH de operação foram de 30°C e 3,5, respectivamente. Os reatores operado com TDH de 2h e concentração do substrato de 2.000, 4.000 e 10.000 mg L⁻¹ atingiram produções satisfatórias, porém, para o reator operado com concentração de 25.000 mg L⁻¹, não houve produções. O máximo HY (2,49 mol H₂ mol⁻¹glicose) foi obtido no RALF operado com TDH de 2h e concentração do substrato de 2.000 mg L⁻¹. A máxima PVH (1,46 L h⁻¹ L⁻¹) foi lograda no reator alimentado com concentração de 10.000 mg L⁻¹ e operado em TDH de 1h. Os reatores operados com as menores concentrações de glicose (2.000 e 4.000 mg L⁻¹) tiveram ácido acético e ácido butírico como metabólitos maioritários, porém, para os reatores operados com concentrações superiores (10.000 e 25.000 mg L⁻¹) a maior parte dos metabólitos foi composta por álcoois.

A influência da velocidade superficial (Vup) aplicada ao RALF na produção de H₂ foi avaliada por Reis e Silva (2011). Para tanto, foram operados dois reatores sob diferentes V_{up} ; 1,24 cm s⁻¹ (R124) e 1,88 cm s⁻¹ (R188). Como material suporte para adesão dos microrganismos, foi utilizado cinasita, e a concentração do substrato sintético á base de glicose foi 5.000 mg L⁻¹. O R124 obteve melhores produções de H₂, com máxima PVH de 2,21 L h⁻¹ L⁻¹ quando operado em TDH de 1h, enquanto o máximo HY (2,55 mol H₂ mol⁻¹glicose) foi obtido em TDH de 2h. A concentração de H₂ no biogás foi de 40,53 a 67,57%. Lograram elevadas produções de etanol, o que os fizeram deduzir que esta é a rota fermentativa preferível para essas condições de operação. Os resultados levaram os autores a concluir que a Vup poderia ter um limite para a maximização da produção de H₂.

3.8. Considerações gerais

Apesar de todo o enfoque voltado ao tratamento de rejeitos (resíduos e águas residuárias), há sempre a possibilidade de substituir processos já existentes e/ou complementá-los com o objetivo de se tornar energeticamente mais eficiente. Alguns autores (Show *et al.*, 2012) acenam para os "resíduos verdes" como atual e futuro campo a ser trabalhado com intuito de produzir biohidrogênio.

O setor sucroalcooleiro nacional gera alguns produtos e subprodutos com grande potencial para esse fim, pois possuem uma elevada concentração de carboidratos, além de um deles (vinhaça), ser considerada uma questão ambiental ainda sem disposição final ideal.

Com base nesses mesmos autores, vale ressaltar a necessidade da sustentabilidade da produção das culturas energéticas, principalmente por concorrerem por área com as culturas alimentícias. Partindo destes preceitos, torna-se interessante a análise qualiquantitativa da produção de biohidrogênio e metabólitos dissolvidos utilizando como substrato os componentes da cadeia sucroalcooleira, a fim de maximizar a produção de energia e ampliar o portfólio de produtos de elevado valor agregado deste setor.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este capítulo descreve o inóculo utilizado no experimento, o método de prétratamento deste, assim como a configuração do sistema utilizado para a produção biológica de H_2 e metabólitos dissolvidos, juntamente com os procedimentos de partida e condições operacionais dos reatores. Apresenta-se ainda a caracterização dos substratos orgânicos utilizados (sacarose, caldo, melaço e vinhaça) ao longo do experimento, a descrição detalhada e frequência das análises físico-químicas e microbiológicas, e por último, os cálculos referentes aos principais parâmetros de avaliação da produção biológica de H_2 .

4.1. Inóculo produtor de hidrogênio: pré-tratamento térmico

O inóculo utilizado para a partida operacional dos reatores anaeróbios de leito fluidificado (RALF) termofílicos foi obtido de lodo metanogênico termofílico de reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB) utilizado para o tratamento de vinhaça, alocado na Usina São Martinho (Pradópolis, SP). Foram utilizados dois lotes de lodo, sendo os RALF de vinhaça e sacarose inoculados com o primeiro deles, e os RALF de melaço e caldo com o segundo, nos quais foram observados valores de 8,05 e 6,11 para o pH e 10,9 e 111,7 g L⁻¹ para a concentração de sólidos voláteis totais no inóculo, respectivamente.

A fim de se promover a supressão da metanogênese, por inativação dos microrganismos responsáveis por essa fase da digestão anaeróbia, foi realizado prétratamento térmico da biomassa (Kim *et al.*, 2006), o qual tem objetivo de extinguir células que não possuem a capacidade de formar endósporos, favorecendo a permanência das principais bactérias acidogênicas – formadoras de endósporos -, resultando em culturas produtoras de hidrogênio.

4.2. Substratos orgânicos

Os substratos reais; caldo de cana-de-açúcar, melaço e vinhaça, utilizados na alimentação dos reatores RALF termofílicos para a produção de hidrogênio, foram coletados na Usina São Martinho (Pradópolis, SP), produtora de etanol e açúcar, a partir de cana-de-açúcar como matéria-prima. Devido à necessidade de uso de grandes volumes de substratos para a realização dos ensaios e a dificuldade em sua obtenção no período de entressafra, foi realizado o armazenamento dos diversos lotes de substratos reais à - 5°C.

4.2.1. Sacarose

Foram adicionados ao substrato preparado a partir de sacarose, utilizado na alimentação do RALF citado neste experimento, nutrientes necessários ao crescimento celular (Tabela 4.1). Como forma de álcali, com a função de tamponamento do pH, foi adicionado cerca de 220 mg L^{-1} de NaHCO₃ ao substrato de alimentação, a fim de manter o pH entre 7 e 7,5.

Componente	Concentração (mg L ⁻¹)
NiSO ₄ .6H ₂ O	1
FeSO ₄ .7H ₂ O	5
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,5
CoCl ₂ .2H ₂ O	0,08
CaCl ₂ .6H ₂ O	47
SeO ₂	0,07
CH_4N_2O	125
KH_2PO_4	21
K_2HPO_4	85
NaHPO.4H ₂ O	33

Tabela 4.1. Componentes da solução de nutrientes adicionada ao RS

Fonte: adaptado de Del Nery (1987)

4.2.2. Caldo de cana-de-açúcar

Ao longo do experimento, as características dos caldos coletados (*in natura*) foram avaliadas considerando aspectos físico-químicos, como carboidratos totais, carbono orgânico total (COT), DQO total, nitrogênio kjedahl total (NKT), fósforo (como PO_4^{-3}), zinco, cobre, cálcio, magnésio, potássio (Tabela 4.2). O caldo possuía pH de 4,2.

Componente	Conc. $\pm \sigma (\text{mg L}^{-1})$
Carboidratos totais (g L ⁻¹)	$272,6 \pm 36$
$DQO_{total} (g L^{-1})$	$294,9 \pm 25$
COT	$7.338,8 \pm 1.208$
N-NTK	4.237 ± 0
P-PO ₄ ⁻³	$245,0 \pm 100$
Potássio	$1.570,0 \pm 550$
Cálcio	$317,0\pm179$
Magnésio	$288,6 \pm 27$
Zinco	$2,4 \pm 1$
Cobre	$0,36 \pm 0,3$
SST	12.811 ± 211
SSV	2.436 ± 124
HLa	$3.992,4 \pm 343$
HCi	$3.073,2 \pm 1.227$
HMa	$27.687,8 \pm 20.079$

Tabela 4.2. Caracterização do caldo utilizado durante o experimento

DQO_{total}: demanda química de oxigênio total, COT: carbono orgânico total, N-NTK: nitrogênio kjeldahl total, P-PO₄-³: fosfato, SST: sólido suspenso total, SSV: sólido suspenso volátil, HLa: ácido lático, HCi: ácido cítrico, HMa: ácido málico.

Para proporcionar um desenvolvimento microbiano adequado, foram adicionados nutrientes com base em Endo *et al.* (1982) (Tabela 4.3).

Tabela 4.3. Componentes da solução de nutrientes adicionada ao RC

Componente	Concentração (mg L ⁻¹)
NH ₄ HCO ₃	563
K_2HPO_4	125
MgCl ₂ .6H ₂ O	15
FeSO ₄ .7H ₂ O	25
$CuSO_4.5H_2O$	5
CoCl ₂ .5H ₂ O	0,125

Fonte: modificado de Endo et al. (1982)

As alterações realizadas no meio nutriente original se deram para reduzir o álcali, com a retirada do NaHCO₃ (Sreela-or *et al.*, 2011) e ajuste da relação DQO/N para 30, com a redução do NH₄HCO₃, realizada com base na literatura (Ngoma *et al.*, 2011; Plangklang *et al.*, 2012; Pattra *et al.*, 2011). Durante todo o período operacional do reator houve adição de ácido clorídrico (HCl) 30% (volume máximo de 2 mL por litro) e ácido acético glacial (CH₃COOH) como agentes controladores de pH no afluente dos reatores, mantendo-o entre 5,6 e 6,6.

4.2.3. Melaço

Ao longo do experimento, o melaço utilizado foi oriundo de único lote, sendo caracterizado levando em conta aspectos físico-químicos, como carboidratos totais, carbono orgânico total (COT), DQO total, nitrogênio kjeldahl total (NKT), fósforo (como PO_4^{-3}), enxofre (como SO_4^{-2}), zinco, cobre, cálcio, magnésio e potássio (Tabela 4.4). O pH do melaço *in natura* foi de 6,05.

Componente	Conc. $\pm \sigma (\text{mg L}^{-1})$	Componente	Conc. $\pm \sigma (g L^{-1})$
Carboidratos totais (g L ⁻¹)	$1.079,7 \pm 114,4$	HAc	$23,\!87\pm3,\!2$
DQO _{total} (g L ⁻¹)	$1.157,6 \pm 152,3$	HPr	$27,6\pm0,5$
COT	349.975 ± 24.275	HLa	$17,9\pm8,9$
N-NTK	$12.900\pm0{,}0$	HSu	$30{,}4\pm2{,}9$
P-PO ₄ -3	$1,\!150\pm108$	HCi	$41,9\pm2,6$
Potássio	24.500 ± 2.900	HMa	$817,\!4\pm20,\!2$
Cálcio	6.280 ± 80	HFo	$14,2 \pm 2,6$
Magnésio	2.896 ± 224		
Zinco	$10{,}9\pm2$		
Cobre	$1,6 \pm 0,4$		
SST	$6.214,3\pm119$		
SSV	$1.342.9 \pm 86$		

Tabela 4.4. Caracterização do melaço utilizado ao longo do experimento

DQO_{total}: demanda química de oxigênio total, COT: carbono orgânico total, N-NTK: nitrogênio kjeldahl total, P-PO₄⁻³: fosfato, SST: sólido suspenso total, SSV: sólido suspenso volátil, HAc: ácido acético, HPr: ácido propiônico, HLa: ácido lático, HSu: ácido succínico, HCi: ácido cítrico, HMa: ácido málico, HFo: ácido fórmico.

Como se pode notar na tabela acima, assim como relatado por Ren *et al.*, 2010, esse substrato se trata de um composto complexo, com quantidades suficientes dos principais nutrientes necessários ao desenvolvimento microbiano, portanto, não foi adicionado nenhum nutriente adicional. Com o intuito de tamponar o sistema, foi adicionado NaHCO₃ para controle do pH afluente, mantendo-o entre 6,5 e 7.

4.2.4. Vinhaça

Durante o transcorrer do experimento, houve avaliação e monitoramento das características da vinhaça coletada (*in natura*), considerando aspectos físico-químicos, como carboidratos totais, carbono orgânico total (COT), DQO total, nitrogênio kjedahl total (NKT), fósforo (como PO₄⁻³), enxofre (como SO₄⁻²), zinco, cobre, cálcio, magnésio e
potássio (Tabela 4.5). O pH obtido da vinhaça de cana-de-açúcar *in natura* foi de 4,49 \pm 0,2.

Componente	Conc. $\pm \sigma$ (mg L ⁻¹)
Carboidratos totais	11.430 ± 7.035
DQO _{total}	31.604 ± 5.238
COT	7.845 ± 864
N-NTK	$0,\!675\pm0,\!12$
$P-PO_4^{-3}$	$113,3 \pm 13$
Potássio	$3.763,3\pm528$
Cálcio	$650, 6 \pm 154$
Magnésio	417 ± 53
Zinco	$0,\!46 \pm 0,\!2$
Sulfato	$2.312,5 \pm 38$
Cobre	$0,\!33\pm0,\!16$
	1 0 0 5 1

Tabela 4.5. Características da vinhaça in natura

DQO_{total}: demanda química de oxigênio total, COT: carbono orgânico total, N-NTK: nitrogênio kjeldahl total, P-PO₄⁻³: fosfato.

Como objetivo de reduzir a carga orgânica e concentração de sulfato, a vinhaça *in natura* foi submetida ao tratamento físico-químico de coagulação, floculação e posterior sedimentação. Para tal foi utilizado agitador mecânico (Marconi MA256). O tratamento seguiu os parâmetros citados na Tabela 4.6.

Tabela 4.6. Parâmetros do tratamento físico-químico

Equipamento	Rotação	Tempo de	Tempo de	Coagulante/
	(RPM)	mistura (min.)	sedimentação (h)	massa (g L ⁻¹)
Agitador mecânico Marconi MA256	700	8	24	CaO/6

A vinhaça após o pré-tratamento físico-químico foi caracterizada segundo os mesmos parâmetros, sendo descritos na Tabela 4.7.

Componente	Conc. $\pm \sigma (\text{mg L}^{-1})$
Carboidratos totais	3.986 ± 3.243
DQO _{total}	28.289 ± 3.683
COT	$6.891,3 \pm 484$
N-NTK	$0{,}512\pm0{,}04$
P-PO ₄ ⁻³	$69,2 \pm 6$
Potássio	$3.255,0 \pm 395$
Cálcio	3.350 ± 180
Magnésio	$52,2 \pm 35,8$
Zinco	$0,4\pm 0$
Sulfato	1.800 ± 50
Cobre	$0,1 \pm 0,1$
SST	1.800 ± 52
SSV	1.800 ± 53
HLa	$3.585,1\pm 219,1$
HCi	$1.781,5\pm706$
HMa	4.706 ± 375

Tabela 4.7. Caracterização da vinhaça após pré-tratamento físico-químico

DQO_{total}: demanda química de oxigênio total, COT: carbono orgânico total, N-NTK: nitrogênio kjeldahl total, P-PO₄⁻³: fosfato, SST: sólido suspenso total, SSV: sólido suspenso volátil, HLa: ácido lático, HCi: ácido cítrico, HMa: ácido málico.

Houve adição de solução adicional com nutrientes necessários ao crescimento microbiano a vinhaça pré-tratada (Tabela 4.8).

Componente	Concentração (mg L ⁻¹)
NiSO ₄ .6H ₂ O	1
FeSO ₄ .7H ₂ O	5
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,5
CoCl ₂ .2H ₂ O	0,08
CaCl ₂ .6H ₂ O	47
SeO ₂	0,07
CH_4N_2O	125
KH_2PO_4	21
K ₂ HPO ₄	85
NaHPO.4H ₂ O	33

Tabela 4.8. Componentes da solução de nutrientes adicionada ao RV

Fonte: adaptada de Del Nery (1987)

Assim como para o caldo, durante todo o período operacional do reator houve adição de HCl 30% (V/V) e CH₃COOH como agentes controladores de pH no afluente dos reatores, mantendo-o entre 4,8 e 5,0.

4.3. Reator aneróbio de leito fluidificado termofílico: RS, RC, RM, RV

Os reatores utilizados foram construídos em aço inox de 2 mm de espessura, com 150 cm de altura, diâmetro interno de 3,6 cm e 1527 cm³ de capacidade total individual (volume total).

O material suporte usado para imobilização e adesão da biomassa foi argila expandida - cinasita (Figura 4.1), com diâmetro entre 2,8 a 3,5 mm, densidade real de 1,5 g cm⁻³, e porosidade de 23%. Foram utilizadas 445 g de cinasita, proporcionando altura inicial de 60 cm de leito, quando não expandido, em cada reator anaeróbio de leito fluidificado termofílico.

Figura 4.1. Partículas de cinasita utilizadas como material suporte



A Tabela 4.9 apresenta as características físicas da argila expandida de acordo com Ortega *et al.* (2001).

Tabela 4.9. Características físicas da cinasita

Características	Valor
Densidade real (g cm ⁻³)	1,5
Densidade aparente (g cm ⁻³)	1,06
Diâmetro médio do poro (µm)	0,19

Fonte: Ortega et al. (2001)

As condições fluidodinâmicas do reator, assim como a velocidade de mínima fluidificação (Vmf) e vazão de recirculação para a argila expandida, foram calculadas a partir de dados experimentais de velocidade superficial e perda de carga descritas por Amorim (2009). A vazão de recirculação nos reatores termofílicos foi mantida em 0,98 L

min.⁻¹ (expansão de 30%), e velocidade superficial 1,30 vezes a velocidade mínima de fluidificação (1,24 cm s⁻¹).

Aplicando os dados supradescritos foi possível calcular a vazão de recirculação necessária para manter a velocidade superficial 1,3 vezes a Vmf, parâmetro necessário para a fluidificação ideal do leito. O valor da velocidade superficial para a partícula de cinasita foi de 1,612 cm s⁻¹ e com o uso de um medidor de vazão acoplado no reator, a bomba de recirculação foi regulada. Subsequentemente foi acionada a bomba, deixando o sistema permanecer em recirculação como se estivesse em batelada, apenas com água e sem material suporte, com a vazão de recirculação de 0,98 L min.⁻¹, com a finalidade de verificar possíveis vazamentos e/ou irregularidades do sistema.

Os reatores possuíam sistemas de controle de temperatura por meio de banho ultratermostatizado (Marconi MA-184), operando em faixa termofílica, especificamente à 55 ± 1 °C. A troca de calor para consequente manutenção da temperatura se dá por meio de encamisamento na parte exterior e serpentina na forma de U no interior do reator, por onde circula a água proveniente do banho.

O esquema do reator anaeróbio de leito fluidificado termofílico (configuração idêntica para todos os quatro reatores) utilizados para a produção de hidrogênio encontrase ilustrado na Figura 4.2.



4.4. Condições operacionais e procedimento de partida dos reatores

Foram utilizados quatro reatores denominados, reator de sacarose (RS), reator de caldo de cana-de-açúcar (RC), reator de melaço (RM) e reator de vinhaça (RV) de idêntica configuração, com concentração afluente de 5.000 mg DQO L⁻¹. O elevado conteúdo orgânico presente nos substratos reais foi diluído em água, para assim obter a concentração citada.

Inicialmente, todos os quatro RALF termofílicos foram operados no modo batelada (recirculação) pelo tempo necessário ao consumo de cerca de 80% do carboidrato introduzido inicialmente. Esse procedimento tem como intuito promover a aderência da biomassa ao material suporte e adaptá-la ao substrato. O pH inicial dos sistemas termofílicos no momento da partida foi mantido entre 4 e 4,5. Este valor foi alcançado mediante a adição de ácido clorídrico (30% v/v), sendo adicionados o valor máximo de 2,0 mL L⁻¹, além da adição de ácido acético glacial, a fim de manter o pH nesses valores citados, ideais ao desenvolvimento dos microrganismos acidogênicos e limitante aos metanogênicos. Após o período de recirculação, os reatores foram operados em modo contínuo. Os TDH e TCO aplicados aos reatores são descritos na Tabela 4.10, sendo que a mudança de fase se deu após estabilização (variação inferior a 10% durante período de 10 dias) dos parâmetros de consumo de carboidratos e produção de hidrogênio.

<u> </u>		<u>r</u>	
	Fase	TDH (h)	$\frac{\text{TCO}}{(\text{kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1})}$
	1	8	15
	2	6	20
	3	4	30
	4	2	60
	5	1	120

Tabela 4.10. Condições operacionais impostas aos RALF

4.5. Análises físico-químicas

Foram realizadas análises físico-químicas periódicas nas amostras coletadas do afluente e efluente, além do biogás produzido, de todos os quatros reatores. Para fins de monitoramento, foram realizadas constantemente medidas de vazão, de efluente e biogás, pH afluente e efluente.

As determinações nas amostras líquidas compreenderam análises de carboidratos totais solúveis segundo metodologia descrita por Dubois *et al.* (1956), demanda química de oxigênio (DQO), sólidos suspensos, voláteis e fixos, segundo APHA (2012).

As caracterizações do caldo, melaço e vinhaça in natura e pré-tratada, além das análises descritas incluíram macro e micronutrientes e carbono orgânico total (COT) segundo metodologia descrita em APHA (2012), análises de sulfato por meio da utilização de kits comerciais (HACH Dr 820 Field Test Kit®) e avaliadas por método colorimétrico.

4.5.1. Determinação dos ácidos orgânicos e álcoois

As concentrações dos ácidos orgânicos (cítrico, málico, succínico, láctico, fórmico, acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico, e capróico) e álcoois (etanol, metanol e n-butanol) foram determinadas por cromatografia líquida de

alta eficiência (CLAE) aparelho Shimadzu® equipado com 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 utilizada foi H_2SO_4 (0.01 N) a 0.5 mL min⁻¹.

Os limites de detecção (mg L⁻¹) para cada ácido orgânico, etanol e metanol foram: ácido cítrico (5,01); ácido málico (5,02); ácido succínico (5,01); ácido láctico (5,03); ácido fórmico (5,52); ácido acético (6,06); ácido propiônico (5,94); ácido iso-butírico (4,29); ácido butírico (5,16); ácido isovalérico (3,83); ácido valérico (5,29); ácido capróico (2,98); etanol (5,02) e metanol (5,05).

4.5.2. Determinação do hidrogênio e da composição do biogás

A produção volumétrica de todo o biogás formado no reator foi medida por meio de medidor de gás tipo proveta invertida (Walker *et al.*, 2009). Este sistema é constituído por uma proveta com solução ácido-salina, invertida dentro de um béquer, sendo que o volume do biogás é mensurado pelo deslocamento da solução líquida para a parte externa da proveta, promovida pela entrada do biogás.

A determinação do gás hidrogênio foi feita por cromatografia gasosa (Shimadzu GC-2010), equipado com detector de condutividade térmica, utilizando a coluna Sigma-Aldrich modelo Carboxen® 1010 Plot (30 m de comprimento e diâmetro interno de 0,53 mm). Para tanto, foram retiradas amostras, em triplicatas, de 1,0 mL da fase gasosa do *headspace* do reator em análise (seringa *gastigh* com trava). O gás de arraste na cromatografia gasosa foi o argônio, sob o fluxo de 21,9 cm s⁻¹. As temperaturas do forno, da coluna e do detector foram de 30, 200 e 230°C, respectivamente.

4.6. Frequência das análises

A pesquisa foi dividida em fases operacionais, conforme a diminuição do TDH aplicado aos reatores RALF termofílicos alimentados com diferentes substratos da indústria sucroalcooleira, de acordo com as especificações abordadas nos itens anteriores. A alteração do TDH se deu quando atingido o estado estacionário no reator, principalmente com referência aos valores de consumo de carboidratos e produção de hidrogênio. No decorrer do procedimento operacional dos reatores termofílicos, foram realizadas análises físico-químicas para o monitoramento dos mesmos. A Tabela 4.11 apresenta a frequência de coleta e análise de amostras para todas as fases deste estudo.

Análises	Frequência		
pH, vazão de efluente e biogás	7X semana		
Demanda Química de Oxigênio e carboidratos totais	3X semana		
Conteúdo de H ₂ no biogás	3X semana		
Ácidos orgânicos	3X semana		
Sólidos suspensos(totais, fixos e voláteis)	3X semana		
Sulfato	1X semana		
Fosfato e nitrogênio _(NTK)	1X lote		

Tabela 4.11. Frequência de coletas e análises, físico-químicas e microbiológicas, realizadas ao longo do experimento

4.7. Cálculo dos principais parâmetros

Esse item apresenta os principais cálculos utilizados para a determinação dos parâmetros desse estudo, os quais abrangem a taxa de carregamento orgânico aplicada teórica (1), produção volumétrica de H₂ (2), rendimento de hidrogênio (3) e com base em Han *et al.* (2012b), produção energética (4).

$$= \left[\frac{\text{Concentração do substrato } (g L^{-1})}{\text{TDH}_{teórico} (dias)} \right] \text{ kg m}^{-3} d^{-1}$$

2. Produção volumétrica de
$$H_2$$
 (PVH)

$$= \left[\frac{\left(\frac{\text{Quantidade de H}_2(\text{mL})\text{produzida}}{\text{tempo (h)}} \right)}{\text{Volume do leito do reator (L)}} \right] \text{mL H}_2 \text{ h}^{-1}\text{L}^{-1}$$

3. Rendimento de H₂ (HY) =
$$\begin{bmatrix} PVH (mol H_2 d^{-1} m^{-3}) \\ \hline Carb_{consumido} (mol_{sac.} d^{-1}m^{-3}) \end{bmatrix} mol de H_2 mol_{sac.}^{-1}$$

4. Produção energética

=
$$[H_2 \pmod{h^{-1}L^{-1}} \times 286 \text{kJ} \mod_{H_2}^{-1}]$$

+ $[EtOH(\mod{h^{-1}L^{-1}}) \times 1366 \text{kJ} \mod_{EtOH}^{-1}] \text{kJ} h^{-1}L^{-1}$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo descreve todos os resultados obtidos na operação dos quatro RALF termofílicos - RS, RC, RM e RV -, o que possibilita a realização da discussão comparativa, respeitando as diferenças de composição de substrato, temperatura, configuração de reatores, dentre outros fatores.

5.1.RALF alimentado com sacarose – RS

Neste tópico estão descritos os aspectos relativos à produção de H_2 em RALF em temperatura termofílica (55°C) utilizando sacarose como substrato.

Na fase inicial de operação, o RS foi mantido em recirculação, inoculação/circuito fechado, durante 10 dias (Tabela 5.1), tempo necessário para adaptação dos microrganismos às condições hidrodinâmicas do sistema e consequente consumo da ordem de 80% dos carboidratos disponíveis inicialmente. Posteriormente, o sistema foi aberto submetendo o RS às cinco fases operacionais descritas na Tabela 5.1.

Fase	TDH (h)	TCO	Duração da
1 doe	TDII (II)	$(\text{kg DQO m}^{-3} \text{d}^{-1})$	fase (dias)
Inoculação	-	-	10
1	8	15	60
2	6	20	44
3	4	30	78
4	2	60	36
5	1	120	25

Tabela 5.1. Descrição das fases de operação do RS e suas características

5.1.1. Conversão de carboidratos

Como citado no item 4.5.1. Determinação de carboidratos totais solúveis, o carboidrato utilizado como padrão em sua respectiva análise foi sacarose, por se tratar da maioritária parte dos açúcares existentes nos compostos aqui tratados, por isso, as relações tratadas com os termos carboidratos ou sacarose expressam a mesma substância/parâmetro.

As concentrações de carboidratos afluentes permaneceram entre 4.808 e 6.167 mg L^{-1} enquanto que a variação da concentração efluente foi entre 1.941 e 4.529 mg L^{-1} . A redução do TDH de 8 para 1h acarretou em aumento da TCO de 15 para 123 kg DQO m⁻³ d⁻¹, o que refletiu na conversão de carboidratos. O incremento da TCO de 15 para 30 kg DQO m⁻³ d⁻¹ causou aumento de 47,9 para 57,7% na conversão de carboidratos, porém, os

posteriores incrementos de TCO impostos ao RS, elevação para 59 e 123 kg DQO m⁻³ d⁻¹, acarretaram na redução do consumo, o qual atingiu 26,5% quando neste maior valor de TCO, assim como descrito na Figura 5.1 e Tabela 5.2.



Figura 5.1. Concentrações e conversões de carboidratos referentes ao RS

Tabela 5.2. Concentrações médias e conversões de carboidratos no RS

TDH (h)	8	6	4	2	1
Afluente (mg L ⁻¹)	5211 ± 626	4808 ± 998	4458 ± 344	5519 ± 456	6167 ± 491
Efluente (mg L ⁻¹)	2806 ± 649	2096 ± 681	1941 ± 330	3287 ± 298	4529 ± 376
Conversão (%)	$47,9\pm9$	$55,7\pm10$	$57,7\pm5$	$40,4 \pm 3$	$26,5\pm4$

Para avaliar o efeito do TDH (4-0,5h) em RALF (45°C), Lee *et al.* (2006) operaram reator alimentado com sacarose (17.800 mg L⁻¹), no qual lograram valores de conversão de carboidrato superiores, porém, comportamento semelhante ao RS. Esses autores obtiveram sutil incremento das conversões (94,1; 94,6 e 95,0%) com o decréscimo do TDH (4, 2, 1h), porém, para o TDH de 0,5h, houve uma abrupta redução da conversão de sacarose (78%). Assim como Zhang *et al.* (2007) que obtiveram 99, 96, 90 e 71% para TDH de 4, 2, 1 e 0,5h em operação de RALF (37°C) alimentado com glicose (10.000 mg L⁻¹). Esse comportamento retrata o fato de incremento da conversão até TDH que proporcione a carga orgânica limite, 1h para Lee *et al.* (2006), 4h para Zhang *et al.* (2007) e 4h para RS, sendo que os posteriores TDH são referentes a fases de

sobrecarga orgânica, o que tem como consequência a redução da conversão de carboidratos.

Infantes *et al.* (2011) ao avaliarem a influência da temperatura na produção de H_2 em pH 4, verificaram menor conversão de glicose (conversão de 50%) para temperaturas mais elevadas (40°C) quando comparadas a temperaturas inferiores (26 e 30°C), cerca de 90 e 100%, respectivamente. Esse fator justifica a menor conversão de carboidratos por parte do RS quando comparados a sistemas mesofílicos.

Santos *et al.* (2014a) operou RALF (55°C) utilizando vinhaça de cana-de-açúcar (5.000 mg DQO L⁻¹) como substrato, no qual obteve aumento da conversão de 27,1 para 52,6% com a redução do TDH de 8 para 2h, sendo que para a posterior redução (TDH de 1h) houve diminuição na conversão (41%). Comportamento semelhante ao obtido para o RS, apesar de se tratar de valores inferiores, justificáveis por se tratar de água residuária real. Este fato reforça a afirmação supracitada sobre operação em sobrecarga orgânica.

5.1.2. Composição do biogás

A composição do biogás produzido pelo RS foi condicionada ao TDH aplicado ao mesmo, restringindo-se a H₂ e CO₂, fato esse que ressalta a efetividade do pré-tratamento do lodo, associado a outros fatores operacionais como baixo pH e elevada carga orgânica, para o não estabelecimento dos microrganismos metanogênicos. Fica evidente o progressivo aumento da concentração de H₂ consequente da redução do TDH e consequente aumento da TCO. A concentração de H₂ no biogás se elevou de 56,7 para 64,8% com a redução do TDH de 8 para 1h, como se pode verificar na Figura 5.2 e Tabela 5.3.



Figura 5.2. Composição do biogás produzido pelo RS segundo TDH aplicado

Tabela 5.3. Concentração dos componentes do biogás produzido pelo RS

TDH (h)	8	6	4	2	1	
$H_{2}(\%)$	$56,7\pm5$	58,9 ± 3	59 ± 4	59 ± 7	$64,8\pm 6$	
CO ₂ (%)	43,3 ± 6	$44,7 \pm 4$	$43,9\pm4$	41,6 ± 6	37,8 ± 6	

Wu *et al.* (2007), operaram RALF (35°C) alimentado com sacarose (20.000 mg DQO L⁻¹), com polietileno como material suporte e variação da Vup (0,55-0,91 cm s⁻¹). A máxima concentração de H₂ (38%) foi obtida em Vup de 0,55 cm s⁻¹, valor esse inferior aos logrados no RS (56,7-64,8%).

Ao operarem RALF (37°C) inoculado com *Citrobacter freundii* e *Enterobacter cloacae*, alimentado com sacarose (17.650 mg L⁻¹) e submetido a TDH de 9,3 e 4,6h, Thompson *et al.* (2008) verificaram incremento da concentração de H₂ no biogás com a redução do TDH, passando de 42% para 55% quando o TDH foi alterado de 9,3 para 4,6h, respectivamente. Apesar de se tratar de concentrações inferiores, o comportamento destas foi semelhante ao obtido para o RS, pois neste a concentração de H₂ se elevou com a redução do TDH, sendo que para os TDH de 8 e 4h, valores mais próximos aos utilizados por Thompson *et al.* (2008), a concentração de H₂ no biogás foram de 56,7 e 59%.

Ao operarem reator de leito trifásico fluidizado (40°C) utilizando mesmo substrato (sacarose) e concentração (5.000 mg DQO L⁻¹) ao RS, Lin *et al.* (2009), verificaram influência do TDH na concentração de H₂. Estes autores relatam valores de 44,8, 45,3 e

46,1%, para TDH de 6, 4 e 2h, respectivamente. Apesar de valores inferiores aos obtidos no RS (58,9; 59; 59%) quando nestes mesmos TDH, esses autores descrevem o mesmo comportamento, pois como se pode notar na Tabela 5.3, houve acréscimo da concentração de H₂ condicionada pela redução do TDH.

Com a confrontação de valores de concentração de H_2 no biogás em sistema mesofílicos e termofílicos pode-se notar valores superiores para estes últimos, pois assim como cita O-Thong *et al.* (2009) há favorecimento termodinâmico, o que aumenta as reações químicas e biológicas.

Ngoma *et al.* (2011) obtiveram concentrações de H₂ condicionadas pela temperatura de operação de dois RALF (45 e 70°C) com substrato a base de sacarose (17.800 mg L⁻¹), obtendo 45 e 67% para os RALF operados a 45 e 70°C.

Ainda nesse sentido, Obazu *et al.* (2012) descreveram essa mesma influência na operação de reatores anaeróbios de leito granular fluidificado (RALGF) sob diferentes temperaturas. Operados com substrato a base de sacarose (17.800 mg L⁻¹), os RALGF sob temperaturas de 45 a 60°C, lograram composições de biogás de 40 e 69%.

Os valores de concentração de H₂ obtidos para o RS se situam entre os citados nos dois últimos estudos (Ngoma *et al.*, 2011 e Obazu *et al.*, 2012), fato esperado, pois a temperatura de operação (55°C) se enquadra na faixa intermediária a seus reatores.

5.1.3. Produção volumétrica de hidrogênio

A produção volumétrica de hidrogênio (PVH) está relacionada à taxa de carregamento orgânico (TCO) aplicada ao reator, sendo este o motivo para apresentação destes parâmetros inter-relacionadamente. Pode-se afirmar que houve um expressivo aumento da PVH condicionada ao aumento da TCO aplicada ao RS. A PVH média passou de 67,8 para 194,9 mL H₂ h⁻¹ L⁻¹ com a redução do TDH (8 para 1h) e consequente aumento da TCO (15 para 123 kg DQO m⁻³ d⁻¹), como se pode verificar na Figura 5.3 e Tabela 5.4.



Figura 5.3. Produção volumétrica de H₂ (PVH) e taxa de carregamento orgânico (TCO)

Tabela 5.4. Produção volumétrica de H_2 (PVH) e taxa de carregamento orgânico (TCO) segundo o TDH aplicado

TDH (h)	8	6	4	2	1
$PVH (mL h^{-1} L^{-1})$	$67,8\pm15$	$130,8\pm13$	$173,6 \pm 11,4$	$182,5\pm33$	$194{,}9\pm57$
PVH (mmol $h^{-1} L^{-1}$)	$2,4\pm0,5$	$4{,}7\pm0{,}5$	$6,3\pm0,4$	$6{,}8\pm2{,}0$	$7,0\pm2,0$
TCO (kg DQO $m^{-3} d^{-1}$)	15	20	30	59	123

Wu *et al.* (2007), operaram RALF (35°C) alimentados com sacarose (20.000 mg DQO L⁻¹) e variação da velocidade ascensional (0,55-0,91 cm s⁻¹). A máxima PVH (59 mmol H₂ L⁻¹ h⁻¹) foi obtida em vel. ascensional de 0,91 cm s⁻¹, valor esse superior aos obtidos neste estudo (Tabela 5.4), possivelmente por utilizar substrato de concentração quatro vezes a empregada no RS. Operando reator de leito trifásico (40°C) com água residuária sintética a base de sacarose (5.000 mg DQO L⁻¹), Lin *et al.* (2009) lograram sua máxima PVH (0,37 L H₂ h⁻¹ L⁻¹) quando em operação em TDH de 2h. PVH esta, superior ao 194,9 mL H₂ h⁻¹ L⁻¹ logrado no RS.

Ngoma *et al.* (2011) avaliaram o efeito da temperatura e da taxa de recirculação na produção de hidrogênio em RALF alimentados com sacarose (17.800 mg L⁻¹). Os dois RALF foram operados sob duas temperaturas distintas (45 e 70°C), submetendo-os a duas diferentes taxas de recirculação (1,3 e 3,5 L min⁻¹). Para o RALF operado à 45 e 70°C, o incremento da taxa de recirculação, provocou a elevação da PVH de 2,1 para 8,7 e 2,8 para 14,8 L H₂ h⁻¹ L⁻¹, respectivamente.

Comportamento semelhante obtiveram Obazu *et al.* (2012) ao operarem RALGF com temperaturas de 45 e 60°C alimentados com substrato à base de sacarose (17.800 mg

L⁻¹) e taxas de recirculação de 3,5 e 3,2 L min.⁻¹. Dentre as possíveis configurações avaliadas, sua máxima PVH (269,8 mmol $H_2 L^{-1} h^{-1}$) foi obtida quando em temperatura de 60°C, se aplicou taxa de recirculação de 3,5 L min.⁻¹ e pH 7,2.

Os valores de PVH logrados para o RS (Tabela 5.4) foram inferiores aos descritos por Ngoma *et al.* (2011) e Obazu *et al.* (2012), porém, apesar de haver sido operado com temperatura intermediária as utilizada por esses trabalhos, foi operado com substrato de concentração cerca de 4 vezes inferior, além de taxa de recirculação de 0,98 L min⁻¹, o que com base nos próprios resultados citados pelos autores, aponta implicitamente para produtividades inferiores.

Braga *et al.* (2015) operando reator UASB (55°C) alimentado com sacarose (1,780 mg L⁻¹), relatou comportamento semelhante, porém, com PVH inferiores; aumento de 5,69 para 75,33 mL H₂ h⁻¹ L⁻¹ para um aumento da TCO de 4 para 24 kg DQO m⁻³ d⁻¹. Dong *et al.* (2011) operaram reator UASB (55°C) com sacarose (10.000 mg DQO L⁻¹) como fonte de carbono, no qual obtiveram incremento da PVH de 40 para 165 mL H₂ h⁻¹ L⁻¹ consequente da redução do TDH de 50 para 12h. Valore inferiores aos logrados neste estudo.

Há que se guardar as diferenças hidrodinâmicas entre os reatores citados, o fato de expor os dados de PVH à luz da literatura atual exigiu tais comparações, pois há poucos relatos de RALF termofílico operado com sacarose.

5.1.4. Rendimento de hidrogênio

O rendimento de H_2 (HY) representa a conversão de elétrons oriundos da conversão do carboidrato em H_2 . Esse parâmetro também se mostrou influenciado pela redução do TDH. Houve incremento do HY de 1,27 para 1,97 mol H_2 mol⁻¹sacarose quando o TDH foi reduzido de 8 para 4h, porém, os posteriores decréscimos deste parâmetro (TDH de 2 e 1h) resultaram em reduções no HY, chegando a 0,81 mol H_2 mol⁻¹sacarose quando operado em TDH de 1h (Figura 5.4).





Operando RALF (35°C) alimentado com sacarose (20.000 mg DQO L⁻¹) submetido a diferentes Vup (0,55-0,91 cm s⁻¹), Wu *et al.* (2007) verificaram incrementos de HY de 1,04 a 1,28 mol H₂ mol⁻¹sacarose quando incrementada a Vup de 0,55 para 0,91 cm s⁻¹. Valores estes inferiores ao máximo HY logrado pelo RS (1,97 mol H₂ mol⁻¹sacarose), quando operado em TDH de 4h.

Diferentemente de Wu *et al.* (2007) e RS, Thompson *et al.* (2008) utilizaram culturas puras (*Citrobacter freundii* e *Enterobacter cloacae*) em RALF (37°C) a partir de sacarose (17.650 mg L⁻¹), no qual lograram 2,33 mol H₂ mol⁻¹sacarose. Este HY é superior ao máximo logrado no RS (1,97 mol H₂ mol⁻¹sacarose), porém, como já ressaltado, trata-se de culturas puras as quais possuem características intrínsecas de rendimento, além da possibilidade de atendimento de suas necessidades específicas (pH, temperatura, micronutrientes) diferentemente de culturas mista, como é o caso do RS.

Lin *et al.* (2009) obtiveram HY superior (3,36 mol H₂ mol⁻¹sacarose) aos HY obtidos no RS, quando operaram reator anaeróbio de leito trifásico fluidificado (40°C), alimentado com sacarose (5.000 mg DQO L⁻¹), porém, com taxa de recirculação (5 L min⁻¹) cerca de 5 vezes superior a utilizada neste estudo (0,98 L min⁻¹). Fato esse que proporciona maiores HY, pois segundo estudo desenvolvido por Ngoma *et al.* (2011) o incremento de 2,7 vezes (de 1,3 para 3,5 L min⁻¹) na taxa de recirculação em RALF (45°C e 70°C) condicionou aumento de 4 a 5 vezes no HY.

Assim como a taxa de recirculação, a temperatura é outro fator influente no HY, Ngoma *et al.*, 2011 estudaram estes dois parâmetro utilizando dois RALF (45 e 70°C) alimentados com sacarose (17.800 mg L⁻¹). Para taxa de recirculação de 1,3 L min⁻¹, próxima a 0,98 L min⁻¹ imposto ao RS, obtiveram 0,3 e 0,41 mol H₂ mol⁻¹glicose para os RALF operados a 45 e 70°C, respectivamente. Esses valores representam 7,5 e 10,3% da máxima teórica para glicose, valores inferiores ao máximo HY logrado pelo RS (1,97 mol H₂ mol⁻¹sacarose) cerca de 24% da máxima teórica para a sacarose. Vale ressaltar que o aumento da temperatura em 25°C (diferença entre 40 e 70°C) promoveu a elevação do HY em 36%.

Como é sabido, a produção de H_2 por culturas mista possuem diversos fatores que impossibilitam lograr valores próximos aos teóricos; primeiro por não se atender às necessidades biológicas específicas de cada espécies (pH, temperatura, micronutrientes), além de haver desenvolvimentos de espécies menos produtivas, como é caso das enterobactérias e outros anaeróbios facultativos, que possuem como limite teórico 2 mol H_2 mol⁻¹glicose (Nath & Das, 2004; Hallenbeck, 2009).

Braga *et al.* (2015) operando um reator UASB (55°C) utilizando sacarose (1.781 mg L⁻¹) como substrato e TDH variando de 12 a 2h, obtiveram HY entre 0,84 e 1,73 molH₂ mol⁻¹sacarose, condicionados pelo TDH. Estes valores são semelhantes aos logrados pelo RS (entre 0,81 e 1,97 mol H₂ mol⁻¹sacarose). Cabe ressaltar as diferença hidrodinâmicas destes reatores, UASB e RALF, sendo que este último possui características de transferência de massa superiores, motivo pelo qual, possivelmente, resultou em máximo HY cerca de 15% maior.

Dong *et al.* (2011) operaram um UASB (55°C) no qual utilizaram sacarose (10.000 mg DQO L⁻¹) como substrato. Diferentemente de Braga *et al.* (2011), esses autores obtiveram seu máximo HY (3,06 mol H₂ mol⁻¹sacarose) quando operaram em TDH de 16h, o qual não representa seu menor TDH, esse comportamento é semelhante ao obtido no RS, pois houve incremento do HY (1,27 para 1,97 mol H₂ mol⁻¹sacarose) quando reduzido TDH de 8 para 4h, porém, os posteriores TDH (2 e 1h) houve redução do HY. Esse fato se deve a sobrecarga orgânica, que ocorreu no RS para TDH inferiores a 4h, para o experimento relatado por Dong *et al.* (2011) para TDH de 12h e no estudo desenvolvido por Braga *et al.* (2015) não ocorreu, possivelmente por se tratar de concentração de substrato cerca de 5 vezes inferior a Dong *et al.* (2011).

5.1.5. Metabólitos solúveis

Assim como relatado na revisão bibliográfica, item 3.4.1, a produção de H_2 gera, inevitavelmente, metabólitos dissolvidos, podendo ser eles ácidos orgânicos voláteis e/ou

solventes. Os metabólitos dissolvidos produzidos pelo RS são apresentados na Figura 5.5 e Tabela 5.5. De acordo com estes dados, os metabólitos se resumiram a ácido Acético, ácido Propiônico, ácido Butírico, ácido Lático, ácido Málico, ácido Fórmico e Etanol. Na fase de maior produção de H₂ (TDH 1h), se configurou a rota mista, com presença de Etanol (29,9%), Lático (27,4%), Acético (20,1%) e Butírico (12,1%) e Málico (10,5%).



Figura 5.5. Distribuição, em percentual molar, dos metabólitos dissolvidos

HAc: ácido Acético, HPr: ácido Propiônico, HBu: ácido Butírico, HLa: ácido Lático, HMa: ácido Málico, HFo: ácido Fórmico, EtaOH: Etanol, HSu: ácido Succínico.

Fase	TDH		EtaOH	HLa	HAc	HBu	HMa	HPr	HSu	HFo	HCa
1	8	$mg \; L^{\text{-1}} \pm \sigma$	$0,0\pm0,0$	$0,0\pm0,0$	$234,2 \pm 54,3$	$0,0\pm0,0$	$0,0\pm0,0$	319,6 ± 85,2	207,3 ± 69,6	$0,0\pm0,0$	88,7 ± 3,1
1	0	%	0	0	35,15	0	0	38,88	15,82	0	7,1
2	6	$mg \ L^{\text{-1}} \pm \sigma$	$141,7\pm42,8$	744,1 ± 37,5	311,8 ± 18,5	$255,8\pm19,5$	$232,2 \pm 11,2$	$0,0\pm0,0$	$0,\!0 \pm 0,\!0$	$0,0\pm0,0$	$0,0\pm0,0$
2	0	%	14,3	39	24,5	13,7	8,2	0	0	0	0
3	4	$mg \ L^{\text{-1}} \pm \sigma$	$266,7 \pm 111,4$	719,6 ± 43,0	$287,5\pm21,2$	$258,5\pm25,6$	$212,5\pm13,1$	$0,0\pm0,0$	$0,0\pm0,0$	$96,2 \pm 2,0$	$0,0\pm0,0$
5	•	%	25	31,7	19	11,7	6,3	0	0	8,3	0
4	2	$mg \ L^{\text{-1}} \pm \sigma$	$226{,}9\pm35{,}2$	$506,5\pm69,4$	$309,8\pm61,5$	$291 \pm 98{,}3$	$236,8\pm37,3$	$0,0\pm0,0$	$0,0\pm0,0$	$0,0\pm0,0$	$0,0\pm0,0$
•	2	%	23,7	27,1	19	15,9	8,5	0	0	0	0
5	1	$mg \ L^{\text{-1}} \pm \sigma$	$226{,}7\pm18{,}1$	$406,3\pm36$	$198,\!6\pm36,\!7$	$175,1\pm9,7$	$232,6\pm12,5$	$0,0\pm0,0$	$0,0\pm0,0$	$0,0\pm0,0$	$0,0\pm0,0$
5	1	%	29,9	27,4	20,1	12,1	10,5	0	0	0	0

Tabela 5.5. Metabólitos detectados pelo RS durante as cinco fases operacionais

EtOH: Etanol; HLa: ácido Lático; HAc: ácido Acético; HBu: ácido Butírico; HMa: ácido Málico; HPr: ácido Propiônico;; HSu: ácido Succínico; HFo: ácido Fórmico; HCa: ácido Capróico.

Na operação de reator de leito trifásico fluidizado, semelhante ao RALF (40°C), Lin *et al.* (2009) avaliaram diversas concentrações de sacarose no substrato (5.000 a 40.000 mg DQO L⁻¹) e TDH (6, 4 e 2h). Tomando os valores de concentração de substrato de 5.000 mg DQO L⁻¹, semelhante à concentração utilizada nesse trabalho, e o TDH de maior produção de H₂ (2h), os metabólitos produzidos seguiram a seguinte distribuição; HBu (52%), HAc (23%), HPr (15%) e EtOH (10%), o que caracteriza a rota fermentativa butano-acética, pois a soma do HBu e HAc representou de 75% dos metabólitos totais produzidos.

Esse estudo obteve rota mista, com presença de solvente (EtOH) e ácidos (HLa e HAc) com metabólitos predominantes, o que contradiz O-Thong *et al.* (2009) que relata dominância da via metabólica do acetato contrariamente a do etanol ou do lactato para sistemas operados em temperaturas termofílicas.

Distribuição semelhante relatou Santos *et al.* (2014a) ao operarem RALF (55°C) com co-substrato de vinhaça e glicose (5.000 mg DQO L⁻¹) em TDH de 1h, no qual verificaram prevalência de HSu (44,5%), além de HAc (17,6%), HLa (14,1%), EtOH (9,3%) e HBu (7,38%). Por haver elevada concentração de HSu, substância de elevada composição energética, esses autores lograram PVH (0,53 L h⁻¹ L⁻¹) inferior ao 2,58 L h⁻¹ L⁻¹ obtidos nesse estudo.

Apesar de reportarem distribuição de metabólitos similar à obtida no RS, ácido láctico (26,8%), ácido butírico (26,4%), ácido acético (22,82%), ácido propiônico (15,29%), ácido succínico (4,8%) e ácido isobutírico (3,9%), Santos *et al.* (2014b), operando RALF (55°C) alimentado com vinhaça (10.000 mg DQO L⁻¹) e TDH de 1h, lograram máxima PVH (1,96 L h⁻¹ L⁻¹) inferior ao RS.

O comportamento da distribuição dos metabólitos dissolvidos presentes na efluente do RS seguiu o descrito por Braga *et al.* (2015), utilizando reator UASB (55°C), alimentado com sacarose (1.783 mg L⁻¹) e operado sob diferentes TDH (12, 6 e 2h), descreveram a composição da fase inicial maioritariamente (82%) representada por ácidos – acético, butírico e propiônico - e posteriormente, com o aumento da disponibilidade de íons H⁺, causada pela redução do TDH e consequente aumento da carga orgânica, verificaram mudança de rota fermentativa, passando a produção de álcoois e ácido láctico. Segundo estes autores, essas alterações são estratégias microbianas para regeneração do NADH sem aumento da pressão parcial de H₂. Fato apreciável na Figura 3.3, a qual deixa claro a regeneração de dois NADH na formação de um mol de Etanol e um NADH quando formado um mol de lactato. Essa regeneração proporciona menor formação de H₂, quando comparado a rotas acética e/ou butírica, fato esse que justifica a maior produção de H₂ relatada por alguns autores (Ngoma *et al.*, 2011 e Obazu *et al.*, 2012).

5.1.6. Conversão de DQO, pH e sólidos suspensos

Por se tratar de uma fermentação, com formação de metabólitos reduzidos dissolvidos na corrente líquida, há uma sutil conversão da DQO.

As DQO afluente permaneceram entre 5.049 e 5.237 mg L^{-1} , atendendo, dentro de variação inferior a 10%, concentração de 5.000 mg L^{-1} , idealizada inicialmente. As DQO efluentes se mantiveram entre 4.443 e 4.929 mg L^{-1} , com conversões de DQO da ordem de 10%, como se pode apreciar na Tabela 5.6.

Tabela 5.6. Concentração e conversão de DQO promovida no RS

TDH (h)	8	6	4	2	1
Afluente (mg L ⁻¹)	5179 ± 395	5175 ± 458	5049 ± 342	5182 ± 320	5237 ± 246
Efluente (mg L ⁻¹)	4560 ± 366	4479 ± 444	4443 ± 379	4728 ± 284	4929 ± 231
Conversão (%)	$11,8\pm 6$	$13,3\pm5$	$11,9 \pm 6$	$8,5\pm 6$	$5,8\pm4$

Em respeito à conversão de DQO, as fases 1 e 3 resultaram em 12%, sendo que para a fase 2 a média foi de 13%, valores semelhantes, consequentes da semelhantes distribuição dos ácidos orgânicos voláteis produzidos pelo sistema. Gomes *et al.* (2015) relata conversão máxima de 19%, quando operaram um reator de leito fixo adaptado com sacarose como substrato (4.000 mg DQO L⁻¹). Han *et al.* (2010) relataram valores de conversão de DQO entre 23 e 12%, condicionados a TCO aplicada ao CSTR (35°C) tratando melaço de beterraba (10.000 mg DQO L⁻¹). Valores estes superiores, porém próximos aos obtidos no RS.

Santos *et al*, (2014a) obteveram valores de conversão de DQO semelhantes (7,7-13,4%) aos logrados no RS, ao operar o RALF (55°C) alimentado com vinhaça (5.000 mg DQO L^{-1}).

A respeito aos pH afluentes e efluentes do RS pode-se notar que os valores se mantiveram relativamente constantes, com variação de 7 a 7,5 para valores afluentes e 3,8 e 4,2 para efluentes, evidentes aos se analisar a Tabela 5.7.

TDH	$pH_{afluente}$	$pH_{efluente}$
8	$7,2 \pm 0,3$	$4,0 \pm 0,3$
6	$7,4 \pm 0,1$	$3,8 \pm 0,1$
4	$7,5 \pm 0,2$	$4,2\pm0,6$
2	$7,2 \pm 0,1$	$4,0 \pm 0,1$
1	$6{,}9\pm0{,}6$	$4,0 \pm 0,3$

Tabela 5.7. Valores médios de pH afluente e efluente

Anzola-Rojas *et al.* (2015) descreveram valores de pH entre 4 e 4,6 ao operarem APBR (25°C) alimentado sacarose (2.000 mg DQO L⁻¹). Assim como Braga *et al.* (2015) quando operando reator UASB (55°C) em TDH de 2h, fase de máxima PVH e HY, registrou pH de 4,23. Valores estes semelhantes aos registrados para as fases mais produtivas do RS (Tabela 5.7).

Os sólidos suspensos totais (SST), fixos (SSF) e voláteis (SSV) foram mensurados a partir da corrente efluente do RS. Assim como se pode apreciar na Tabela 5.8, os valores de SST, SSF e SSV permaneceram entre 98-132, 79-127 e 2-26 mg L^{-1} , respectivamente.

TDH	SST (mg L^{-1})	SSF (mg L^{-1})	$SSV (mg L^{-1})$	SSV (%)
8	$112,\!4\pm0,\!1$	$85,5\pm0,1$	$27,8\pm8$	24,5
6	$107,8\pm42$	$79,1\pm36$	$28,7\pm11$	26,6
4	98 ± 19	$85,7\pm19$	$12,3\pm4$	12,6
2	$129,6\pm26$	$127,3\pm27$	$2,3 \pm 2$	1,8
1	$132,6\pm38$	$124,5\pm33,2$	$8,2 \pm 6$	6,1

Tabela 5.8. Sólidos suspensos totais (SST), suspensos fixos (SSF) e suspensos voláteis (SSV) referentes ao RS em suas respectivas fases de operação

A fração dos sólidos tida como referência para arraste de biomassa é a de sólidos voláteis, podendo ser relacionada, com base na Tabela 5.8, com o maior desprendimento de microrganismos do material suporte. Apesar de não se tratar de sistema que sofra arraste de biomassa com o reduzir do TDH, fato comprovado pelas pequenas frações de SSV presentes no efluente, a menor porcentagem condicionada à redução do TDH pode sinalizar para redução do desprendimento, possivelmente por haver uma maior seleção das colônias presentes em menores TDH.

O notável aumento da fração de sólidos fixos (SSF) está relacionado ao incremento de substâncias (nutrientes e detritos em geral) inseridas no reator com a redução do TDH.

5.2.RALF alimentado com caldo – RC

Neste tópico está descrito o comportamento do reator anaeróbio de leito fluidificado operado em temperatura termofílica (55°C) utilizando caldo de cana-deaçúcar como substrato.

O tempo necessário para efetiva inoculação do RC, utilizando com referência o consumo de 80% do carboidrato disponível, foi de oito dias (Tabela 5.9). Posteriormente, o sistema foi aberto e então submetido a cinco diferentes fases, assim como os demais reatores.

	Fase	TDH (h)	$\frac{\text{TCO}}{(\text{kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1})}$	Duração da fase (dias)
-	Inoculação	-	-	8
	1	8	15	62
	2	6	20	44
	3	4	30	78
	4	2	60	36
	5	1	120	25

Tabela 5.9. Características das fases de operação a que foi submetido o RC

5.2.1. Conversão de carboidratos

As concentrações de carboidratos nos afluentes do RC permaneceram entre 3.888 e 5.308 mg L^{-1} enquanto o intervalo da concentração efluente foi de 1.116 a 3.398 mg L⁻¹. A redução do TDH de 8 para 1h acarretou no aumento da TCO de 15 para 115 kg DQO m⁻³ d⁻¹, o que influenciou na conversão de carboidratos, reduzindo de 71,6 para 36%, evidente na Figura 5.6 e Tabela 5.10.



Figura 5.6. Concentrações e conversões de carboidratos no RC

Afluente ///// Efluente --- Conversão

Tabela 5.10. Concentrações médias e conversões de carboidratos no RC

TDH (h)	8	6	4	2	1
Afluente (mg L^{-1})	3888 ± 419	4173 ± 819	4303 ± 611	4245 ± 672	5308 ± 738
Efluente (mg L ⁻¹)	1116 ± 334	1239 ± 636	1475 ± 588	1689 ± 452	3398 ± 438
Conversão (%)	$71,6 \pm 7$	$70,8\pm12$	$65,8\pm12$	60 ± 6	36 ± 3

Pattra *et al.* (2011) operaram o CSTR (37° C) no qual utilizaram caldo de cana-deaçúcar (25.000 mg DQO L⁻¹) como substrato e *Clostridium butyricum* como inóculo, porém, em ambiente não estéril. Esses autores relataram um comportamento semelhante; decréscimo da conversão conforme se reduziu o TDH, com conversões de 72 e 64% para as fases de 6 e 4h, as quais são próximos aos 70,8 e 65,8% obtidos nesse estudo quando operação nesses mesmos TDH.

Plangklang *et al.* (2012) realizaram ensaios em batelada (35° C) com essa mesma espécie bacteriana, *C. butyricum*, em suspensão e imobilizada. Para o sistema com biomassa imobilizada, concentração de caldo de cana-de-açúcar de 25.000 mg DQO L⁻¹ e pH 4,5 a conversão de carboidratos foi de cerca de 43%, inferior os valores descritos para o RC (Tabela 5.10), porém, vale destacar a diferença de regime de operação, além de concentração e inóculo.

Santos *et al.* (2014a) obtiveram valores de conversão de carboidrato entre 28 e 55% em operação de RALF (55%) alimentado com substrato composto (5.000 mg DQO L^{-1}) por vinhaça e glicose. Valores estes inferiores aos logrados no RC, porém, há de se ressaltar a complexidade do substrato usado por esses autores (vinhaça), a qual possui compostos de baixa biodegradabilidade, o que poderia reduzir a conversão de carboidratos.

5.2.2. Composição do biogás

Assim como registrado para o RS, não houve detecção de metano na composição do biogás produzido pelo reator RC, reforçando a ação do tratamento térmico e demais parâmetros; baixo pH e elevada carga orgânica, responsáveis pela supressão das arqueias metanogênicas. Na Figura 5.7 e Tabela 5.11, pode-se notar estabilidade da concentração de H₂ (53%) quando operado em TDH entre 8 e 2h, com incremento de cerca de 10% na fase de TDH 1h.

Figura 5.7. Composição do biogás produzido pelo RC segundo TDH



Tabela 5.11. Concentração dos componentes do biogás produzido pelo RC

TDH (h)	8	6	4	2	1
H ₂ (%)	$53,1\pm17$	$53{,}9\pm1{,}5$	$53{,}8\pm1$	$53,3\pm3$	$57{,}8\pm5$
CO ₂ (%)	$46,9\pm6$	46 ± 3	$46,2\pm4$	$46,7\pm2$	$42,2\pm3$

Pattra *et al.* (2011) operando CSTR (37°C) utilizando caldo de cana-de-açúcar (25.000 mg DQO L⁻¹) descreveram valores expressivamente inferiores, acréscimo de 15,8 para 19,1% na concentração de H₂ com redução do TDH de 12 para 4h.

Assim como Braga *et al.* (2015), que operando UASB (55°C) com sacarose (1.781 mg L⁻¹) relataram valores inferiores aos obtidos nesse estudo e sutil acréscimo da concentração de H₂ (45,1 para 51,5%) com a redução do TDH (12 para 2h). Apesar de descreverem valores inferiores aos obtidos no RC e comportamentos aparentemente semelhantes entre si, com base em uma análise percentual, esta última (Braga *et al.*, 2015) se assemelha ao comportamento obtido no presente estudo. Houve incremento de 14%

para TDH seis vezes menor, o que representa pequena resposta frente à expressiva redução, fato comparável a estabilidade e sutil incremento final obtida no RC.

Apesar de relatarem produção de certas concentrações de metano no biogás, Muñoz-Paés *et al.* (2013) lograram concentrações de H₂ variando de 30 a 56% em RALF operados a 35°C e temperatura ambiente, empregando sacarose (5.000 e 8.000 mg L⁻¹). Os valores representam concentrações inferiores as obtidas no RC, o motivo desta discrepância, apesar de se tratar de mesma configuração de reator e concentração de substrato semelhante, é o fato de empregarem TDH elevado (24h), o que possibilita o desenvolvimento de microrganismos metanogênicos.

Reis *et al.* (2015) relataram a mesma interferência, sendo que a extirpação destes microrganismos somente foi possível quando operaram o RALF (22°C) alimentado com vinhaça de cana-de-açúcar (5.000 mg DQO L⁻¹) em TDH 1h, na qual se obteve a máxima concentração de H₂ (38%), valor também inferior ao obtido nesse estudo.

5.2.3. Produção volumétrica de hidrogênio

A Figura 5.8 possibilita a visualização da produção de H_2 por unidade de leito, porém, condicionado à quantidade de matéria orgânica aplicada neste.





Com base na Figura 5.8 pode-se notar o incremento da PVH condicionado ao aumento da TCO, promovida pela redução do TDH. A PVH média passou de 0,0 para 501,4 mL H₂ h^{-1} L⁻¹ com a redução do TDH (8 para 1h) e consequente aumento da TCO

(13 para 115 kg DQO m⁻³ d⁻¹). Na Tabela 5.12 encontra-se descritos os valores destes dois parâmetros, PVH e TCO, relacionados ao TDH.

Tabela 5.12. Produção volumétrica de H_2 (PVH) e taxa de carregamento orgânico (TCO) segundo o TDH aplicado

0 1					
TDH (h)	8	6	4	2	1
$PVH (mL h^{-1} L^{-1})$	$0,\!0 \pm 0$	$118,1 \pm 26$	$191,7 \pm 22$	$311, 4 \pm 30$	$501,4 \pm 96$
$PVH (mmol h^{-1} L^{-1})$	$0,\!0 \pm 0$	$4,2 \pm 0,9$	$6,9\pm0,8$	$11,1 \pm 1,1$	$16,6 \pm 4,4$
TCO (kg DQO $m^{-3} d^{-1}$)	13	19	31	49	115

Pattra *et al.* (2011) operando o CSTR (37°C) relatou comportamento semelhante; aumento de 0,25 para 3,38 mmol H₂ h⁻¹ L⁻¹ para decréscimo do TDH de 36 para 4h. Porém, seu valor máximo (3,38 mmol H₂ h⁻¹ L⁻¹), é inferior ao máximo (16,6 mmol H₂ h⁻¹ L⁻¹) obtido por esse estudo. Essas discrepantes PVH são consequências das distintas configurações dos reatores e temperatura, sendo que o RALF possui melhor transferência de massa por suas características hidrodinâmicas, maior retenção de biomassa em seu interior quando comparado ao CSTR, além da temperatura termofílica beneficiar o RALF, pois O-Thong *et al.* (2009) e Dong *et al.* (2011) afirmam que essa faixa de temperatura possibilita vantagens termodinâmicas; maior atividade metabólica e síntese, o que reflete na PVH.

A influência da temperatura pôde ser verificada no estudo desenvolvido por Obazu *et al.* (2012) no qual operaram RALF em diferentes temperaturas, sendo que para 45 e 60°C e outras características (V/R e pH) semelhantes ao RC, obtiveram PVH cerca de 90% superior no RALF operado a 60°C.

Na tentativa de viabilizar a biodigestão de água resisduária complexa, vinhaça de cana-de-açúcar, Santos *et al.* (2014a) operaram o RALF (55°C) incluindo 33% de glicose em sua alimentação, resultando em co-substrato (5.000 mg DQO L⁻¹). A PVH máxima descrita foi de 1.100 mL H₂ h⁻¹ L⁻¹ em TDH de 8h, reduzindo posteriormente até valor de 0,6 (TDH 1h). Esse comportamento é inverso ao obtido no RC, além de se relatar alguns valores inferiores aos obtidos neste (Tabela 5.12). Assim como cita o próprio autor, possivelmente seja pela toxicidade desta água residuária, que se intensifica com a redução do TDH.

Dong *et al.* (2011) operaram reator UASB (55°C) alimentado com sacarose (10.000 mg DQO L⁻¹) sob TDH de 50 a 12h, no qual obtiveram máxima PVH de 124,9 mL H₂ h⁻¹ L⁻¹ quando em operação em TDH de 16h, valor inferior ao máximo logrado no RC (501,4 mL H₂ h⁻¹ L⁻¹). Neste estudo supracitado pode-se verificar sobrecarga orgânica

em TDH superiores aos aplicados ao RC, no qual se nota que a máxima PVH é obtida em TDH de 16h sendo posteriormente (TDH 12h) reduzida. Esse fato diz respeito à característica da configuração do reator, sendo que reatores UASB quando comparado a RALF, possuem menor capacidade de suportar cargas orgânicas elevadas, por características hidrodinâmicas, refletindo em sua faixa de TCO ótima.

5.2.4. Rendimento de hidrogênio

O HY observado no RC foi influenciado pelo TDH aplicado, sendo incrementado de 0,0 para 3,01 mol H_2 mol⁻¹sacarose para redução do TDH de 8 para 2h, porém, a subsequente redução do TDH (1h) resultou em decréscimo do HY para 1,89 mol H_2 mol⁻¹sacarose, como se pode apreciar na Figura 5.9.





Braga *et al.* (2015) operando reator UASB (55°C) com sacarose (1.781 mg L⁻¹) como substrato e TDH variando de 12 a 2h, obtiveram o mesmo comportamento, com HY máximo de 1,73 mol H₂ mol⁻¹sacarose em TDH de 2h. O HY logrados por estes autores é inferior ao 3,01 mol H₂ mol⁻¹sacarose obtido por esse estudo. O diferente grau de expansão do leito, característico de cada uma dessas configurações, além das diferentes resistências a transferência de massa oriunda de grânulo (UASB) e biofilme (RALF) possivelmente são as causas destes diferentes rendimentos obtidos.

Plangklang *et al.* (2012) efetuaram experimentos em batelada (35°C) com *C. butyricum* em suspensão e imobilizada, utilizando caldo de cana-de-açúcar em diferentes concentrações. Os autores relataram máximo HY (1,34 mol H₂ mol⁻¹hexose) para a

concentração de 25.000 mg DQO L⁻¹ e pH de 6,5, rendimento este inferior ao máximo obtido (1,5 mol H_2 mol⁻¹hexose) no RC.

Pattra *et al.* (2011) operaram CSTR (37°C) com *C. butyricum* alimentado com caldo de cana-de-açúcar (25.000 mg DQO L⁻¹) no qual obtiveram 1 mol H₂ mol⁻¹hexose como máximo HY quando em TDH de 4h. Esse HY é semelhante ao obtido por esse estudo quando neste mesmo TDH (1,1 mol H₂ mol⁻¹hexose), porém, quando se trata do máximo HY, observou-se no RC, melhor rendimento (1,5 mol H₂ mol⁻¹hexose).

Segundo Hallenbeck e Ghosh (2009), o HY e a distribuição dos metabólitos dissolvidos são características da espécie microbiana, assim, por se tratar de espécie pura, não há mutualismos, sintrofismo e/ou contribuições oriundas de outras espécies mais produtivas, como pode acontecer em inóculos mistos, fato que contribui para esses rendimentos inferiores.

A diferença de temperatura é outro fator influente nesse rendimento, pois como afirma Dong *et al.* (2011) temperaturas elevadas possibilitam maior atividade metabólica e síntese, além de ser fator de seleção microbiano. Obazu *et al.* (2012) verificou diferentes HY segundo a temperatura de operação quando operou dois RALF (45 e 60°C) alimentados com sacarose (17.800 mg L⁻¹) e relação V/R de 1,02 min⁻¹, logrando 2,25 e 3,00 mol H₂ mol⁻¹hexose para 45 e 60°C, respectivamente. Valores estes superiores ao máximo obtido pelo RC (1,5 mol H₂ mol⁻¹hexose), possivelmente por haver sido operados com relação V/R cerca de 50% menor, o que causa maior proporção volumétrica de recirculação, o que segundo Henze e Harremoes (1983), proporciona maior expansão do leito, consequentemente, melhora na transferência de massa.

5.2.5. Metabólitos solúveis

Os metabólitos produzidos no RC resumiram-se, em sua maioria, a ácidos orgânicos voláteis sendo eles: ácido acético, ácido propiônico, ácido lático ácido succeínico, ácido cítrico, ácido málico, ácido valérico, ácido isovalérico e ácido capróico, além da presença de etanol em algumas fases. Quando operado no TDH de maior produção de H_2 (1h), houve predominância de ácido lático (31,7%), porém, com concentrações representativas de ácido acético (28,9%) e ácido butírico (23%), e ácido málico (12%). A Figura 5.10 e Tabela 5.13 possibilitam a visualização das concentrações destes metabólitos.



Figura 5.10. Distribuição, em percentual molar, dos metabólitos dissolvidos produzidos no RC

HAc: ácido Acético, HPr: ácido Propiônico, HLa: ácido Lático, HSu: ácido Succínico, HCi: ácido Cítrico, HMa: ácido Málico, HFo: ácido Fórmico, HisoVa: ácido isoValérico, EtaOH: Etanol.

Tabela 5.13. Metabólitos produzidos pelo RC nas duas primeiras fases de operação

								1 2					
Fase	TDH		HLa	HAc	HBu	HMa	HCi	HSu	HisoVa	HPr	HFo	HCa	EtaOH
1	0	mg $L^{-1} \pm \sigma$	$0,0\pm0,0$	$185,\!35\pm35$	$0,0\pm0,0$	$0,0\pm0,0$	$0,0\pm0,0$	$2332,9\pm224$	$357,\!536\pm93$	$236,7\pm63$	$0,0\pm0,0$	$87,83 \pm 4$	$0,0\pm0,0$
1	0	%	0	10,2	0	0	0	65,2	11,6	10,5	0	2,5	0
2	6	mg $L^{-1} \pm \sigma$	$372,6\pm82$	$232{,}78\pm39$	$0,0\pm0,0$	$114,12\pm115$	$0,0\pm0,0$	$2725,2\pm198$	$739,\!86\pm9$	$326{,}48\pm52$	$0,0\pm0,0$	$87,34 \pm 1$	$0,0\pm0,0$
Z	0	%	9,4	8,7	0	1,9	0	52	16,4	9,9	0	1,7	0
2	4	mg $L^{-1} \pm \sigma$	$433{,}9\pm46$	$0,0\pm0,0$	$0,0\pm0,0$	$199,6\pm17$	$89,5\pm27$	$1241,9\pm54$	$0,0\pm0,0$	$0,0\pm0,0$	$291,3\pm119$	$0,0\pm0,0$	$165,7\pm8$
3	4	%	17,7	0	0	5,5	1,7	38,6	0	0	23,3	0	13,2
4	2	$mg \ L^{\text{-1}} \pm \sigma$	$498,9\pm 64$	$0,0\pm0,0$	$253{,}8\pm43$	$190,9\pm10$	$171,\!6\pm47$	$2149,\!6\pm532$	$0,0\pm0,0$	$0,0\pm0,0$	$229,6\pm136$	$0,0\pm0,0$	$152{,}7\pm49$
4	Z	%	14,9	0	7,7	3,8	2,4	48,9	0	0	13,4	0	8,9
- 1	1	$mg \ L^{\text{-1}} \pm \sigma$	$327,3\pm20$	$198,9\pm9$	$233{,}4\pm15$	$184,1\pm5$	$96{,}2\pm22$	$0,0\pm0,0$	$0,0\pm0,0$	$0,0\pm0,0$	$0,0\pm0,0$	$0,0\pm0,0$	$0,0\pm0,0$
3	1	%	31,7	28,9	23	12	4,4	0	0	0	0	0	0

HLa: ácidoLático; HAc: ácido Acético; HBu: ácido Butírico; HMa: ácido Málico; HCi: ácido Cítrico; HSu: ácido Succínico; HisoVa: ácido isoValérico; HPr: ácido Propiônico; HFo: ácido Fórmico; HCa: ácido Capróico; EtOH: Etanol.

Assim como verificado por Braga *et al.* (2015), utilizando reator UASB (55°C), alimentado com sacarose (1.783 mg L⁻¹) e operado sob diferentes TDH (12, 6 e 2h), o RC demonstrou rota fermentativa ácida em sua fase inicial, com presença de HSu, HAc, HisoVa, Hpr e HCa. Posteriormente, com o aumento da disponibilidade de íons H⁺, causada pelo aumento da carga orgânica, verificaram mudança de rota, passando a produção de álcoois e ácido láctico juntamente com os demais ácidos. Estratégia microbiana para regeneração do NADH sem aumento da pressão parcial de H₂ (Braga *et al.*, 2015). Quando em seu TDH de maior PVH (1h), a rota fermentativa ácida voltou a prevalecer, porém, com predominância de ácido lático (31,7%), o qual, assim como supracitado, proporciona a regeneração de NADH sem aumento da pressão parcial de H₂.

Quando operado em TDH de 1h, fase de maior produtividade de H₂, com a citada rota ácida de predominância do ácido lático, acético e butírico, houve redução do HY, passando de seu máximo valor (3,01 mol H₂ mol⁻¹sacarose) no TDH anterior (2h) para 1,81 mol H₂ mol⁻¹sacarose. Esse fato se dá possivelmente pela mudança da regeneração de NADH, sendo realizada anteriormente pela produção de Etanol e ácido lático, para somente ácido lático, o que com base na Figura 3.3, pode se verificar menor rendimento de H₂.

Diferentemente da rota ácida obtida na fase mais produtiva deste experimento, Pattra *et al.* (2011) operando CSTR (35° C) alimentado com caldo de cana-de-açúcar (25.000 mg DQO L⁻¹) sob TDH de 36 a 4h, lograram em sua fase mais produtiva, rota fermentativa mista, com presença de ácido láctico (34,9%), etanol (29,5%), ácido acético (16,3%), ácido butírico (16,0%) e ácido propiônico (3,3%).

Por haver fases de elevada produção (2.725 mg L⁻¹) de HSu, sendo este ácido um composto de elevado valor agregado que segundo Beauprez *et al.* (2010) possui quatro principais fins; mercado de detergentes/surfactantes, quelante iônico, alimentício e farmacêutico, representando uma possibilidade optar pela produção deste metabólito em paralelo à produção de H₂.

Uma das fases de maior produtividade de H_2 coincidiu com a maior produção de HLa (498,9 mg L⁻¹) e considerável produção de HSu (2.150 mg L⁻¹) o que pode se tratar de outra estratégia produtiva, com possibilidade de produzir ambos metabólitos dissolvidos, além de quantidade bastante expressiva de H_2 (4,12 L h⁻¹ L⁻¹). Assim como HSu, o HLa é mundialmente utilizado em aplicações alimentícias, farmacêuticas e outras aplicações industriais, sendo que seu comercio internacional têm sido valorizado por estritas regulamentações governamentais e demanda por produtos de origem sustentável,

haja vista sua produção com base em compostos da indústria petroquímica (Liang *et al.*, 2015).

Há trabalhos que relatam a co-produção, em quantidades expressivas destes 3 compostos, como é o caso de Santos *et al.* (2014) que operando RALF (55°C) alimentado com co-substrato de vinhaça e glicose (5.000 mg DQO L⁻¹) obtiveram, em TDH de 2h, produção de 1.298 mg L⁻¹ de HSu, 1.242 mg L⁻¹ de HLa e 0,53 L H₂ h⁻¹ L⁻¹.

5.2.6. Conversão de DQO, pH e sólidos suspensos

A conversão de DQO em reatores acidogênico, nos quais ocorre produção de H_2 , proporciona sutis reduções de DQO, por se tratar de fermentações. No caso do RC, a conversão de DQO se manteve entre 8,8 e 15,6%, não seguindo nenhum padrão condicionado pelo TDH.

Por se tratar de um efluente real, a concentração de DQO sofreu pequenas oscilações fato notável ao se analisar a Tabela 5.14.

la est il concentraç	ees e come			aus no ne	
TDH (h)	8	6	4	2	1
Afluente (mg L ⁻¹)	4579 ± 433	5172 ± 516	5533 ± 741	4496 ± 528	4886 ± 538
Efluente (mg L ⁻¹)	4011 ± 422	4530 ± 764	4735 ± 764	3864 ± 539	4468 ± 600
Conversão (%)	$12,3 \pm 5$	$15,6 \pm 7$	$14,6 \pm 6$	$13,9 \pm 5$	$8,8 \pm 4$

Tabela 5.14. Concentrações e conversões de DQO promovidas no RC

Em operação do RALF (55°C) alimentado com vinhaça de cana-de-açúcar (5.000 mg DQO L⁻¹), Santos (2014) verificou conversões de DQO entre 8,0 e 13,4% sob TDH de 8 a 1h com utilização de glicose como co-substrato. Esses valores de conversão são semelhantes aos obtidos no RC (Tabela 3.2), além de também se apresentarem de forma independente da variação do TDH.

A redução do TDH de 8 para 4h provocou decréscimo nos valores de pH efluente de 4,55 para 3,9, enquanto o pH afluente teve comportamento inverso, passando de 5,77 para 6,60. Isso se deve ao aumento da disponibilidade de H^+ - fato evidente nas mudanças de rotas fermentativas descritas anteriormente -, reduzindo o pH efluente, sendo que para o pH afluente o motivo da alteração foi a tentativa de controle de pH do reator (efluente) com a diminuição da adição de ácido clorídrico e acético (Tabela 5.15).

1		
TDH	$pH_{afluente}$	$pH_{efluente}$
8	$5,8\pm1,0$	$4,6\pm0,5$
6	$6,7\pm0,6$	$4,2\pm0,5$
4	$6,6\pm0,5$	$3,9\pm0,2$
2	$6,3 \pm 0,2$	$3,9\pm0,2$
1	$6,1 \pm 0,1$	$3,9\pm0,3$

Tabela 5.15. Valores médios de pH afluente e efluente

Esses valores são similares aos valores de pH relatado por Plangklang *et al.* (2011) em ensaios em bateladas com *C. butyricum*, 6,5 e 4,13 para afluente e efluente respectivamente. Assim como o intervalo (3,8 a 4,4) relatados por Ren *et al.* (2010) para operação do CSTR (35° C) com biomassa imobilizada, empregado no tratamento de água residuária a base de melaço de beterraba (2.000 a 10.000 mg DQO L⁻¹).

Não houve expressivo arraste de biomassa em nenhuma das fases de operação do RC, sendo que a fração dos sólidos efluente relacionada a esse fato são os sólidos suspensos voláteis, os quais permaneceram entre 7 e 24,4% dos sólidos suspensos totais, como se pode apreciar na Tabela 5.16.

TDH	SST (mg L^{-1})	$SSF (mg L^{-1})$	SSV (mg L^{-1})	SSV (%)
8	$268,7\pm57$	$207,7\pm45$	61 ± 16	22,7
6	226 ± 75	$194,6\pm67$	$31,8 \pm 9$	14,0
4	$220{,}5\pm80$	$199,5\pm70$	21 ± 9	9,5
2	$245,2\pm36$	228 ± 32	$17,2 \pm 6$	7,0
1	$159,6\pm11$	$120,6\pm15$	$39,0 \pm 6$	24,4

Tabela 5.16. Sólidos suspensos totais (SST), suspensos fixos (SSF) e suspensos voláteis (SSV) referentes ao RC em suas respectivas fases de operação

5.3.RALF alimentado com melaço - RM

Neste tópico encontram-se os aspectos da produção de H_2 no reator anaeróbio de leito fluidificado em temperatura termofílica (55°C) utilizando melaço de cana-de-açúcar como substrato.

O período inicial da operação, assim como para os demais reatores, foi em circuito fechado com recirculação do substrato e inóculo, com o intuito de possibilitar a aderência e adaptação deste ao sistema. Para o RM esse período durou oito dias, com posterior abertura do sistema e submissão as fases operacionais (Tabela 5.17).

Fase	TDH (h)	$TCO (kg DQO m^{-3} d^{-1})$	Duração da fase (dias)
Inoculação	-	-	8
1	8	15	62
2	6	20	44
3	4	30	78
4	2	60	36
5	1	120	25

Tabela 5.17. Fases operacionais impostas ao RM

5.3.1. Conversão de carboidratos

As mensurações dos carboidratos presentes no melaço foram realizadas utilizando a sacarose como padrão, motivo pelo qual os cita como sacarose. As concentrações de carboidratos na corrente afluente ao RM se mantiveram entre 3.942 e 5.169 mg L⁻¹ enquanto que as concentrações do efluentes deste variaram entre 1.638 a 3.832 mg L⁻¹. A redução do TDH de 8 para 1h acarretou no aumento da TCO de 15 para 116 kg DQO m⁻³ d⁻¹, o que causou redução da conversão de carboidratos de 63,9 para 25,4%, dados apreciáveis na Figura 5.11 e Tabela 5.18.



Figura 5.11. Concentrações e conversões de carboidratos no RM

Afluente ///// Efluente --- Conversão

Tabela 5.18. Concentrações e conversões de carboidratos no RM durante as cinco fases operacionais

TDH (h)	8	6	4	2	1
Afluente (mg L ⁻¹)	4759 ± 596	4415 ± 904	3942 ± 542	5135 ± 382	5169 ± 298
Efluente (mg L ⁻¹)	1720 ± 268	1787 ± 682	1638 ± 657	3257 ± 300	3832 ± 294
Conversão (%)	$63{,}9\pm3$	$60,7\pm13$	$57,8\pm16$	$36,5\pm5$	$25,8\pm5$

Empregando outro subproduto do setor sucroalcooleiro, vinhaça de cana-deaçúcar, na produção de H₂, Santos *et al.* (2014a) operaram RALF (55°C) utilizando cosubstrato (5.000 mg DQO L⁻¹) com 2/3 de vinhaça e 1/3 de glicose. Esses autores lograram conversões entre 27,1 e 52,6% para os TDH avaliados (8-1h).

Operando em condições parecidas, Santos *et al.* (2014b) avaliaram dois RALF (55°C) alimentados com vinhaça de cana-de-açúcar (10.000 e 30.000 mg DQO L⁻¹), nos quais obtiveram comportamento distintos. Esses autores relataram reduções da conversão (49,1 para 47%) consequente da redução do TDH de 8 para 1h no RALF (10.000 mg DQO L⁻¹) e para o RALF (30.000 mg DQO L⁻¹), incremento da conversão de 31,4 para 52,2% com a redução do TDH de 8 para 4h, porém, decréscimo com os TDH inferiores a 4h, chegando a 36,6% quando operado em TDH de 1h.

Além de não demostrarem comportamento semelhante, os valores citados por Santos *et al.* (2014a; 2014b) são inferiores aos obtidos no RM (Tabela 5.18), porém, há que se guardar as diferenças entre os dois substratos, pois a vinhaça possui substâncias recalcitrantes (Espanã-Gamboa *et al.*, 2011), o que reduz sua biodegradabilidade.
Dong *et al.* (2011) operando um UASB (55°C) no qual utilizaram sacarose (10.000 mg DQO L⁻¹) como substrato e TDH de 50 a 12h, relataram a máxima conversão de carboidratos de 98% quando em operação com TDH de 16h. Valores superiores aos obtidos para o RM, porém, deve-se ressaltar a diferença de substrato e TDH, os quais proporcionam maiores conversões para o trabalho citado, pois se trata de substrato sintético com fornecimento de quantidades adequadas dos nutrientes essenciais, além de se tratar de TDH maior, o que, assim como evidente neste trabalho, garantem maiores conversões.

5.3.2. Composição do biogás

O biogás produzido se restringiu a H_2 e CO_2 , com ausência de CH_4 , fato que evidencia a eficácia do tratamento térmico aplicado ao lodo, associado a outros parâmetros, como elevada carga orgânica e reduzido pH, na supressão da metanogênese. A concentração de H_2 foi incrementada com a redução do TDH e consequente aumento da TCO. A concentração de H_2 no biogás se elevou de 56,0 para 74,9% com a redução do TDH de 8 para 1h, fato notável na Figura 5.12 e Tabela 5.19.

Figura 5.12. Composição do biogás produzido pelo RM segundo o TDH aplicado



Tabela 5.19. Composição do biogás produzido pelo RM

TDH (h)	8	6	4	2	1
H ₂ (%)	56 ± 2	$57,5\pm2$	$60,3 \pm 3$	$67,9\pm 6$	$74{,}9\pm5$
CO ₂ (%)	44 ± 2	$42,5\pm1$	$32,1 \pm 3$	$32,1\pm7$	25 ± 5

Cappelletti *et al.* (2012) realizou ensaios em batelada (77°C) com quatro espécies de bactérias do gênero *Thermotoga* e melaço (20.000 mg DQO L⁻¹) como substrato. Estes autores lograram 58% como máxima concentração de H₂, valor semelhante aos obtidos nesse estudo em TDH maiores (8 e 6h), porém, para o TDH de maior concentração (1h) se obteve concentração expressivamente superior (cerca de 30%).

Essa diferença pode estar relacionada ao regime de operação e fato de se tratar de inóculo puro, pois assim como relata Hallenbeck & Ghosh (2009), a produção de H_2 e a distribuição dos metabólitos dissolvidos são características da espécie microbiana, sendo que em inóculo misto há possibilidade de haver espécies mais produtivas, além de usufruir de vantagens mutualísticas.

Ren *et al.* (1997) operando CSTR (35°C) o qual tratou melaço de indústria açucareira baseada em beterraba, com variação da TCO de 19,4 a 107 kg DQO m⁻³ d⁻¹, obtiveram 49,5% de H₂ no biogás quando operado em TCO de 107 kg DQO m⁻³ d⁻¹, apesar de resultar concentração inferior, esse reator apresentou comportamento similar ao RM; incremento da concentração de H₂ com decréscimo do TDH e consequente aumento da TCO, sendo que para esse estudo, a máxima concentração (74,9%) foi obtida em TCO de 116 kg DQO m⁻³ d⁻¹.

Li *et al.* (2007) operaram reator anaeróbio com chicanas (35°C) utilizando melaço de beterraba (5.000 mg DQO L⁻¹) obtendo 54% de H₂ no biogás produzido. Assim como Wang *et al.* (2013) que operaram CSTR (35°C) também com melaço de beterraba (8.000 mg DQO L⁻¹), com variação do TDH de 10 a 4h. O valor máximo de concentração de H₂ foi de 62% quando operado em TDH de 6h, concentração superior ao obtido neste mesmo TDH pelo RM (57,5%), porém, quando se analisa a concentração máxima obtida neste estudo (74,9%) esta resulta superior a todos os trabalhos citados.

Esse fato se dá pela diferença de inóculo, temperatura e configuração do reator, pois como se pode notar, grande parte dos trabalhos citados é realizada em reatores de mistura (biomassa suspensa), operados em temperatura mesofílica e inoculados com lodo de estação de tratamento de esgoto doméstico.

Diferentemente, este estudo foi desenvolvido em temperatura termofílica, que segundo O-Thong *et al.* (2009) possui vantagens termodinâmicas além de beneficiar rotas metabólicas mais produtivas, utiliza reator de alta taxa (RALF) e inóculo adaptado ao tratamento de água residuária constituída da mesma matriz de carboidratos (sacarose em sua maioria).

5.3.3. Produção volumétrica de hidrogênio

Assim como explanado anteriormente, a operação do RM se deu com delimitação das fases pela variação do TDH, o que proporciona a variação da TCO.

Esta variação é diretamente influente na PVH, volume de H_2 produzido por unidade de volume de leito.

A PVH média passou de 105,9 para 303,4 mL H_2 h⁻¹ L⁻¹ com a redução do TDH (8 para 1h) e consequente aumento da TCO (14 para 116 kg DQO m⁻³ d⁻¹), comportamento apreciável na Figura 5.13 e Tabela 5.20.

Figura 5.13. Comportamento da PVH condicionado à TCO no RM



Tabela 5.20. Produção volumétrica de H_2 (PVH) e taxa de carregamento orgânico (TCO) segundo o TDH aplicado

TDH (h)	8	6	4	2	1
$PVH (mL h^{-1} L^{-1})$	$105,9 \pm 15$	$160,9 \pm 23$	$191,0 \pm 23$	$253,1 \pm 43$	$303,4 \pm 60$
PVH (mmol $h^{-1} L^{-1}$)	$3,1 \pm 1,3$	$5,5 \pm 0,9$	$6,3 \pm 1,5$	$9,4 \pm 1,8$	$10,9 \pm 2,1$
TCO (kg DQO $m^{-3} d^{-1}$)	14	20	29	60	116

Guo *et al.* (2008) avaliaram o efeito do TDH, consequentemente TCO, em um EGSB (35°C) alimentado com melaço de beterraba (2.000-10.000 mg DQO L⁻¹) obtendo máxima PVH (700 mL h⁻¹ L⁻¹) quando operado em TDH de 2h e TCO de 120 kg DQO m⁻³ d⁻¹. Comportamento semelhante ao verificado no RM; incremento da PVH com o incremento da TCO até valor 120 kg DQO m⁻³ d⁻¹.

O aumento da PVH condicionada a redução do TDH também foi verificada por Wang *et al.* (2013) em CSTR (35°C) operado com melaço (8.000 mg DQO L⁻¹), no qual a

redução do TDH de 10 para 5h resultou em incremento de aproximadamente 7 vezes a PVH (de 3,18 para 27,12 mmol $H_2 h^{-1} L^{-1}$).

Esse comportamento também verificado no RM se deu de forma menos expressiva, com incremento de aproximadamente 2 vezes $(3,1-10,9mmol H_2 h^{-1} L^{-1})$ na PVH para redução do TDH de 8 para 1h.

Chang *et al.* (2011) operaram CSTR (35°C) com intuito de avaliar o efeito da TCO (20–44 kg DQO m⁻³ d⁻¹), utilizaram para tanto, melaço de beterraba (2.000–10.000 mg DQO L⁻¹) como substrato. Os autores relataram a máxima PVH (146,25 mL h⁻¹ L⁻¹) para TCO de 44 kg DQO m⁻³ d⁻¹, a qual é inferior a PVH lograda neste estudo em TCO semelhantes.

Com resultados diferentes, Ren *et al.* (2010) que também avaliaram o efeito da TCO (8–44 kg DQO m⁻³ d⁻¹) e imobilização da biomassa em CSTR (35°C) utilizando melaço de beterraba (2.000–10.000 mg DQO L⁻¹). Esses autores relataram máxima PVH (405 mL h⁻¹ L⁻¹) para o reator com biomassa imobilizada operando em TCO de 44 kg DQO m⁻³ d⁻¹. Produtividade essa superior às obtidas no RM.

Hallenbeck (2009) ressalta que RALF pode alcançar PVH superiores ao CSTR, porém, quando comparado a Chang *et al.* (2011) e Ren *et al.* (2010), a PVH obtida em TCO semelhante pelo RM é superior e inferior, respectivamente. A diferença entre as PVH citadas pelas duas referências se dá pela imobilização da biomassa, fato que também beneficia o RALF, pois segundo Show *et al.* (2012) a maior retenção de biomassa no interior do reator proporciona maiores PVH.

5.3.4. Rendimento de hidrogênio

O rendimento de hidrogênio (HY) expressado pelo RM se mostrou diretamente influenciado pelo TDH, com elevação de 1,95 para 2,50 mol H_2 mol⁻¹sacarose, com a redução do TDH de 8 para 6h. Para os TDH subsequentes, o HY decresceu, chegando a 0,4 mol H_2 mol⁻¹sacarose quando operado em TDH de 1h, como se pode verificar na Figura 5.14).

Figura 5.14. Rendimentos de H₂ obtidos no RM



Guo et al. (2008) operaram EGSB (35°C) utilizando melaço de beterraba como substrato (2.000–10.000 mg DQO L⁻¹), no qual lograram comportamento semelhante; incremento do HY até determinada TCO (120 kg DQO m⁻³ d⁻¹), na qual se obteve 1,7 mol H₂ mol⁻¹sacarose. O aumento da TCO para 192 kg DQO m⁻³ d⁻¹ promoveu o decréscimo do HY para 0,4 mol H₂ mol⁻¹sacarose. O valor de máximo de HY médio relatado por esses autores é inferior ao obtidos para o RM (2,50 mol H₂ mol⁻¹sacarose). O HY está intimamente relacionado ao inóculo (Hallenbeck & Ghosh, 2009) e a temperatura (O-Thong et al., 2009), pois esses fatores determinam os microrganismos predominantes e as rotas metabólicas predominantes e consequentemente os rendimentos obtidos. O inóculo utilizado no EGSB foi oriundo de mescla de iguais proporções de lodo de estação de tratamento de esgoto doméstico e lodo de tratamento de efluente de indústria farmacêutica, diferentemente do inóculo utilizado no RALF, oriundo de lodo de reator UASB utilizado para tratamento de vinhaça de cana-de-açúcar, o que resulta em inóculo adaptado aos compostos presentes no melaço. A temperatura de operação em que foi submetido o RALF (termofílica) possibilita vantagens termodinâmicas e metabólicas ao sistema (O-Thong et al., 2009; Dong et al., 2011).

Mariakakis *et al.* (2012) operaram CSTR (37°C) utilizando melaço de beterraba como substrato (63.000–101.000 mg DQO L⁻¹) e variação da TCO de 11,6 a 69,6 kg sacarose m⁻³ d⁻¹. Estes autores relatam HY máximo (2,49 mol H₂ mol⁻¹sacarose) quando operado em sua menor TCO (11,6 kg sacarose m⁻³ d⁻¹). Esse HY é similar ao máximo obtido pelo RM (2,5 mol H₂ mol⁻¹sacarose).

Também utilizando CSTR (35°C) alimentado com melaço de beterraba (2.000-10.000 mg DQO L⁻¹, Chang *et al.* (2011) relataram 1,40 mol H₂ mol⁻¹glicose para operação em TCO de 44 kg DQO m⁻³ d⁻¹. Valor este semelhante ao HY médio obtido no RM (1,25 mol H₂ mol⁻¹glicose), quando operado em TCO de 20 kg DQO m⁻³ d⁻¹.

Diferentemente da PVH, o HY é um parâmetro que sofre maior influência da inóculo, como citado anteriormente, que da configuração do reator, fato justificado pelos trabalhos de Mariakakis *et al.* (2012) e Chang *et al.* (2011) descritos no parágrafo anterior. Esses autores obtiveram HY semelhantes e até sutilmente superior ao logrado no RM.

Avaliando a produção de H₂ por *Clostridium butyricum W5* em batelada (30-45°C), alimentadas com melaço (20.000-120.000 mg L⁻¹), Wang e Jin (2009) lograram máximo HY de 1,63 mol H₂ mol⁻¹hexose. Valor esse superior ao máximo obtido pelo RM (1,25 mol H₂ mol⁻¹hexose), fato esse que reforça a maior importância do inóculo/espécie sobre temperatura ou fator hidrodinâmico.

Assim como Cappelletti *et al.* (2012) que reportaram HY máximo de 2,95 mol H_2 mol⁻¹monossacarídeo para *Thermotoga neapolitana* em batelada (70°C), com melaço (20.000 mg DQO L⁻¹), valor esse superior as três outras cepas deste mesmo gênero (*T. neapolitana*, *T. marítima*, *T. naphtophila*, *T. petrophila*).

5.3.5. Metabólitos solúveis

Os metabólitos dissolvidos produzidos pelo RM resumiram-se a ácidos orgânicos voláteis, sendo eles: ácido acético, ácido propiônico, ácido butírico, ácido lático, ácido succeínico, ácido cítrico, ácido málico, ácido isovalérico e ácido capróico. Houve predominância do ácido succínico (74,7 a 79,3%) nas três primeiras fases, porém, mudança de rota fermentativa posteriormente. A fase de maior produção de H₂ (TDH 1h), verficou-se a seguinte distribuição; HLa (27,7%), HAc (26,6%), HBu (21,3%), HMa (15,1%) e HCi (9,3%), apreciáveis na Figura 5.15 e Tabela 5.21.



Figura 5.15. Distribuição, em percentual molar, dos metabólitos produzidos pelo RM

HAc: ácido Acético, HPr: ácido Propiônico, HBu: ácido Butírico, HLa: ácido Lático, HSu: ácido Succínico, HCi: ácido Cítrico, HMa: ácido Málico, HisoVa: ácido isoValérico.

Fase	TDH	HLa	HAc	HBu	HMa	HCi	HSu	HPr	HisoVa	HFo	HCa
1	8	$0,0\pm0,0$	$72,\!6\pm9$	$0,0\pm0,0$	$1010,2\pm139$	$94,6\pm39$	$8553,7\pm964$	$543,1\pm39$	$724{,}4\pm65$	$0,0\pm0,0$	99,9 ± 13
1	0	0	1,2	0	7,8	0,5	74,7	7,6	7,3	0	0,9
2	6	$196,0\pm19$	$267{,}4\pm71$	$477,5\pm18$	$213,0\pm23$	$486{,}9\pm47$	$7324,5\pm0,0$	$0,0\pm0,0$	$0,0\pm0,0$	$0,0\pm0,0$	$0,0\pm0,0$
2	0	2,8	5,7	6,9	2	3,2	79,3	0	0	0	0
3	1	$0,0\pm0,0$	$221,3\pm53$	$405{,}5\pm178$	$200{,}5\pm83$	455 ± 44	$5869,7\pm561$	$0,0\pm0,0$	$0,0\pm0,0$	$134{,}5\pm48$	$0,0\pm0,0$
5	4	0	5,7	7,1	2,3	3,7	76,7	0	0	4,5	0
4	r	$233{,}6\pm36$	$213,1\pm31$	$291,\!0\pm45$	$216{,}9\pm20$	$280{,}4\pm28$	$0,0\pm0,0$	$0,0\pm0,0$	$0,0\pm0,0$	$0,0\pm0,0$	$0,0\pm0,0$
4	2	20,7	28,3	26,4	12,9	27,9	0	0	0	0	0
5	1	$276,1\pm24$	$176,8\pm27$	$207,1\pm15$	$223,8\pm14$	$196{,}5\pm22$	$0,0\pm0,0$	$0,0\pm0,0$	$0,0\pm0,0$	$0,0\pm0,0$	$0,0\pm0,0$
3	1	27.7	26.6	21.3	15.1	9.3	0	0	0	0	0

Tabela 5.21. Metabólitos dissolvidos produzidos pelo RM durante as duas primeiras fases de operação

HLa: ácido Láctico; HAc: ácido Acético; HBu: ácido Butírico; HMa: ácido Málico; HCi: ácido Cítrico; HSu: ácido Succínico; HPr: ácido Propiônico; HisoVa: ácido isoValérico; HFo: ácido Fórmico; HCa: ácido Capróico.

Diferentemente da rota ácida obtida neste experimento, Ren *et al.* (1997) operando CSTR (35° C) com melaço de beterraba como substrato ($2.910 - 20.500 \text{ mg DQO L}^{-1}$) sob TCO de 19,4 a 107,0 kg DQO m⁻³ d⁻¹, lograram em sua fase mais produtiva (107,0 kg DQO m⁻³ d⁻¹) a até então negligenciada, rota etano-acética, com presença de etanol (46,8), ácido acético (45,7), ácido butírico (3,8), ácido propiônico (3,3%). Segundo estes mesmo autores, essa rota produz ácido acético conjuntamente, não caracterizando mudança de rota, esse fator faz parte de artifício do balanço NADH/NAD⁺.

No caso do RM o balanço de NADH/NAD⁺ é realizado pela produção de ácido lático, o que possibilita a produção unicamente de ácidos, porém, reduz a produção de H₂, pois com base na Figura 3.3 a produção de HLa é realizada direto do piruvato, sem a formação de H₂ realizada na conversão deste à acetil-CoA.

Guo *et al.* (2008) operaram EGSB (35° C) utilizando melaço de beterraba como substrato ($2.000 - 10.000 \text{ mg DQO L}^{-1}$) sob variação de TCO entre 8 e 192 kg DQO m⁻³ d⁻¹, obtiveram, assim como Ren *et al.* (1997), a rota etano-acética, 1.200 a 1.500 mg L⁻¹, como via predominante. Essas diferenças nas rotas metabólicas predominantes estão relacionadas, principalmente, às colônias bacterianas existente em cada faixa de temperatura.

A produção de ácido succínico paralelamente a produção de H_2 pode ser uma ótima opção, pois segundo Beauprez *et al.* (2010) há quatro principais mercados para esse; detergentes/surfactantes, quelante iônico, alimentício e farmacêutico, com produção oriunda de processos químicos a partir de gás liquefeito de petróleo (GLP) ou petróleo líquido, porém, com tendências a ser substituído por produção biológica (Song & Lee, 2006).

Com base nesses aspectos, o RM possui potencial para essa produção conjunta, pois além de haver produzido elevadas quantidades de H₂ (1,4 – 2,53 L h⁻¹ L⁻¹), logrou produção de ácido succínico entre 5,87 e 8,55 g L⁻¹, nas três primeiras fases de operação. Valores estes superiores aos reportados por Santos *et al.* (2014a), o quais obtiveram 5,67 g HSu L⁻¹ e PVH de 0,2 L h⁻¹ L⁻¹ ao operarem o RALF (55°C) utilizando vinhaça e glicose (5.000 mg DQO L⁻¹) como fonte de carbono.

5.3.6. Conversão de DQO, pH, sólidos e relação DQO:N:P

Como citado para os reatores anteriores, a conversão de DQO em reatores acidogênicos (produção de H_2 e ácidos orgânicos) proporciona pequenas reduções de

DQO. No caso do RM, a conversão de DQO se manteve entre 7,2 e 17,3%, condicionada pelo TDH, pois houve incremento da conversão de 13,6 para 17,3, com a redução do TDH de 8 para 6h. Os posteriores TDH provocaram a redução da conversão de DQO, chegando a 7,2 % quando em TDH 1h, como se pode apreciar na Tabela 5.22.

Tabela 5.22. Concentrações e conversões de DQO promovidas pelo RM

TDH (h)	8	6	4	2	1
Afluente (mg L^{-1})	4938 ± 556	5473 ± 702	5082 ± 867	5352 ± 425	4996 ± 451
Efluente (mg L ⁻¹)	4258 ± 488	4515 ± 613	4397 ± 667	4833 ± 441	4623 ± 310
Conversão (%)	$13,6\pm5$	$17,3\pm 6$	$12,8\pm8$	$9,7\pm4$	$7,2\pm 3$

Na operação de CSTR (35° C) alimentado com melaço de beterraba (10.000 mg DQO L⁻¹), Han *et al.* (2010) reportaram 13% de conversão de DQO. Valor semelhante a Han *et al.* (2012a) que relataram 11,25% como máxima conversão de DQO ao operar reator de mistura com biomassa imobilizada, alimentado com melaço de beterraba (2.000-8.000 mg DQO L⁻¹). Valores semelhantes aos obtidos na operação do RM.

A redução do TDH de 8 para 1h não condicionou o comportamento do pH efluente, pois apesar de um pequena redução de 4,2 para 3,8, os valores se mantiveram próximo a 4, valor tomado como ideal para o sistema. Os valores médios de pH referentes a cada uma das fases de operação do RM são apresentados na Tabela 5.23.

Tabela 5.23. Valores médios de pH afluente e efluente no RM durante as três primeiras fases

TDH	$pH_{afluente}$	pH_{efluente}
8	$7,1\pm0,2$	$4,2\pm0,1$
6	$7,0\pm0,2$	$4,0\pm0,1$
4	$6{,}6\pm0{,}3$	$4,0\pm0,2$
2	$6{,}5\pm0{,}1$	$3{,}9\pm0{,}1$
1	$6{,}3\pm0{,}1$	$3,8\pm0,2$

Esses valores são similares ao pH relatado por Ren *et al.* (2010) para CSTR com biomassa imobilizada (3,8–4,4), os quais citam que sistemas que utilizam biomassa imobilizada possuem capacidade de produzir H_2 em condições de pH inferiores aos sistemas de biomassa suspensa.

Guo *et al.* (2008) relatou valores de pH semelhantes, porém, levemente superiores (4,2 - 4,4) para operação do EGSB (35°C). Assim como Han *et al.* (2012b) operando CSTR com biomassa imobilizada (35°C) cita valores similares, porém, levemente superiores (4,06–4,28) aos obtidos para o RM.

Não se verificou elevada concentração de sólidos suspensos voláteis (SSV), como forma de confirmação a ausência de arraste de biomassa do interior do reator, sendo que essa variável permaneceu entre 27,6 e 8 mg L^{-1} , como se pode apreciar na Tabela 5.24.

U, U	ue suu	operação			
	TDH	SST (mg L^{-1})	SSF (mg L^{-1})	SSV (mg L^{-1})	SSV (%)
	8	$241,7\pm53$	$217,4 \pm 54$	$27,6 \pm 10$	11,3
	6	$196,3\pm10$	$198,1\pm11$	$21,\!4\pm11$	9,8
	4	$140,\!4\pm12$	$123,1 \pm 9$	$18,2\pm 2$	12,9
	2	115 ± 14	107 ± 11	8 ± 3	7,0
	1	$104,4 \pm 13$	$91,\!4 \pm 13$	13 ± 2	12,4

Tabela 5.24. Sólidos suspensos totais (SST), fixos (SSF) e voláteis (SSV) referentes ao RM ao longo de sua operação

Como base na Tabela 5.24, pode-se concluir que houve desprendimento uniforme de biomassa, haja vista que essa análise é realizada no efluente do reator de biomassa aderida, permanecendo entre 7,0 e 12,9% dos sólidos totais presentes.

O RM foi operado sem adição complementar de nutrientes, assim como citado no item 4.2.3, por se tratar de um composto complexo capaz de fornecer os elementos essenciais à fermentação.

A relação DQO:N:P média mantida no substrato utilizado na alimentação do RM foi de 1052:12:1, a qual possuía concentrações de nitrogênio e fósforo semelhantes à relação 1000:5:1 citada pela literatura (Ren *et al.*, 2010; Han *et al.*, 2010; 2012a; 2012b; Plangklang *et al.*, 2012).

5.4.RALF alimentado com vinhaça – RV

Este tópico trata da produção de H_2 no reator anaeróbio de leito fluidificado em temperatura termofílica (55°C) utilizando como substrato vinhaça de cana-de-açúcar pré-tratada. A fim de tornar os termos mais objetivos, sempre que relatada vinhaça de cana-de-açúcar *in natura* usou-se apenas vinhaça, porém, para designar vinhaça que passou anteriormente por qualquer processo de tratamento será então descrito o processo, como é o caso da vinhaça pré-tratada físico-quimicamente.

O RV foi mantido na fase de inoculação (recirculação/circuito fechado) durante 22 dias (Tabela 5.25), tempo necessário para adaptação dos microrganismos às condições hidrodinâmicas do sistema e consequente consumo da ordem de 80% do carboidrato introduzido inicialmente.

Fase	TDH (h)	$TCO (kg DQO m^{-3} d^{-1})$	Duração da fase (dias)
Inoculação	-	-	22
1	8	15	50
2	6	20	56
3	4	30	63
4	2	60	38
5	1	120	25

Tabela 5.25. Característica das fases submetidas ao RV

O fato de haver necessitado período de inoculação mais longo, possivelmente, se deu por tratar-se de substrato complexo, com presença de substâncias tóxicas e recalcitrantes como fenóis, polifenóis e metais pesados (España-Gamboa *et al.*, 2011).

5.4.1. Efeito do tratamento físico-químico aplicado à vinhaça

O tratamento físico-químico, descrito no item 4.2.4, proporcionou a remoção de 18,5 e 22,2% de DQO e sulfato, respectivamente, verificáveis na Tabela 5.26.

Tabela 5.26. Efeito do tratamento físico-químico aplicado à vinhaça, para DQO e sulfato

Substrato	DQO (mg L ⁻¹)	SO_4^{2-} (mg L ⁻¹)		
Substrato	Média±σ	Remoção (%)	Média±σ	$\frac{\text{Remoção (\%)}}{5}$	
Vinhaça in natura	31603 ± 627	105	$2313 \pm 37,5$	22.2	
Vinhaça pré-tratada	25766 ± 1120	18,5	1800 ± 50	22,2	

Campos *et al.* (2014) realizaram estudo sobre uma sequência de tratamentos, dentre os quais se incluía o tratamento físico-químico (FQ), para adequação ambiental de vinhaça da indústria da cachaça. O tratamento FQ foi realizado com óxido de cálcio (30 g

 L^{-1}), sulfato de alumínio (5 g L^{-1}) e cloreto férrico (0,3 g L^{-1}), sendo que o CaO foi empregado com objetivo principal de ajustar o pH. A etapa do tratamento composta pelo FQ respondeu por 73,4% da remoção de DQO. Valor este superior ao obtido neste estudo (18,5%). Isso se deu pela diferença dos coagulantes e das massas destes, pois utilizaram cerca de cinco vezes a massa de óxido de cálcio, além de adicionarem outros coagulantes de reconhecidas eficiências.

O objetivo deste estudo não engloba a melhora da eficiência do tratamento físicoquímico, mas sim avaliar o efeito desta diminuição atual na posterior fermentação.

5.4.2. Conversão de carboidratos

A vinhaça de cana-de-açúcar é o principal resíduo da cadeia sucroalcooleira, com grande parte de seus carboidratos composta por sacarose, por isso, as análises deste parâmetro foram realizadas utilizando este açúcar como padrão, motivo pelo qual cita carboidratos como sacarose.

Os afluentes do RV se mantiveram com as concentrações de carboidratos entre 463 e 1.048 mg L⁻¹ enquanto que as concentrações dos efluentes deste, variaram entre 162 e 317 mg L⁻¹. A redução do TDH de 8 para 2h acarretou no aumento da TCO de 12 para 64 kg DQO m⁻³ d⁻¹, o que influenciou de forma positiva na conversão de carboidratos, passando de 62,5 para 75%, porém, o subsequente TDH (1h) resultou em decréscimo da conversão de carboidrato para 54,6%, como se pode verificar na Figura 5.16 e Tabela 5.27.

Figura 5.16. Concentrações e conversões de carboidratos no RV



TDH (h)	8	6	4	2	1
Afluente (mg L^{-1})	463 ± 168	540 ± 225	668 ± 263	1048 ± 400	702 ± 150
Efluente (mg L ⁻¹)	162 ± 68	179 ± 41	206 ± 68	244 ± 71	317 ± 64
Conversão (%)	$62{,}5\pm8$	$66,0\pm7$	$68,5\pm3,8$	$75{,}0\pm7$	$54,6 \pm 2$

Tabela 5.27. Concentrações e conversões de carboidratos no RV durante as cinco fases operacionais

Santos *et al.* (2014a) operaram RALF (55°C) no qual utilizaram vinhaça como substrato (5.000 mg DQO L⁻¹) e TCO de 26,6 a 225,3 kg DQO m⁻³ d⁻¹. Estes autores relataram comportamento semelhante; incremento da conversão de carboidratos com acréscimo da TCO, sendo a máxima conversão de 52,6% quando em operação com TCO de 112,7 kg DQO m⁻³ d⁻¹ (TDH de 2h) e posterior decréscimo para TCO superior a citada. As conversões obtidas nesse estudo, apesar de atingirem seu máximo valor em TCO inferior (64 kg DQO m⁻³ d⁻¹), são superiores as descritas pelos citados autores. Quando em operação em TCO semelhante à citada pelos autores como máxima conversão (112,7 kg DQO m⁻³ d⁻¹), o RV apresentou 54,6% de conversão de carboidrato, valor similar ao relatado (52,6%).

Também utilizando vinhaça como substrato (10.000 e 30.000 mg DQO L⁻¹), Santos *et al.* (2014b) operaram dois RALF (55°C) nos quais obtiveram máximas conversões (52,2 e 49,9%) quando operados em TCO de 60 e 180 kg DQO m⁻³ d⁻¹, respectivamente. Valores inferiores aos obtidos no RV, porém, deve-se ressaltar a diferença de substrato, vinhaça pré-tratada e vinhaça in natura diluída, sendo que o prétratamento reduz compostos que podem ser tóxicos ao sistema – item 4.2.4.

Ferraz Junior *et al.* (2014) operaram APBR (55°C) utilizando vinhaça como substrato (36.200 mg DQO L⁻¹). Obtiveram comportamento semelhante ao RV e literaturas supracitadas (Santos *et al.*, 2014a; 2014b); incremento da conversão de carboidratos com acréscimo da TCO, logrando sua máxima conversão (79,4%) quando operado em TCO de 54,3 kg DQO m⁻³ d⁻¹. Conversão similar à obtida para o RV (75%) quando em TCO próxima a relatada (64 kg DQO m⁻³ d⁻¹), porém superiores as descritas pelos demais autores (Santos *et al.*, 2014a; 2014b) que utilizaram vinhaça *in natura*. Fato justificado pelas diferenças hidrodinâmicas destes dois modelos de reatores, pois segundo Fontes Lima e Zaiat (2012), é característico de reatores com características de fluxo pistonados possuírem conversões de carboidratos superiores aos reatores de mistura completa, sendo que o RALF, por sua recirculação, tende a se comportar como esta última classificação. O RV apesar de se tratar de RALF, utiliza vinhaça pré-tratada físico-

quimicamente, que assim como já citado, possivelmente possui menos compostos recalcitrantes, o que melhora sua biodegradabilidade.

5.4.3. Composição do biogás

A composição do biogás produzido pelo RV se restringiu a H_2 e CO₂, fato que evidencia a eficácia do conjunto de medidas tomadas para supressão da metanogênese, sendo eles; tratamento térmico aplicado ao lodo, elevada carga orgânica e reduzido pH.

Diferentemente dos demais reatores, não se pode afirmar a influência da variação da TCO sobre a concentração dos componentes do biogás de forma linear, sendo claramente condicionado somente em TCO elevadas. A concentração de H₂ no biogás variou entre 5,6 e 5,2%, para os TDH de 8 e 4h (TCO 12 a 31 kg DQO m⁻³ d⁻¹), porém, com expressivo incremento para os demais TDH (2 e 1h), chegando a 46,7% para TDH de 1h, como se encontra apreciável na Figura 5.17 e Tabela 5.28.

Figura 5.17. Composição do biogás produzido pelo RV segundo o TDH aplicado



Tabela 5.28. Composição do biogás produzido pelo RV

TDH (h)	-	8	6	4	2	1
H ₂ (%)		$5,6 \pm 3$	$9,3 \pm 3$	$5,2\pm 2$	$44,3\pm8$	$46,7\pm5$
CO ₂ (%)		$94{,}4\pm 6$	$90,7\pm11$	$94,8\pm16$	$55{,}7\pm9$	$53{,}3\pm7$

Santos *et al.* (2014a) operando RALF (55°C) utilizando vinhaça como substrato (5.000 mg DQO L⁻¹) relataram sua máxima concentração de H₂ (52,0%) quando operaram nas duas menores TCO (30,5 e 35,6 kg DQO m⁻³ d⁻¹), conteúdo de H₂ levemente superior ao obtido pelo RV (46,7%).

Santos *et al.* (2014b) operaram dois RALF (55°C) utilizando vinhaça como substrato (10.000 e 30.000 mg DQO L⁻¹), obtendo suas máximas concentrações de H₂ (57,1 e 52,1%) quando operados em TCO de 60 kg DQO m⁻³ d⁻¹ (TDH 4h) e 120 kg DQO m⁻³ d⁻¹ (TDH 6h). Valores estes superiores ao máximo logrado no RV, porém, deve se atentar para as diferentes características que cada um destes substratos aportaram aos sistemas, pois para os RALF operados com vinhaça, a máxima concentração de H₂ foi obtida em TDH elevados, entre 8 e 4h, porém, para o RALF alimentado com vinhaça prétratada físico-quimicamente, as concentrações mais elevadas de H₂ foram logradas nos menores TDH (2 e 1h). Esse fato ressalta a possibilidade de se utilizar reduzidos TDH para produção de H₂ em RALF (55°C) alimentado esta vinhaça pré-tratada e ainda assim manter elevada porcentagem de H₂ no biogás e consumo de carboidrato.

5.4.4. Produção volumétrica de hidrogênio

Os valores de PVH relativos ao RV foram selecionados com base na representatividade destes, pois houve produções esporádicas muito superiores, porém, não representariam o real comportamento das respectivas fases.

Verifica-se o aumento da PVH condicionada pelo aumento da TCO aplicada ao RV, elevação de 0,0 para 40,7 mL H_2 h⁻¹ L⁻¹ com redução do TDH (8 para 1h) e consequente aumento da TCO (12 para 117 kg DQO m⁻³ d⁻¹), valores esses presentes na Figura 5.18 e Tabela 5.29.





Beganas s i Dii apneas	*0				
TDH (h)	8	6	4	2	1
$PVH (mL h^{-1} L^{-1})$	$0,0\pm0,0$	$0,0 \pm 0,1$	$0,1 \pm 1$	$37,9 \pm 19,1$	$40,7 \pm 4,7$
TCO (kg DQO $m^{-3} d^{-1}$)	12	20	31	64	117

Tabela 5.29. Produção volumétrica de H_2 (PVH) e taxa de carregamento orgânico (TCO) segundo o TDH aplicado

Ao analisar a Figura 5.18 fica evidente o incremento da PVH condicionado pelo aumento da TCO, promovida pela redução do TDH. Assim como para a concentração de H_2 no biogás, há clara afinidade do sistema por elevadas cargas orgânicas, com valores representativos somente acima de 64 kg DQO m⁻³ d⁻¹.

Ferraz Junior *et al.* (2014) operaram APBR (55°C) utilizando vinhaça como substrato (36.200 mg DQO L⁻¹), para o qual relataram máxima PVH (21,95 mL h⁻¹ L⁻¹) quando operado em TCO de 72,4 kg DQO m⁻³ d⁻¹, produção inferior a máxima obtida para o RV (40,7 mL h⁻¹ L⁻¹), porém, há de ressaltar as diferentes configurações dos reatores, os quais representa as condições extremas de expansão de leito, fato esse que tem intima relação com transferência de massas, o que beneficia o RALF.

Santos *et al.* (2014b) operaram dois RALF (55°C) utilizando vinhaça como substrato (10.000 e 30.000 mg DQO L⁻¹), relataram PVH de 1.240 e 550 mL H₂ h⁻¹ L⁻¹ quando operados em TCO de 120 kg DQO m⁻³ d⁻¹, respectivamente. A operação do RV em TCO semelhante (112 kg DQO m⁻³ d⁻¹) resultou em valor inferior aos obtidos pelos citados autores, possivelmente pela diferente concentração de substrato e características gerais destes, haja vista o tratamento da vinhaça aplicada ao RV.

Assim como Santos *et al.* (2014a) que operando nas mesmas condições do autor anterior, porém com concentração de substrato inferior (5.000 mg DQO L⁻¹) obteve 530 mL H₂ h⁻¹ L⁻¹ quando em TCO de 107,2 kg DQO m⁻³ d⁻¹.

5.4.5. Rendimento de hidrogênio

Assim como os demais itens referentes a produção de H_2 , concentração de H_2 e PVH, o rendimento de H_2 (HY), se mostra influenciado pelo TDH, com importantes incrementos somente em elevadas TCO (TDH inferiores). Verificou-se constância nos HY nos TDH de 8, 6 e 4h, com abrupto incremento, passando de 0,01 para 0,57 e 0,65 mol H_2 mol⁻¹sacarose, quando em TDH de 2 e 1h, respectivamente. O comportamento gráfico do HY durante as fases de operação do RV encontra-se na Figura 5.19



Figura 5.19. Rendimentos de H₂ obtidos no RV ao longo de seu período operacional

Ao operar APBR (55°C) com vinhaça como substrato (36.200 mg DQO L⁻¹) Ferraz Junior *et al.* (2014) notaram incremento do HY até TCO de 72,4 kg DQO m⁻³ d⁻¹, na qual obtiveram HY de 1,4 mol H₂ mol⁻¹sacarose. O aumento da TCO para 108,6 kg DQO m⁻³ d⁻¹ promoveu o decréscimo do HY para 0,6 mol H₂ mol⁻¹sacarose. Os valores obtidos por estes autores são superiores aos logrados no RV, porém, vale ressaltar a diferença de HY segundo TCO de cada reator, pois para TCO de 112 kg DQO m⁻³ d⁻¹, houve rendimento superior (0,65 mol H₂ mol⁻¹sacarose) aos 0,6 mol H₂ mol⁻¹sacarose relatados pelos autores.

Utilizando unidade de massa de DQO aplicada para descrever o HY, Santos *et al.* (2014a) ao operarem o RALF (55°C) com vinhaça (5.000 mg DQO L⁻¹) como substrato relatam valores entre 1,97 e 5,73 mmol g⁻¹DQO_{aplicada}, com comportamento semelhante a Ferraz Junior *et al.* (2014); incremento de HY até determinado valor de TCO (52,7 kg DQO m⁻³ d⁻¹), na qual atingiu seu máximo valor e posterior decréscimo. O RV logrou valores de HY inferiores aos citados por esses autores, variando de 0,03 a 1,06 mmol g⁻¹DQO_{aplicada}.

Santos *et al.* (2014b), lograram 0,79 e 2,86 mmol H₂ g⁻¹DQO_{aplicada}, para RALF (55°C) utilizando vinhaça como substrato (30.000 e 10.000 mg DQO L⁻¹, respectivamente). O valor médio máximo obtido no RV (1,06 mmol g⁻¹DQO_{aplicada}) foi intermediário aos valores supracitados.

Com base no HY e conversão de carboidratos obtidos nesse estudo, o RV sinaliza para seu limite de carga orgânica em TCO de 64 kg m⁻³ d⁻¹ (TDH 2h), sendo que TCO superiores causarão sobrecarga orgânica.

Fato esse verificado por Santos *et al.* (2014c) ao operarem dois RALF (55°C) com vinhaça (15.000 e 20.000 mg DQO L⁻¹). Esses autores relataram carga orgânica máxima em TCO semelhante ao RV, entre 60 e 80 kg m⁻³ d⁻¹.

5.4.6. Metabólitos solúveis

Os metabólitos dissolvidos produzidos no RV durante a primeira fase de operação foi predominantemente composto por HPr (74,9%), isso caracteriza a disponibilidade de íon H⁺, que possivelmente formariam H₂, porém, que são consumidos na redução do piruvato à propiônico (Figura 3.3). As fases 2, 3 e 4 são compostas por rota acética, com presença de concentrações consideráveis de EtOH (13,4 – 19,8%) e HisoBu (17 – 17,3%). Porém, a fase cinco (TDH 1h) de maior produção de H₂ resultou em rota mista, como presença de EtOH, (18,7%), HPr (22,3%), HBu (21,8%), HAc (18,9%), HMa (14%) e HCi (4,2%), como se pode verificar na Figura 5.20 e Tabela 5.30.





HAc: ácido Acético, HPr: ácido Propiônico, HBu: ácido Butírico, HisoBu: ácido isoButírico, HMa: ácido Málico, HisoVa: ácido isoValérico, HCa: ácido Capróico, EtOH: Etanol.

Tabela 5.30. Metabólitos produzidos no RV durante as duas primeiras fases de operação

Fase	TDH		EtOH	HPr	HBu	HAc	HMa	HCi	HisoBu	HisoVa	HCa
1	0	$mg L^{-1} \pm \sigma$	$0,0\pm0,0$	$1661,\!97\pm88,\!8$	$0,0\pm0,0$	$0,0\pm0,0$	$0,0\pm0,0$	$0,0\pm0,0$	$0,0\pm0,0$	$366,\!03\pm70,\!9$	$458,\!6\pm23,\!5$
1	0	%	0	74,9	0	0	0	0	0	12	13,2
2	6	$mg \ L^{1} \pm \sigma$	$246,6\pm115,7$	$156,1\pm19,8$	$109 \pm 78{,}3$	710 ± 564	$243,6\pm55,5$	$0,0\pm0,0$	$412 \pm 34,2$	$0,0\pm0,0$	$0,0\pm0,0$
2	0	%	19,8	7,8	4,6	43,8	6,7	0	17,3	0	0
2	4	$mg \ L^{\text{-1}} \pm \sigma$	$225,3\pm29,5$	$210,\!56\pm36,\!4$	$325\pm69{,}7$	589 ± 373	$330,9 \pm 42,9$	$60,\!4\pm12,\!3$	$434,7\pm35,9$	$0,0\pm0,0$	$0,0\pm0,0$
3	4	%	16,9	9,8	12,7	33,9	8,5	1,1	17	0	0
4	n	$mg \ L^{\text{-1}} \pm \sigma$	$161,\!4\pm26,\!7$	$192,3\pm57$	$438,\!6\pm61,\!9$	772 ± 132	$256,8 \pm 16,\!4$	$66,1\pm16,7$	$0,0\pm0,0$	$0,0\pm0,0$	$0,0\pm0,0$
4	Z	%	13,4	9,9	19	49,1	7,3	1,3	0	0	0
5 1	1	$mg \ L^{\text{-1}} \pm \sigma$	$133,2\pm21,5$	226 ± 65	$296{,}4\pm70{,}6$	$176 \pm 15{,}3$	$290,6\pm38,9$	$125,\!6\pm53$	$0,0\pm0,0$	$0,0\pm0,0$	$0,0\pm0,0$
	1	%	18,7	22,3	21,8	18,9	14	4,2	0	0	0

EtOH: Etanol, HPr: ácido Propiônico, HBu: ácido Butírico, HAc: ácido Acético, HMa: ácido Málico, HCi: ácido Cítrico, HisoBu: ácido isoButírico, HisoVa: ácido isoValérico, HCa: ácido Capróico.

A presença de HPr em tamanha concentração justifica a reduzida produção de H_2 (PVH), pois com base na equação 1 (Antonopoulou *et al.*, 2008), apresentada no item 5.1.4, a produção deste ácido é uma rota consumidora de H_2 , com utilização de 2 mols de H_2 para cada mol de ácido propiônico.

$$C_6H_{12}O_6 + 2H_2 \rightarrow 2CH_3CH_2COOH + 2H_2O$$
(1)

Porém, o HPr se trata de um composto de elevado valor comercial, empregado na indústria alimentícia, sendo que o RV mostra aptidão para a produção deste ácido quando operado em TDH de 8h, no qual se obteve 74,9% de HPr dentre os metabólitos produzidos. Valor superior aos 32,2 e 32,8% logrados por Santos *et al.* (2014c) em RALF (55°) alimentado com vinhaça (15.000 e 20.000 mg DQO L⁻¹) quando operados em TCO de 90 e 120 kg DQO m⁻³ d⁻¹, respectivamente.

Assim como Ferraz Junior *et al.* (2014) que ao operarem reator de leito fixo (55°C) utilizando vinhaça como substrato (36.200 mg DQO L^{-1}), relataram a máxima concentração de HPr de 1.200 mg L^{-1} em TCO de 108,6 kg DQO m⁻³ d⁻¹, valor inferior ao obtido pelo RV (1.661 mg de HPr L^{-1}).

Ao se analisar a distribuição dos metabólitos ao longo do período operacional, pôde-se verificar possível seleção de microrganismos com a mudança de TDH, promovida pelo aumento da carga orgânica e/ou possível aumento de substâncias recalcitrantes, haja vista a presença de compostos com essa característica na vinhaça, isso provocou uma redução da diversidade de metabólitos dissolvidos.

A seleção de biota proporcionou o incremento da produção de H_2 , notável no tópico 5.4.4 e na distribuição dos metabólitos. A diminuição do HPr e aumento da concentração de HAc na fase 2 e 3, as quais não possuem valores expressivos de PVH, podem estar relacionadas a homoacetogênese. Saady (2013) descreve os microrganismos homoacetogênicos como sendo acetogênicos que por condição de estresse ou após decréscimo de compostos orgânicos reduzidos mudam seus metabolismos e passam a viverem de forma autotrófica a base de H_2 e CO₂.

As mudanças de TDH impostas ao sistema representam fator de estresse, podendo ser esse o motivo da mudança. Na fase 4 e 5, fica claro o retorno destes microrganimos para forma heterotrófica normal, pois as concentrações de metabólitos continuam similares às duas fases anteriores, porém, a PVH demonstra incremento bastante expressivo, passando de valores próximos a 0 mL H₂ $h^{-1}L^{-1}$ (fase 2 e 3) para 502, 1 e 538,8 mL H₂ $h^{-1}L^{-1}$, para fase 4 e 5, respectivamente.

5.4.7. Conversão de DQO, pH e sólidos suspensos

Assim como citado para os reatores anteriormente relatados, a conversão de DQO em reatores acidogênicos resulta em diminutas conversões de DQO, por se tratar de fermentações, com formação de compostos reduzidos diluídos na fase líquida.

No caso do RV, a conversão de DQO se manteve entre 5,7 e 8,8%, não se mostrando influenciada pelo TDH, como se pode verificar na Tabela 5.31.

Assim como relatado para os demais reatores operados com efluente real, há oscilações na concentração de DQO afluente ao RV, justificado pelo fato de ser um composto real, além de passar pelo pré-tratamento físico-químico, o que lhe atribui características variáveis por uma série de fatores, temperatura, imprecisão de massas de coagulante e volume de vinhaça, além de variações das características da vinhaça. Os valores médios, afluente e efluente, além de conversão são apresentados na Tabela 5.31.

Tabela 5.31. Concentrações e conversões de DQO referentes ao RV durante as cinco fases experimentais

TDH (h)	8	6	4	2	1
Afluente (mg L^{-1})	4551 ± 826	5208 ± 1273	5309 ± 1252	5595 ± 1576	4800 ± 366
Efluente (mg L ⁻¹)	4203 ± 648	5076 ± 1230	4994 ± 1219	5278 ± 1371	4519 ± 268
Conversão (%)	$7,1 \pm 5$	$8,8 \pm 6$	$5,7 \pm 4$	$5,7 \pm 4$	$5,0 \pm 3$

Operando APBR (55°C) alimentado com vinhaça (36.200 mg DQO L⁻¹), Ferraz Junior *et al.* (2014) reportaram conversões de DQO de 4,9 a 5,3%, os quais representam valores inferiores, porém, muito próximos aos logrados no RV (Tabela 5.31).

Ainda com base na Tabela 5.31 pode-se afirmar que o intervalo de conversão lograda neste estudo (5,0-8,8%) é levemente inferior aos obtidos por Santos *et al.* (2014a), que relataram conversões entre 8,0 e 13,4% quando operaram RALF (55°C) alimentado com vinhaça (5.000 mg DQO L⁻¹).

Outro estudo que também cita valores superiores aos obtidos pelo RV é Santos *et al.* (2014b), que operando dois RALF (55°C) utilizando vinhaça como substrato (10.000 e 30.000 mg DQO L⁻¹) relataram conversões de 8,5 a 13,6% e 10,0 e 11,5%, respectivamente.

Ao analisar os valores de pH, fica evidente que o aumento da TCO não influenciou no este parâmetro ao longo da operação do RV. Apesar de haver controle de pH afluente, poderia expressar variações na diferença entre afluente e efluente, fato que não é apreciável. Os valores médios de pH referentes a cada uma das fase operacionais a que foi submetido o RV são apresentados na Tabela 5.32

Tabela 5.32. Valores médios de pH afluente e efluente no RV durante as três primeiras fases

TDH	$pH_{afluente}$	pH_{efluente}
8	$4{,}9\pm0{,}7$	$5,2\pm0,2$
6	$\textbf{4,8} \pm \textbf{0,1}$	$5,1\pm0,1$
4	$5,0\pm0,1$	$5,1\pm0,1$
2	$4,8\pm0,2$	$4,8\pm0,2$
1	$4,5 \pm 0,1$	$4,5 \pm 0,1$

Esses valores são similares ao valor de pH relatado por Ferraz Junior *et al.* (2014) para APBR (pH 5) também empregando vinhaça como substrato.

Santos *et al.* (2014a) relata valor de pH inferior (4,1) para operação de RALF. Assim como Santos *et al.* (2014b) que descreve valores de pH entre (4,17 – 4,47), inferiores aos obtidos para o RV (4,5 e 5,2). O fato de ser operado com pH superior a literatura que utilizou reatores, substrato e temperatura semelhantes (Santos *et al.*, 2014a; 2014b) se deu pelo comportamento inicial do RV, o qual se mostrou produtivo para esta faixa de pH, além de se tratar de um reator com controle de pH afluente, diferentemente da citada literatura.

Os sólidos suspensos totais (SST), fixos (SSF) e voláteis (SSV) verificados a partir da corrente efluente do RV encontram-se na Tabela 5.33, sendo que a fração de SSV nos SST se manteve entre 7,4 e 33,4%.

	L			
TDH	SST (mg L^{-1})	SSF (mg L^{-1})	SSV (mg L^{-1})	SSV (%)
8	$165,1\pm26$	$110,0\pm33$	$42,0 \pm 10$	27,6
6	$162,1\pm25$	$130,7\pm18$	$31,4\pm16$	19,4
4	$158,6\pm30$	$138,5\pm30$	$20,1 \pm 1$	12,7
2	$176,5\pm27$	$163,\!4\pm28$	$13,1 \pm 3$	7,4
1	$154,6 \pm 31$	$102,9\pm13$	$51,7\pm24$	33,4

Tabela 5.33. Sólidos suspensos totais (SST), fixos (SSF) e voláteis (SSV) referentes ao RV nas cinco fases operacionais

Como base na Tabela 5.33, pode-se concluir que a variação da percentagem de SSV, fração utilizada como referência para se determinar o fluxo de biomassa microbiana no reator, não foi condicionada pelo TDH, além de representar baixas percentagens, o que indica a ausência de arraste de biomassa do interior do reator.

Santos *et al*. (2014c) relataram frações de SSV de 87 e 88% para operação de dois RALF (55°C) utilizando vinhaça como substrato (15.000 e 20.000 mg DQO L⁻¹).

Essa discrepante diferença se dá pelo fato de utilizarem vinhaça *in natura*, além de concentrações superiores, o que exigem maiores volumes de vinhaça por litro de substrato, ou seja, essa quantidade de SSV possivelmente foi oriunda do substrato afluente ao reator.

5.4.8. Relação DQO:N:P e DQO:SO₄⁻²

Relações apropriadas de carbono, nitrogênio e fósforo, além de carbono e sulfato podem incrementar a produção de H₂, modificando rotas metabólicas associadas às necessidades nutricionais dos microrganismos (Intanoo *et al.*, 2012).

Assim, ao longo da operação do RALF alimentado com vinhaça pré-tratada, a relação DQO:N:P média obtida para o substrato de alimentação, considerando vinhaça pré-tratada e suplementação de nutrientes, foi de 100:2:0,9.

Com objetivo de atender as necessidades nutricionais de inóculo misto empregado na produção de H_2 a partir de glicose, frutose e galactose em batelada, Li *et al* (2008) utilizaram relação DQO:N:P de 100:2:0,4, semelhante a relação utilizada no RV.

Valores semelhantes também aos utilizados por Santos *et al.* (2014b), na operação do RALF (55°C) com vinhaça (10.000 mg DQO L⁻¹) no qual citaram relações entre 100:2,0:0,4 e 100:2,3:0,5. Esses autores relataram concentrações de H₂ de 48,9%, muito similar aos 46,7% logrados neste estudo.

A respeito da relação DQO:SO₄⁻², o RV foi operado com relação média de 15:1, valor este incluso no intervalo de 12:1-21:1 citado por Santos *et al.* (2014a; 2014b; 2014c) ao operarem dois RALF (55°C) também alimentados com vinhaça.

Com base na caracterização da vinhaça após o pré-tratamento físico-químico (Tabela 4.7) foi possível determinar a concentração de sulfato do substrato afluente, o qual corresponde a 350 mg $SO_4^{-2} L^{-1}$, porém, em respeito a concentração de sulfato no reator, houve um comportamento interessante, pois até a fase 3 (TDH de 4h) a concentração foi 0 mg L^{-1} . Nas duas últimas fases as concentrações de sulfato foram significativas, chegando a 346 mg L^{-1} quando em TDH de1h, como se pode apreciar na Figura 5.21.



Figura 5.21. Comportamento da concentração de sulfato (SO₄²⁻) no efluente do RV condicionado ao TDH

O comportamento da concentração de sulfato no efluente do RV não está, possivelmente, relacionado à presença de bactérias redutoras de sulfato (BRS), pois a operação em baixos valores de pH inibem o desenvolvimento destes microrganismos, mesmo em presença de elevadas concentrações de sulfato (Hwang *et al.*, 2009a; 2009b).

Houve consumo deste sulfato pelas bactérias acidogênicas, pois assim como descreve Krishna (2013), os sulfatos, assim como outros compostos oxidados e os aminoácidos com enxofre em sua composição, são de extrema importância em processos fermentativos, nos quais se enquadram a produção biológica de hidrogênio.

Com a redução do TDH e consequente aumento da carga de sulfato introduzida no reator por unidade de tempo, houve sobrealimentação do sistema em relação ao sulfato, o qual não teve capacidade de continuar consumindo sua totalidade, permanecendo concentrações residuais deste composto na corrente líquida. A Tabela 5.34 faz a estimativa a respeito.

Tabela 5.34. Estimativa da concentração residual de sulfato segundo o TDH aplicado ao RV

TDH (h)	8	6	4	2	1
Massa sulfato (mg $SO_4^{-2} h^{-1} L^{-1}$)	43,75	58,3	87,5	175	350
Vazão (L h ⁻¹)	0,191	0,255	0,383	0,765	1,53
Concentração estimada $(mg SO_4^{-2} L^{-1})$	0	0	0	175	262,5

Como se pode notar na Tabela 5.34 os valores obtidos para o TDH de 2 e 1h são próximos aos obtidos no RV, calculados com a subtração do valor da concentração no TDH de 4h, aceito como limite para assimilação microbiano do reator. Isso justifica a afirmação anterior sobre comportamento do sulfato com a redução do TDH no RV.

Além do consumo do sulfato pelas bactérias acidogênicas nas fases iniciais, as concentrações deste parâmetro não atingiram valores críticos nas demais fases, pois segundo Hwang *et al.* (2009a; 2009b) a produção de H₂ pode ocorrer em presença de elevadas concentrações de sulfato (3.000 mg L⁻¹), quando em pH baixo (5,5), fator esse que evita a produção de H₂S por BRS, o que influenciaria na produção de H₂. Em todas as fases de operação do RV o pH foi mantido na faixa de 4,5 a 5,2, o que, possivelmente, inibiu a presença de BRS, confirmada pela concentração de sulfato no efluente do RV (Figura 5.21) após ultrapassar as necessidades dos microrganismos produtores de H₂.

5.5. Análise comparativa dos reatores; RS, RC, RM e RC

Neste tópico estão reunidos de forma objetiva os resultados obtidos em cada um dos quatro reatores tratados, com intuito de ressaltar os pontos positivos de cada estudo, além de possibilitar o levantamento energético comparativo destes.

O aspecto principal deste estudo, tratando-o de forma genérica, é a produção de H_2 e ácidos orgânicos a partir destes quatro compostos oriundos da cadeia sucroalcooleira; sacarose, caldo de cana-de-açúcar, melaço e vinhaça.

Partindo desta premissa, na produção de H₂ se obteve o seguinte cenário:

A máxima produtividade de H₂ do RS foi obtida quando operado em TDH de 1h (TCO 123 kg DQO m⁻³ d⁻¹) produzindo 194,9 mL H₂ h⁻¹ L⁻¹, porém, seu máximo HY (1,97 mol H₂ mol⁻¹sacarose) em TDH de 4h (TCO de 30 kg DQO m⁻³ d⁻¹).

Diferentemente do RS, o RC demonstrou correlação logarítmica entre TCO (x) e PVH (y), expressa por y= 217,38ln(x) – 535,31 (R^2 = 0,993). Sua máxima produtividade (501,4 mL H₂ h⁻¹ L⁻¹) obtida em operação de TDH de 1h (TCO de 115 kg DQO m⁻³ d⁻¹), porém, seu máximo HY (3,01 mol H₂ mol⁻¹sacarose) foi obtido em TDH de 2h (TCO de 49 kg DQO m⁻³ d⁻¹).

De forma semelhante ao RC, verificou-se correlação logarítmica para o RM, sendo expressa pela equação y= $20,987\ln(x) - 41,997$ (R₂= 0,968) com máxima produtividade (303,4 mL H₂ h⁻¹ L⁻¹) também em TDH de 1h (TCO 116 kg DQO m⁻³ d⁻¹),

porém, máximo HY (2,5 mol H_2 mol⁻¹sacarose) quando operado em TDH de 6h (TCO de 20 kg DQO m⁻³ d⁻¹).

Para o RV, a máxima produtividade (40,7 mL H₂ h⁻¹ L⁻¹) e máximo HY (0,65 mol H₂ mol⁻¹sacarose) foram obtidos em TDH de 1h (TCO de 117 kg DQO m⁻³ d⁻¹).

Assim, o reator de maior PVH foi o RC, com produção de 501,4 mL H₂ $h^{-1} L^{-1}$, assim como maior HY (3,01 mol H₂ mol⁻¹sacarose).

Com base em Han *et al.* (2012b), calculou-se as produtividades energéticas de cada um dos reatores (Tabela 5.35), sendo que para o RS, se obteve 8,6 kJ $h^{-1} L^{-1}$.

Reator	TDH (h)	metabólitos predominantes	%H ₂	HY (molH ₂ mol ⁻¹ sac)	$\begin{array}{c} PVH \ (mmol \\ H_2 \ h^{-1}L^{-1}) \end{array}$	EtOH (mmol $h^{-1}L^{-1}$)	Energia (kJ h ⁻¹ L ⁻¹)
RS	8	HPr; HAc	56,7	1,27	2,4	0,0	0,7
	6	HLa; HAc; EtOH	58,9	1,89	4,7	0,5	2,0
	4	HLa; EtOH; HAc	59,0	1,97	6,3	1,4	3,7
	2	HLa; EtOH; HAc	59,0	1,17	6,8	2,4	5,2
	1	HLa; EtOH; HAc	64,8	0,81	7,0	4,8	8,6
	8	HSu	53,1	0,00	0,0	0,0	0,0
	6	HSu; HisoVa	54,0	1,19	4,2	0,0	1,2
RC	4	HSu; HisoVa; HLa	53,8	2,17	6,9	0,8	3,1
	2	HSu; HLa; HFo	53,3	3,01	11,1	1,6	5,3
	1	HLa; HAc; HBu	57,8	1,89	16,6	0,0	4,7
	8	HSu	56,0	1,95	3,1	0,0	0,9
	6	HSu	57,5	2,50	5,5	0,0	1,6
RM	4	HSu	60,3	1,46	6,3	0,0	1,8
	2	HAc; HCi; HBu; HLa	67,9	1,03	9,4	0,0	2,7
	1	HLa; HAc; HBu	74,9	0,40	10,9	0,0	3,1
RV	8	HPr	5,6	0,00	0	0,0	0,0
	6	HAc; EtOH; HisoBu	9,3	0,00	0,00	0,9	1,2
	4	HAc; EtOH; HisoBu	5,2	0,01	0,00	1,2	1,6
	2	HAc; HBu; EtOH	44,3	0,57	1,20	1,7	2,6
	1	HPr; HBu; HAc; EtOH	46,7	0,65	1,38	2,9	4,4

Tabela 5.35. Descrição comparativa dos metabólitos e fatores energéticos relacionados aos quatro reatores avaliados

No que se refere aos metabólitos dissolvidos, vale destacar as peculiaridades dos principais produtos obtidos por meio da fermentação escura destes quatro substratos avaliados;

- A maximização da produção de EtOH ocorrerá com a operação do RS em TDH de 4h, condição que possibilitou a produção de 267 mg EtOH L⁻¹;

- Objetivando obtenção de máximas produções de HPr, deve-se utilizar o RV operado em TDH de 8h, produzindo assim 1662 mg HPr L⁻¹;

 Se a estratégia principal do processo é produzir HAc, deve-se utilizar o RV em TDH de 2h, condição esta que resultou em 772 mg HAc L⁻¹;

- Quando HBu for o principal metabólito requerido, o reator mais adequado será o RM em TDH de 6h, resultando em 477,5 mg HBu L⁻¹;

 - A obtenção de HSu será máxima quando empregado RM em TDH de 8h, o qual resultou em 8.553,7 mg HSu L⁻¹;

- O HLa será o metabólito maximizado quando utilizado RS em TDH de 6h, resultando em 744 mg HLa L⁻¹;

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos foi possível concluir que a capacidade de produzir H_2 e a distribuição dos metabólitos dissolvidos foram fatores influenciados pela redução do tempo de detenção hidráulica e consequente aumento da taxa de carregamento orgânico.

Os substratos sacarose, caldo de cana-de-açúcar, melaço e vinhaça pré-tratada, utilizados como única fonte de carbono em seus respectivos reatores se mostraram adequados à produção de H₂, com destaque ao caldo (501,4 mL H₂ h⁻¹ L⁻¹), seguido pelo melaço (303,4 mL H₂ h⁻¹ L⁻¹), sacarose (194,9 mL H₂ h⁻¹ L⁻¹) e vinhaça pré-tratada (40,7 mL H₂ h⁻¹ L⁻¹).

Apesar de pequenas diferenças, os metabólitos dissolvidos apresentaram comportamentos gerais semelhantes; elevadas concentrações de um único ácido quando em TDH de 8h, e concentrações menos discrepantes de 3 ou 4 metabólitos, incluindo etanol, com a redução do TDH.

O tratamento físico-químico da vinhaça se mostrou efetivo na diminuição da carga orgânica e sulfato, com reduções médias de 18,5 e 22,2%, respectivamente.

A vinhaça pré-tratada físico-químicamente proporcionou reduzidas produções de H₂, porém, concentrações consideráveis de metabólitos dissolvidos na corrente líquida.

7. SUGESTÕES

Diante dos resultados obtidos nesse estudo, sugere-se os seguintes tópicos para pesquisas subsequentes:

- Verificar a viabilidade da produção de H₂ utilizando estes mesmos substratos em concentrações mais elevadas;
- Co-fermentação da vinhaça pré-tratada com vinhaça *in natura* com objetivo de controle do pH afluente de ambos substratos;
- Utilização de reatores acidogênicos e metanogênicos sequenciais, ainda em temperatura termofílica, com objetivo de viabilizar a produção de energia por estes compostos.

REFERÊNCIAS

- ACAR, C.; DINCER, I. Comparative assessment of hydrogen production methods from renewable and non-renewable sources. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.39, p.1-12, 2014.
- AMORIM, E. L. C. de. Efeito da concentração de glicose e da alcalinidade na produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidificado. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.
- AMORIM, E.L.C.; BARROS, A.R.; DAMIANOVIC, M.H.R.Z.; SILVA, E.L. Anaerobic fluidized bed reactor with expanded clay as support for hydrogen production through dark fermentation of glucose. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.34, p.783-790, 2009.
- AMORIM, E.L.C.; SADER, L.T.; SILVA, E.L. Effect of substrate concentration on dark fermentation hydrogen production using an anaerobic fluidized bed reactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.166, p.1248-1263, 2012.
- ANTONOPOULOU, G.; GAVALA, I.V.; SKIADAS, K.; ANGELOPOULOS, G.; LYBERATOS, G. Biofuels generation from sweet sorghum: fermentative hydrogen production and anaerobic digestion of the remaining biomass. *Bioresource Technology*, v.99, p.110-119, 2008.
- ANZOLA-ROJAS, M.P.; FONSECA, S.G.; SILVA, C.C.; OLIVEIRA, V.M.; ZAIAT, M. The use of the carbono/nitrogen ratio and specific organic loading rate as tools for improving biohydrogen production in fixed-bed reactors. *Biotechnology Reports*, v.5, p.46-54, 2015.
- APHA, AWWA, WEF. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 22th edition, American Public Health Association, Washington, D.C. 2012.
- AZBAR, N.; DOKGOZ, F.T.; KESKIN, T. Comparative evaluation of biohydrogen production from cheese whey wastewater under thermophilic and mesophilic anaerobic conditions. *International Journal Green Energy*, v.6, p.192-200, 2009a.
- AZBAR, N.; DOKGOZ, F.T.; KESKIN, T. Continuous fermentative hydrogen production from cheese whey wastewater under thermophilic anaerobic conditions. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.34, p.7441-7447, 2009b.
- BARROS, A.R.; AMORIM, E.L.C.; REIS, SHIDA, G.M.; SILVA, E.L. Biohydrogen production in anaerobic fluidized bed reactors: Effect of support material and hydraulic retention time. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.35, p.3379-3388, 2010.
- BEAUPREZ, J.J.; DE MEY, M.; SOETAERT, W.K. Microbial succinic acid production: Natural versus metabolic engineered producers. *Process Biochemistry*, v.45, p.1103-1114, 2010.
- BOSCOLO, M. Sucroquímica: síntese e potencialidades de aplicações de alguns derivados químicos da sacarose. *Química Nova*, v.26, p.906-912, 2003.

- 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*, 2015. doi: 10.1002/jctb.4665.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Anuário estatístico de agroenergia 2012. Secretaria de Produção e Energia. Brasília: MAPA/ACS, 2013. 284p.
- CAMPOS, C.R.; MESQUITA, V.A.; SILVA, C.F.; SCHWAN, R.F. Efficiency of physicochemical and biological tratments of vinasse and their influence on indigenous microbiota for disposal into the environment. Waste Mangement, v.34, p.2036-2046, 2014.
- 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, F.Y.; LIN, C.Y. Biohydrogen production using an up-flow anaerobic sludge blanket reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.29, p.33-39, 2004.
- CHANG, J.S.; LEE, K.S.; LIN, P.J. Biohydrogen production with fixed-bed bioreactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.27, p.1167-1174, 2002.
- CHANG, S.; LI, J.; LIU, F. Continuous biohydrogen production from diluted molasses in an anaerobic contact reactor. *Frontiers of environmental Science & Engineering China*, v.5, n.1, p.140-148, 2011.
- CHEN, C.C.; LIN, C.Y. Using sucrose as a substrate in an anaerobic hydrogen-producing reactor. *Advances in Environmental Research*, v.7, p.695-699, 2003.
- CHIN, H.; CHEN, Z.; CHOU, C.P. Fedbatch operation using *Clostridium acetobutylicum* suspension culture as biocatalyst for enhancing hydrogen production. *Biotechnology Progress*, v.19, p.383-388, 2003.
- CHOI, Y.A.J. Characteristics of biohydrogen fermentation from various substrates. International Journal of Hydrogen Energy, v.39, p.3152-3159, 2014.
- CIRANNA, A.; SANTALA, V.; KARP, M. Biohydrogen production in alkalithermophilic conditions: *Thermobrachium celere* as a case study. *Bioresouce Technology*, v.102, p.8714-8722, 2011.
- DEL NERY, V. Utilização de lodo anaeróbio imobilizado em gel no estudo da partida de reatores de fluxo ascendente com manta de lodo. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos, Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos-SP, 1987.
- DEMATTÊ, J.A.M.; GAMA, M.A.P.; COOPER, M.; ARAÚJO, J.C.; NANNI, M.R.; FIORI, P.R. Effect of fermentation residue on the spectral reflectance properties of soils. *Geoderma*, v.120, p.187-200, 2004.

- 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.
- ENDO, G.; NOIKE, T.; MATSUMOTO, J. Characteristics of cellulose and glucose decomposition in anaerobic phase of anaerobic digestion. *Proc. Soc. Civ. Eng.*, v.325, p.61-68, 1982.
- ENSINAS, A.V.; MODESTO, M.; NEBRA, S.A.; SERRA, L. M. Reduction or irreversibility generation in sugar and ethanol production from sugarcane. *Energy*, v.34, p.680-688, 2009.
- ENSINAS, A.V.; NEBRA, S.A.; LOZANO, M.A.; SERRA, L.M. Analysis of process steam demand reduction and electricity generation in sugar and ethanol production from sugarcane. *Energy Conversion and Management*, v.48, p.2978-2987, 2007.
- ESPAÑA-GAMBOA, E.; MIJANGOS-CORTES, J.; BARAHONA-PEREZ, L.; DOMINGUEZ-MALDONADO, J. HERNÁNDEZ-ZARATE, G.; ALZATE-GAVIRIA, L. Vinasses: characterization and treatments. *Waste Management & Research*, v.29, ed.12, p.1235-1250, 2011.
- FANG, H.H.P.; LIU, H. Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. *Bioresouce Technology*, v.82, p.87-93, 2002.
- FERRAZ JUNIOR, A.D.N. Digestão anaeróbia da vinhaça da cana de açúcar em reator acidogênico de leito fixo seguido de reator metanogênico de manta de lodo. Tese (doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos-SP, 2013.
- FERRAZ JUNIOR, A.D.N.; WENZEL, J.; ETCHEBEHERE, C.; ZAIAT, M. Effect of organic loading rate on hydrogen production from sugarcane vinasse in thermophilic acidogenic packed bed reactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.39, p.16852-16862, 2014.
- FERRAZ JUNIOR, A.D.N.; ETCHEBEHERE, C.; ZAIAT, M. High organic loading rate on thermophilic hydrogen production and metanogenomic study at an anaerobic packed-bed reactor treating a residual liquid stream of a Brazilian biorefinery. Bioresource Technology, v.186, p.81-88, 2015a.
- FERRAZ JUNIOR, A.D.N.; ETCHEBEHERE, C.; ZAIAT, M. Mesophilic hydrogen production in acidogenic packed-bed reactors (APBR) using raw sugarcane vinasse as substrate: Influence of support materials. *Anaerobe*, v.34, p.94-105, 2015b.
- FERREIRA, V.F. Carboidratos abundantes em síntese orgânica. *Química nova*, v.18, n.2, p.267-273, 1995.
- FONTES LIMA, D.M.; ZAIAT, M. The influence of the degree of back-mixing on hydrogen production in an anaerobic fixed-bed reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.37, p.9630-9635, 2012.

- GOMES, S.D.; FUESS, L.T.; PENTEADO, E.D.; LUCAS, S.D.M.; GOTARDO, J.T.; ZAIAT, M. The application of an innovative continuous multiple tube reactor as a strategy to control the specific loading rate for biohydrogen production by dark fermentation. *Bioresource Technology*, v.197, p.201-207, 2015.
- GRADY JUNIOR, C.L.P.; DAIGGER, G.T.; LIM, H.C. *Biological wastewater treatment*. 2nd ed., New York-Basel. Marcel Dekker, Inc., 1999.
- GUO, W.Q.; REN, N.Q.; WANG, X.J.; XIANG, W.S.; MENG, Z.H.; DING, J.; QU, Y.Y.; ZHANG, L.S. Biohydrogen production from ethanol-type fermentation of molasses in an expanded granular sludge bed (EGSB) reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.33, p.4981-4988, 2008.
- GUO, X.M.; TRABLY, E.; LATRILLE, E.; CARRERE, H.; STEYER, J. Predictive and explicative models of fermentative hydrogen production from solid organic waste: Role of butyrate and lactate pathways. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.39, p.7476-7485, 2014.
- GUWY, A.J.; HAWKES, F.R.; HAWKES, D.L.; ROZZI, A.G. Hydrogen production in a high rate fluidized bed anaerobic digester. *Water Research*, v.31, p.1291-1298, 1997.
- HALLENBECK, P.C.; BENEMANN, J.R. Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.27, p.1185-1193, 2002.
- HALLENBECK, P.C. Fermentative hydrogen production: Principles, progress, and prognosis. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.34, p.7379-7389, 2009.
- HALLENBECK, P.C.; GHOSH, D. Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward? *Trends in Biotechnology*, v.27, n.5, p.287-297, 2009.
- 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.; WANG, B.; ZHOU, Y.; WANG, D.; WANG, Y.; YUE, L.; LI, Y.; REN, N. Fermentative hydrogen production from molasses wastewater in a continuous mixed immobilized sludge reactor. *Bioresource Technology*, v.110, p.219-223, 2012a.
- 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, p.843-847, 2012b.
- HENZE, M.; HARREMOES, P. Anaerobic treatment of wastewater in fixed film reactors a literature review. *Water Science and Technology*, v.15, p.1-101, 1983.
- HO, D.P.; NGO, H.H.; GUO, W. A mini review on renewable sources for bioful. *Bioresource Technology*, v.169, p.742-749, 2014.
- HWANG, J.; CHA, G.; JEONG, T. et al. Effect of COD/SO42- ratio and Fe(II) under the variable hydraulic retention time (HRT) on fermentative hydrogen production. *Water Research*, v. 43, p. 3525-3533, 2009a.

- HWANG, J.; CHOI, J.; ABOU-SHANAB, R.A.I. et al. Effect of pH and sulfate concentration on hydrogen production using anaerobic mixed microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 34, p. 9702-9710, 2009b.
- HWANG, M.H.; JANG, N.J.; HYUN, S.H.; KIM, I.S. Anaerobic bio-hydrogen production from ethanol fermentation: The role of pH. *Journal of Biotechnology*, v.111, p.297-309, 2004.
- IEA. *Key World Energy Statistics*. Technical Report of International Energy Agency. 2012. OECD/IEA, Paris 82p. Disponível em: http://www.iea.org/publications/freepublications/publication/kwes.pdf; Acesso em 27/10/2014.
- IEA. World Energy Outlook. *Chapter 6: Renewable energy outlook*. 2013a, OECD/IEA, Paris. p.197-232. Disponível em: http://www.worldenergyoutlook.org/media/weowebsite/2013/WEO2013_Ch06_Re newables.pdf ; Acesso em 28/10/2014.
- IEA. *Key World Energy Statistics*. Technical Report of International Energy Agency. 2015. OECD/IEA, Paris 81p. Disponível em: http://www.iea.org/publications/freepublications/publication/KeyWorld_Statistics_2015.pdf; Acesso em 04/01/2016.
- INFANTES, A.D.; GONZÁLEZ DEL CAMPOLYRA, A.; VILLASEÑOR, J.; FÉRNANDEZ, F.J. Influence of pH, temperature and volatile fatty acids on hydrogen production by acidogenic fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.36, p.15595-15601, 2011.
- INTANOO, P.; RANGSUNVIGIT, P.; NAMPROHM, W.; THAMPRAJAMCHIT, B.; CHAVADEJ, J.; CHAVADEJ, S. Hydrogen production from alcohol wastewater by an anaerobic sequencing batch reactor under thermophilic operation: Nitrogen and phosphorous uptakes and transformation. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.37, p.11104-11112, 2012.
- JONES, D.T.; WOODS, D.R. Acetone-Butanol Fermentation Revisited. *Microbiological Reviews*, v.50, n.4, p.484-524, 1986.
- KARGI, F.; EREN, N.S.; OZMIHCI, S. Hydrogen gas production from cheese whey powder (CWP) solution by thermophilic dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.37, p.2260-2266, 2012.
- KIM, D.H.; KIM, M.S. Hydrogenases for biological hydrogen production. *Bioresource Technology*, v.102, p.8423-8431, 2011
- 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.
- KOSKINEN, P.E.P.; KAKSONEN, A.H.; PUHAKKA, L.A. The relationship between instability of H₂ production and compositions of bacterial communities within a dark fermentation fluidized-bed bioreactor. *Biotechnology & Bioengineering*, v.97, p.742-758, 2007.

- KOTAY, S.M.; DAS, D. Biohydrogen as a renewable energy resource Prospects and potentials. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.33, p.258-263, 2008.
- KRISHNA, RH. Role of factors influencing on anaerobic process for production of bio hydrogen: Future fuel. *International Journal of Advanced Chemistry*, v.2, p.31-38, 2013.
- 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 p.13445-13451, 2010.
- LEE, R.A.; LAVOIE, J.M. From first- to third-generation biofuels: Challenges of producing a commodity from a biomass of increasing complexity. *Animal Frontiers*, v.3, n.2, p.6-11, 2013.
- LEE, K.S.; LIN, P.J.; CHANG, J.S. Temperature effects on biohydrogen production in a granular sludge bed induced by activated carbon carriers. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.31, p.465-472, 2006.
- LEITE, J.A.C. Produção de ácidos graxos voláteis por fermentação acidogênica em reator anaeróbio horizontal de leito fixo e extração em resina de troca iônica e com solvente orgânico. Tese (doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.
- LEVIN, B.; PITT, L.; LOVE, M. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.29, p.173-185, 2004.
- LI J, REN N, LI B, ZHI Q, HE J. Anaerobic biohydrogen production from monosaccarides by a mixed microbial community culture. *Bioresource Technology*, v.99, p.6528-6537, 2008
- LI, J.; LI, B.; ZHU, G.; REN, N.; BO, L.; HE, J. Hydrogen production from diluted molases by anaerobic hydrogen producing bacteria in an anaerobic baffled reactor (ABR). *International Journal of Hydrogen Energy*, v.32, p.3274-3283, 2007.
- 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.
- LIANG, S.; MCDONALD, A.G.; COATS, E.R. Lactic acid production from potato peel waste by anaerobic sequencing batch fermentation using undefined mixed culture. *Waste Management*, v.45, p.51-56, 2015.
- LIN, C. Y.; LAY, C. H. Carbon/nitrogen-ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.29, p.41-45, 2004.
- LIN, C.N.; WU, S.Y.; CHANG, J.S.; CHANG, J.S. Biohydrogen production in threephase fluidized bed bioreactor using sewage sludge immobilized by ethylene-vinyl acetate copolymer. *Bioresource Technology*, v.100, p.3298-3301, 2009.
- MANTELATTO, P.E. Estudo do processo de cristalização de soluções impuras de sacarose de cana de açúcar por resfriamento. Dissertação (mestrado), São Carlos: Centro de ciências exatas e tecnologia, Programa de pós-graduação em Engenharia química da Universidade Federal de São Carlos-UFSCar, 2005. 235p.
- MARIAKAKIS, I.; MEYER, C.; STEINMETZ, H. Fermentative hydrogen production by molasses; Effect of hydraulic retention time, organic loading rate and microbial dynamics. In: Dragica Minic. *Hydrogen Energy – Challenges and Perspectives*. cap.5, p.121-148, 2012.
- MUÑOZ-PÁEZ, K.M.; RUIZ-ORDÁZ, N.; GARCÍA-MENA, J.; PONCE-NOYOLA, M.T.; RAMOS-VALDIVIA, A.C.; ROBLES-GONZÁLEZ, I.V.; VILLA-TANACA, L.; BARRERA-CORTÉS, J.; RINDERKNECHT-SEIJAS, N.; POGGI-VARALDO, H.M. Comparison of biohydrogen production in fluidized bed bioreactors at room temperature and 35°C. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.38, p.12570-12579, 2013.
- MUTTON, M.A.; ROSSETTO, R.; MUTTON, M.J.R. *Agricultural use of stillage*. In: Sugarcane Bioethanol. R&D for Productivity and Sustainability, v.1, p.423–440. São Paulo, Blucher. 2010.
- NATH, K.; DAS, D. Improvement of fermentative hydrogen production: various approaches. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.65, p.520–529, 2004.
- NEVES, M.F.; TROMBIN, V.G.A dimensão do setor Sucroenergético: mapeamento e quantificação da safra 2013/14. Ribeirão Preto: Markestrat, Fundase, FEA-RP/USP, 2014.
- NGOMA, L.; MASILELA, P.; OBAZU, F.; GRAY, V.M. The effect of temperature and effluent recycle rate on hydrogen production by undefined bacterial granules. *Bioresource Technology*, v.102, p.8986-8991, 2011.
- NICOLLELA, C.; VAN LOOSDRECHT, M.C.M.; HEIJNEN, J.J. Wastewater treatment with particulate biofilm reactors. *Journal of Biotechnology*, v.80, p.1-33, 2000.
- OBAZU, F.O.; NGOMA, L.; GRAY, V.M. Interrelationships between bioreactor volume, effluent recycle rate, temperature, pH, %H₂, hydrogen productivity and hydrogen yield with undefined bacterial cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.37, p.5579-5590, 2012.
- ONODERA, O.; 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.
- ORTEGA, F.S.; ROCHA, K.M.; ZAIAT, M.; PANDOLFELLI, V.C. Aplicação de espumas cerâmicas produzidas via "gelcasting" em biorreator para tratamento anaeróbio de águas residuárias. *Cerâmica*, v.47, p.199-203, 2001.
- O-THONG, S.; PRASERTSAN, P.; BIRKELANDD, 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.

- O-THONG, S.; HNIMAN, A.; PRASERTSAN, P.; IMAI, T. Biohydrogen production from cassava starch processing wastewater by thermophilic mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.36, p.3409-3416, 2011.
- PATTRA, S.; LAY, C.H.; LIN, C.Y.; O-THONG, S.; REUNGSANG, A. Performance and population analysis of hydrogen production from sugarcane juice by non-sterile continuous stirred tank reactor augmented with *Clostridium butyricum*. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.36, p.8697-8703, 2011.
- 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, p.6137-6145, 2013.
- PLANGKLANG, P.; REUNASANA, A.; PATTRA, S. Enhanced bio-hydrogen production from sugarcane juice by immobilized *Clostridium butyricum* on sugarcane bagasse. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.37, p.15525-15532, 2012.
- REIS, C.M. & SILVA, E.L. Effect of upflow velocity and hydraulic retention time in anaerobic fluidized-bed reactors used for hydrogen production. *Chemical Engineering Journal*, v.172, p.28-36, 2011.
- REIS, C.M.; CAROSIA, M.F.; SAKAMOTO, I.K.; VARESCHE, M.B.A.; SILVA, E.L. Evaluation of hydrogen and methane production from sugarcane in an anaerobic fluidized bed reactor. *International Journal of Hydrogen Energy, v.40, p.8498-8509, 2015.*
- 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.
- 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, 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.; GUO, W.; LIU, B.; CAO, G.; DING, J. Biological hydrogen production by dark fermentation: challenges and prospects towards scaled-up production. *Current Opinion in Biotechnology*, v.22, p.365-370, 2011.
- RENÓ, M.L.G.; OLMO, O.A.; PALACIO, J.C.E.; LORA, E.E.S.; VENTURINI, O.J. Sugarcane biorefineries: Case study applied to the Brazilian sugar-alcohol industry. *Energy Conversion and Management*, v.86, p.981-991, 2014.
- ROY, S.; GHOSH, S.; DAS, D. Improvement of hydrogen production with thermophilic mixed culture from rice spent wash of distillery industry. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.37, p.15867-15874, 2012.

- ROYCHOWDHURY, S.; COX, D.; LEVANDOWSKY, M. Production of hydrogen by microbial fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.13, p.407-410, 1988.
- ROSA, P.R.F.; SANTOS, S.C.; SILVA, E.L. Different ratios of carbon sources in the fermentation of cheese whey and glucose as substrates for hydrogen and ethanol production in continuous reactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.39, p.1288-1296, 2014.
- SÁ, L. R.V.; CAMMAROTA, M.C.; OLIVEIRA, T.C.; OLIVEIRA, E.M.M.; MATOS, A.; FERREIRA-LEITÃO, V.S. Pentoses, hexoses and glycerin as substrates for biohydrogen production: Na approach for Brazilian biofuel integration. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.38, p.2986-2997, 2013.
- SAADY, N.M.C. Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.38, p.13172-13191, 2013.
- SANTOS, S.C. Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidificado termofílico com vinhaça como substrato orgânico. Tese (doutorado) Escola de Engenharia de São Carlos, Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos-SP, 2014.
- SANTOS, S.C.; ROSA, P.R.F.; SAKAMOTO, I.K.; VARESCHE, M.B.A.; SILVA, E.L. Continuous thermophilic hydrogen production and microbial community analysis from anaerobic digestion of diluted sugar cane stillage. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.39, p.9000-9011, 2014a.
- SANTOS, S.C.; ROSA, P.R.F.; SAKAMOTO, I.K.; VARESCHE, M.B.A.; SILVA, E.L. Hydrogen production from diluted and raw sugarcane vinasse under thermophilic anaerobic conditions. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.39, p.9599-9610, 2014b.
- SANTOS, S.C.; ROSA, P.R.F.; SAKAMOTO, I.K.; VARESCHE, M.B.A.; SILVA, E.L. Organic loading rate impacto on biohydrogen production and microbial communities at anaerobic fluidized thermophilic bed reactors treating sugarcane stillage. *Bioresource Technology*, v.159, p.55-63, 2014c.
- SEARMSIRIMONGKOL, P.; RANGSUNVIGIT, P.; LEETHOCHAWALIT, M.; CHAVADEJ, S. Hydrogen production from alcohol distillery wastewater containing high potassium and sulfate using and anaerobic sequencing batch reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.36, p.12810-12821, 2011.
- SHIDA, G.M. Produção de hidrogênio e ácidos orgânicos por fermentação acidogênica em reator anaeróbio de leito fluidificado. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos-SP, 2008.
- SHIDA, G.M.; BARROS, A.B.; REIS, C.M.; AMORIM, E.L.C.; DAMIANOVIC, M.H.R.Z.; SILVA, E.L. Long-term stability of hydrogen and organic acids production in na anaerobic fluidized-bed reactor using heat treated anaerobic sludge inoculum. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.34, p.3679-3688, 2009.

- SHOW, K.Y.; LEE, D.J.; TAY, J.H.; LIN, C.Y.; CHANG, J.S. Biohydrogen production: Current perspectives and the way forward. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.37, p.15616-15631, 2012.
- SILVA, M.A.; GRIEBELER, N.P.; BORGES, L.C. Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.11, n.1, p.1108-114, 2007.
- SINGH, S.P.; SRIVASTAVA, S.C.; PANDEY, K.D. Hydrogen production by Rhodopseudomonas at the expense of vegetable starch, sugarcane juice and whey. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.19, n.5, p.437-440, 1994.
- SONG, H.; LEE, S.Y. Production of succinic acid by bacterial fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, v.39, p.352-361, 2006.
- SREELA-OR, C.; PLANGKLANG, P.; IMAI, T.; REUNGSANG, A. Co-digestion of food waste and sludge for hydrogen production by anaerobic mixed cultures: Statistical key factors optimization. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.36, p.14227-14237, 2011.
- SYDNEY, E.B.; LARROCHE, C.; NOVAK, A.C.; NOUAILLE, R.; SARMA, S.J.; BRAR, S.K.; LETTI, L.A.J.; SOCCOL, V.T.; SOCCOL, C.R. Economic process to produce biohydrogen and volatile fatty acids by a mixed culture using vinasse from sugarcane ethanol industry as nutrient source. *Bioresource Technology*, v.159, p.380-386, 2014.
- 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*, v.48, n.9, p.1114-1121, 2013.
- THOMPSON, L.J.; GRAY, V.M.; KALALA, B.; LINDSAY, D.; REYNOLDS, K.; HOLY, A. Biohydrogen production by *Enterobacter cloacae* and *Citrobacter freundii* in carrier induced granules. *Biotechnology Letters*. v.30, p.271-274, 2008.
- UENO, Y.; KAWAI, T.; SATO, S.; OTSUKA, S.; MORIMOTO, M. Biological production of hydrogen from celulose by natural anaerobic microflora. *Journal of Fermentation & Bioengineering*, v.79, p.395-397, 1995.
- UNICA. Fotografia do setor sucroenergético no Brasil. .Net, São Paulo, set. 2015. Disponível em: http://www.unica.com.br/documentos/documentos/cana-de-acucar/. Acesso em: 04/01/2016
- VALDEZ-VAZQUEZ, I.; POGGO-VARALDO, H.M. Hydrogen production by fermentative consortia. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, v.13, p.1000-1013, 2009.
- WAAL, A.; JIMÉNEZ-RUEDA, J.R.; BONOTTO, D.M.; BERTELLI, C.; HOFFMANN, H.M.; FO..HAG, E.; SANTILLI, M. Influence of the vinasse application in sugar cane fields in Patrocínio Paulista, São Paulo State, Brazil. WIT Transactions on Biomedicine and Health, v.14, 2009.

- 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, B.; LI, Y.; REN, N. Biohydrogen from molasses with ethanol-type fermentation: Effect of hydraulic retention time. *International journal of hydrogen energy*, v.38, p.4361-4367, 2013.
- WANG, G.; MU, Y.; YU, H. Response surface analysis to evaluate the influence of pH, temperature and substrate concentration on the acidogenesis of sucrose-rich wastewater. *Biochemical Engineering Journal*, v.23, p.175-184, 2005.
- WANG, W.; XIE, L.; CHEN, J.; LUO, G.; ZHOU, Q. Biohydrogen and metane production by co-digestion of cassava stillage and excess sludge under thermophilic condition. *Bioresouce Technology*, v.102, p.3833-3839, 2011.
- WANG, W.W.J. Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. International Journal of Hydrogen Energy, v.34, p.799-811, 2009.
- WANG, X.; JIN, B. Process optimization of hydrogen production from molasses by a newly isolated *Clostridium butyricum* W5. Journal of Bioscience and Bioengineering, v.107, p.138-144, 2009.
- WHITEMAN, J.K.; GUEGUIM KANA, E.B. Comparative assessment of the artificial neural network and response surface modeling efficiencies for biohydrogen production on sugar cane molasses. BioEnergy Research, v.7, p.295-305, 2014.
- WILKIE, A. C.; RIEDESEL, K. J.; OWENS, J. M. Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks. *Biomass and Bioenergy*, n.19, p.63-102, 2000.
- WU, S.Y.; LIN, C.N.; CHANG, J.S.; LEE, K.S.; LIN, P.J. Hydrogen production with immobilized sewage sludge in three-phase fluidized-bed bioreactor. *Biotechnology Progress*, v.19, p.828-832, 2003.
- WU, K.J.; CHANG, C.F.; CHANG, J.S. Simultaneous production of hydrogen and bioethanol with fluidized-bed and packed-bed bioreactors containing immobilized anaerobic sludge. *Process Biochemistry*, v.42, p.1165-1171, 2007.
- XIA, Y.; CAI, L.; ZHANG, T.; FANG, H.H.P. Effects of substrate loading and cosubstrates on thermophilic anaerobic conversion of microcrystalline cellulose and microbial communities revealed using high-though put sequencing. *International Journal Hydrogen Energy*, v.37, p.13652-13659, 2012.
- YEOH, B. G. Two-phase anaerobic treatment of cane-molasses alcohol stillage. *Water Science and Technology*, v.36, n.6-7, p.441-448, 1997.
- ZHANG, H.; BRUNS, M.A.;LOGAN, B.E. Biological hydrogen production by *Clostridium acetobutylicum* in a unsaturated flow reactor. *Water Researched*, v.40, p.728-734, 2006.
- ZHANG, Z.P.; SHOW, K.L.: TAY, J.H.; LIANG, D.T.; LEE, D.J.; JIANG, W. J. Effect of hydraulic retention time on biohydrogen production and anaerobic microbial community. *Process Biochemistry*, v.41, p.2118-2123, 2006.

- ZHANG, Z.P.; TAY, J.H.; SHOW, K. L.; YAN, R.; LIANG, D.T.; LEE, D.F.; JIANG,
 W. J. Biohydrogen production in a granular activated carbon anaerobic fluidized bed reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.32, 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 in Environmental Science & Engineering*, v.7, p.143-150, 2013.