

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

LIVIA MARIA OTTAVIANO

Produção de hidrogênio em reator anaeróbico de leito fluidificado a partir de água  
residuária de soro de queijo em condição termófila

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos

2014

LIVIA MARIA OTTAVIANO

PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO EM REATOR ANAERÓBIO DE LEITO  
FLUIDIFICADO A PARTIR DE ÁGUA RESIDUÁRIA DE SORO DE QUEIJO EM  
CONDIÇÃO TERMÓFILA

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  
2014

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

089p Ottaviano, Livia Maria  
Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito  
fluidificado a partir de água residuária de soro de  
queijo em condição termófila / Livia Maria Ottaviano;  
orientador Edson Luiz Silva. São Carlos, 2014.

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, 2014.

1. Produção de hidrogênio. 2. Reator anaeróbio de  
leito fluidificado. 3. Soro de queijo. 4. Condição  
termofílica. 5. Água residuária real. I. Título.

## FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Bacharel **LÍVIA MARIA OTTAVIANNO**.

Título da dissertação: "Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidificado a partir de água residuária de soro de queijo em condição termófila".

Data da defesa: 15/07/2014

### Comissão Julgadora:

### Resultado:

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

Aprovada.

Profa. Dra. **Simone Damasceno Gomes**  
(Universidade Estadual do Oeste do Paraná/UNIOESTE)

Aprovada

Prof. Dr. **Antonio José Gonçalves da Cruz**  
(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

Aprovada

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. Titular **Denis Vinicius Coury**

## DEDICATÓRIA

À Deus:

*“A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas vezes e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável.”*

Galileu Galilei

Aos meus pais Olga e Marcio e minha irmã Luciana:

Por todo o amor e ensinamentos.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre guiar meus passos, por mais essa realização e por sempre colocar pessoas especiais em meu caminho durante toda minha vida.

Ao professor Edson Luiz Silva, por todos os conhecimentos transmitidos, toda a ajuda, apoio, dedicação, comprometimento e incentivo com que me ajudou a realizar este trabalho.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro concedido por meio de bolsa de mestrado.

Às professoras Dr<sup>a</sup>. Maria Bernadete Amâncio Varesche e Dr<sup>a</sup>. Mônica Lopes Aguiar pelas palavras e observações no exame de qualificação.

Aos membros da comissão julgadora, Dr<sup>a</sup> Simone Damasceno Gomes e Dr Antônio José Gonçalves da Cruz, agradeço as considerações incorporadas neste trabalho.

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento por todo o conhecimento passado.

À Laboratorista Msc. Maria Ângela Adorno por todo auxílio, disponibilidade e paciência durante as análises. À todas as funcionárias da secretaria do Departamento de Engenharia Hidráulica e Saneamento por todo o suporte necessário. Aos funcionários do Departamento de Engenharia Química, da Universidade Federal de São Carlos por proporcionarem condições para a realização da etapa experimental desse trabalho. Em especial ao Oscar, por toda dedicação, paciência e disponibilidade diante de qualquer situação.

À todos os amigos do Laboratório de Controle Ambiental II, do Departamento de Engenharia Química, da Universidade Federal de São Carlos (Carolina, Cristiane, Filipe, Janaína, Helbert, Lívia Botta, Mariana, Morgana, Paula e Samantha), que compartilharam de seus conhecimentos e experiências. Em especial à Carolina, Cristiane, Janaína, Morgana, Mariana, Paula e Samantha, por todo companheirismo, amizade, superações, histórias e momentos compartilhados. Muito obrigada por me acolherem e por todas as palavras de conforto em momentos difíceis.

À minha companheira de casa, de momentos bons e ruins, de desabafos e muito companheirismo, Carolina. À minha outra companheira de pouco tempo, Ana Paula Trevisan pela torcida.

Aos meus eternos amigos de Irati, que embora muito distante, sempre torceram e me apoiaram desde o início. Em especial Ana Paula, Bruna e Victória, pelos conselhos e amizade. À Simone, minha amiga e irmã de coração, por todas as palavras de incentivo, apoio, por sempre me aconselhar, me ouvir e acreditar que esse dia chegaria. Aos meus amigos de Santa Rita que sempre acreditaram em mim e torciam muito para este momento. Em especial à minha amiga-irmã Adriélla, pela amizade de toda a vida.

Aos meus familiares, por todo apoio, incentivo e torcida. Ao meu pai, a pessoa que mais torceu e apoiou este momento, que se doou inteiro e renunciou de seus sonhos, para que, muitas vezes, pudesse realizar os meus, por proporcionar educação e estudo. Sempre serei grata a você. À minha mãe, que sempre com palavras de carinho me motivou a chegar a este momento bem, mostrando o caminho a ser seguido, por todo amor, momentos de incentivo, compreensão e firmeza. À minha companheira, minha irmã Luciana, por todos os ensinamentos e conselhos, pelo amor verdadeiro e por ser a pessoa na qual me espelho. Obrigada por nos trazer o melhor presente que poderíamos ganhar... Davi.

Ao Edson, que sempre me incentivou a prosseguir a jornada sem medos, fossem quais os obstáculos, pela motivação desde o início, por torcer, ouvir e me aconselhar, pela paciência, por dividir todos os momentos comigo, e sempre estar ao meu lado para me socorrer.

À todos aqueles não citados, que de alguma forma fizeram parte desse momento.  
Meus sinceros agradecimentos.

*“Ninguém pode construir em teu lugar as pontes que precisarás passar para atravessar o rio da vida. Ninguém, exceto tu, só tu. Existem, por certo, atalhos sem números, e pontes, e semideus que se oferecerão para levar-te além do rio; mas isso te custaria a tua própria pessoa; tu te hipotecarias e te perderias. Existe no mundo um único caminho por onde só tu podes passar. Onde leva? Não perguntes, segue-o!”*

Friedrich Nietzsche

## RESUMO

OTTAVIANO, L. M. **Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidificado a partir de soro de queijo em condição termófila**. 2014. 120f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

O hidrogênio é estudado como alternativa ao uso de combustíveis fósseis para geração de energia, uma vez que é um combustível renovável. Entre os processos de produção de hidrogênio destaca-se o processo fermentativo que possibilita unir tratamento de efluente e geração de energia. Uma das alternativas para esta produção é a utilização do reator anaeróbio de leito fluidificado (RALF). Dentre os resíduos industriais que podem ser utilizados para a produção de hidrogênio está o soro de queijo que, se descartado incorretamente, pode causar danos ao meio ambiente. Neste sentido, o presente estudo teve como principal objetivo avaliar a capacidade de produção contínua de hidrogênio, sob condições termófilas (55°C), a partir de diferentes concentrações de soro de queijo e tempos de detenção hidráulica (TDH) em RALF. Foram utilizados dois reatores, denominados R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub>, no qual R<sub>1</sub> manteve-se com concentração fixa de 5 g<sub>DQO</sub>.L<sup>-1</sup>, com variações de TDH de 8, 6, 4, 2, 1 e 0,5 hora e em R<sub>2</sub> o TDH manteve-se fixo em 6 horas e variações de concentrações de 3, 5, 7 e 10 g<sub>DQO</sub>.L<sup>-1</sup>. Foi observado em R<sub>1</sub> o comportamento de elevação de produção volumétrica de H<sub>2</sub> (PVH) a partir da diminuição do TDH. A máxima PVH obtida foi de 2,9 L.h<sup>-1</sup>.L<sup>-1</sup> em R<sub>1</sub> para o TDH de 0,5 hora. No entanto, verificou-se a diminuição do rendimento de hidrogênio (HY) com a aplicação de TDHs reduzidos, alcançando valor máximo de 3,3 molH<sub>2</sub>.mol<sup>-1</sup> lactose para o TDH de 4 horas. Para R<sub>2</sub>, o valor máximo de PVH de 0,854 L.h<sup>-1</sup>.L<sup>-1</sup> para concentração de substrato de 7 g.L<sup>-1</sup>. Já para HY, o maior valor encontrado foi de 2,6 molH<sub>2</sub>.mol<sup>-1</sup> lactose para a concentração de substrato de 3 g.L<sup>-1</sup>, uma vez que o aumento da concentração causou a diminuição de HY. O conteúdo de hidrogênio no biogás manteve-se na faixa de 48,2-54,2% e 39,8-48,4% para R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub>, respectivamente. Em ambos os reatores, os principais metabólitos encontrados nos efluentes foram ácido acético e ácido butírico.

Palavras-chave: Produção de hidrogênio, reator anaeróbio de leito fluidificado, soro de queijo, condição termofílica, água residuária real.

## ABSTRACT

OTTAVIANO, L. M. **Hydrogen production in anaerobic fluidized bed reactor from cheese whey wastewater under thermophilic condition.** 2014. 120f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

Hydrogen is studied as an alternative to fossil fuels for power generation, since it is a renewable fuel. Between the processes of hydrogen production stands out the fermentation process that allows to merge wastewater treatment and power generation. An alternative to this production is the use of anaerobic fluidized bed reactor (AFBR). Among the industrial wastes can be used for hydrogen production is cheese whey that if improperly discarded, may cause damage to the environment. In this sense, the present study aimed to evaluate the ability of continuous hydrogen production under thermophilic conditions (55°C), from different concentrations of cheese whey and hydraulic retention time (HRT) in AFBR. Two reactors were used, denominated R<sub>1</sub> and R<sub>2</sub>, in which R<sub>1</sub> was maintained at a fixed concentration of 5gCOD.L<sup>-1</sup> with variations in HRT of 8, 6, 4, 2, 1 and 0.5 hour and R<sub>2</sub> kept fixed HRT at 6 hours, and changes in concentration of 3, 5, 7 and 10 gCOD.L<sup>-1</sup>. In R<sub>1</sub>, it was observed a volumetric H<sub>2</sub> production (HPR) increase behavior from the HRT decrease. The maximum HPR obtained was 2.9 L.h<sup>-1</sup>.L<sup>-1</sup> at HRT of 0.5 hour. However, there was a decrease in H<sub>2</sub> yield (HY) with the application of reduce HRT, reaching maximum value of 3.3 molH<sub>2</sub>.mol<sup>-1</sup> lactose at HRT of 4 hours. In R<sub>2</sub>, the maximum value of HPR was 0,854 L.h<sup>-1</sup>.L<sup>-1</sup> for substrate concentration of 7 gCOD.L<sup>-1</sup>. The maximum HY obtained was 2.6 molH<sub>2</sub>.mol<sup>-1</sup> lactose for concentration of 3 gCOD.L<sup>-1</sup>, once the value of HY decrease behavior from the concentration of cheese whey increase. The H<sub>2</sub> content in biogas kept in range of 48.2-54.2% and 39.8-48.4% for R<sub>1</sub> and R<sub>2</sub>, respectively. In both reactors, the main metabolites found were acetic and butyric acids.

Key-words: Hydrogen production, anaerobic fluidized bed reactor, cheese whey, thermophilic condition, real wastewater.

## LISTA DE FIGURA

Figura 3.1	Classificação da produção biológica de hidrogênio.....	9
Figura 3.2	Esquema comparativo dos três principais tipos tecnológicos de bioprodução de hidrogênio.....	10
Figura 3.3	Ilustração das etapas durante a degradação anaeróbia.....	11
Figura 3.4	Diagrama das vias metabólicas envolvidas na fermentação de H <sub>2</sub> .....	32
Figura 4.1	Esquema ilustrativo da instalação do reator anaeróbio de leito fluidificado.....	43
Figura 4.2	Partículas de argila expandida tratadas para utilização como suporte para aderência das populações microbianas.....	44
Figura 5.1	Comportamento da concentração média de carboidrato afluente e efluente, e eficiência de conversão de carboidratos em função do TDH.....	50
Figura 5.2	Comportamento da concentração média de carboidrato afluente e efluente, e a conversão de carboidratos em função da concentração.....	51
Figura 5.3	Valores de DQO afluente, efluente e eficiência de remoção em R <sub>1</sub> .....	53
Figura 5.4	Valores de DQO afluente, efluente e eficiência de remoção em R <sub>2</sub> .....	53
Figura 5.5	Variação do pH em função do TDH para R <sub>1</sub> .....	55
Figura 5.6	Variação do pH em função da concentração para R <sub>2</sub> .....	56
Figura 5.7	Concentrações médias de sólidos suspensos fixos e voláteis (efluentes) e respectivas porcentagens verificadas ao longo das fases operacionais de R <sub>1</sub> .....	58
Figura 5.8	Concentrações médias de sólidos suspensos fixos e voláteis (efluentes) e respectivas porcentagens verificadas ao longo das fases operacionais de R <sub>2</sub> .....	59
Figura 5.9	Taxa de carregamento orgânico (TCO) aplicada e rendimento de H <sub>2</sub> em R <sub>1</sub> ao longo da diminuição do tempo de detenção hidráulico.....	61
Figura 5.10	Taxa de carregamento orgânico (TCO) aplicada e rendimento de H <sub>2</sub> em R <sub>2</sub> ao longo do aumento da concentração de substrato.....	61
Figura 5.11	Produção volumétrica de H <sub>2</sub> em R <sub>1</sub> ao longo do aumento do TDH.....	64
Figura 5.12	Produção volumétrica de H <sub>2</sub> em R <sub>2</sub> ao longo do aumento da concentração de substrato.....	65

Figura 5.13	Conteúdo médio de H <sub>2</sub> no biogás em função do TDH em R <sub>1</sub> .....	66
Figura 5.14	Conteúdo médio de H <sub>2</sub> em função da concentração de soro de queijo em R <sub>2</sub> .....	67
Figura 5.15	Ácidos orgânicos (%) presentes nos efluentes do reator anaeróbio de leite fluidificado (R <sub>1</sub> ) ao longo da diminuição do tempo de detenção hidráulica (TDH).....	69
Figura 5.16	Ácidos orgânicos (%) presentes nos efluentes do reator anaeróbio de leite fluidificado termofílico (R <sub>2</sub> ) ao longo do aumento da concentração de substrato.....	72

## LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1	Oferta interna de energia.....	6
Tabela 3.2	Poder calorífico de diferentes combustíveis.....	6
Tabela 3.3	Métodos de produção de hidrogênio.....	7
Tabela 3.4	Utilização de diferentes configurações de reatores anaeróbios para produção de H <sub>2</sub> .....	13
Tabela 3.5	Efeito da TCO na produção fermentativa de hidrogênio.....	21
Tabela 3.6	Volume de produção nacional total de leite.....	23
Tabela 3.7	Produção de volume de soro de queijo por tipo de leite processado.....	24
Tabela 3.8	Matérias mineiras contidas no soro de queijo (100 g) .....	25
Tabela 3.9	Culturas de bactérias utilizadas para produção fermentativa de hidrogênio.....	36
Tabela 4.1	Especificações do soro de queijo em pó.....	41
Tabela 4.2	Informação nutricional (porção de 100 gramas).....	41
Tabela 4.3	Nutrientes adicionados às águas residuárias.....	42
Tabela 4.4	Características físicas da argila expandida.....	44
Tabela 4.5	Dimensão, densidade e velocidade mínima de fluidização para as partículas de argila expandida.....	47
Tabela 4.6	Condições operacionais impostas ao RALF termofílico (R <sub>1</sub> ) para a produção de H <sub>2</sub> a partir de soro de queijo, a 5000 mg DQO.L <sup>-1</sup> , e taxas de carregamento orgânico (TCO) aplicadas.....	48
Tabela 4.7	Condições operacionais impostas ao RALF termofílico (R <sub>2</sub> ) para a produção de H <sub>2</sub> a partir de soro de queijo, com TDH de 6 horas, e taxas de carregamento orgânico (TCO) aplicadas.....	48
Tabela 4.8	Análises realizadas em amostras coletadas nas fases operacionais de R <sub>1</sub> e R <sub>2</sub> .....	49
Tabela 5.1	Valores médios obtidos de conversão de lactose para R <sub>1</sub> e R <sub>2</sub> .....	51
Tabela 5.2	Concentrações médias afluentes, efluentes e eficiência de remoção de DQO em R <sub>1</sub> e R <sub>2</sub> .....	54
Tabela 5.3	Valores médios de pH durante as fases operacionais de R <sub>1</sub> e R <sub>2</sub> .....	56

Tabela 5.4	Concentração ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) de sólidos suspensos voláteis nos efluentes de $R_1$ e $R_2$ ao longo da diminuição do TDH e aumento da concentração de substrato.....	57
Tabela 5.5	Valores médios de rendimento de $\text{H}_2$ (HY) para as diferentes taxas de carregamento orgânico e TDH aplicados ao longo das fases operacionais de $R_1$ e $R_2$ .....	60
Tabela 5.6	Comparação de valores de rendimentos de hidrogênio obtidos utilizando soro de queijo como substrato.....	63
Tabela 5.7	Valores médios produção volumétrica de $\text{H}_2$ (PVH) para as diferentes taxas de carregamento orgânico e TDH aplicados ao longo das fases operacionais de $R_1$ e $R_2$ .....	65
Tabela 5.8	Valores médios do conteúdo de $\text{H}_2$ no biogás para $R_1$ e $R_2$ .....	68
Tabela 5.9	Valores médios de ácidos orgânicos verificados ( $\text{mg.L}^{-1}$ e porcentagem) para as diferentes TDH aplicados em $R_1$ .....	71
Tabela 5.10	Valores de rendimentos de hidrogênio (HY) e produção volumétrica de hidrogênio (PVH) obtidos em relação às concentrações de ácidos orgânicos observados em $R_1$ .....	72
Tabela 5.11	Valores médios de ácidos orgânicos verificados ( $\text{mg.L}^{-1}$ e porcentagem) para as diferentes concentrações aplicadas em $R_2$ .....	73
Tabela 5.12	Valores de rendimentos de hidrogênio (HY) e produção volumétrica de hidrogênio (PVH) obtidos em relação às concentrações de ácidos orgânicos observados em $R_2$ .....	74
Tabela 5.13	Balanço de carbono em função de $\text{DQO}_t$ e $\text{DQO}_m$ em $R_1$ .....	75
Tabela 5.14	Balanço de carbono em função de $\text{DQO}_t$ e $\text{DQO}_m$ em $R_2$ .....	75
Tabela 5.15	Resumo dos principais valores obtidos para HY, PVH, $\% \text{H}_2$ , remoção de DQO e consumo de carboidrato em $R_1$ e $R_2$ .....	77

**LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS**

Atm	Atmosfera
$C_6H_{12}O_6$	Glicose
$C_6H_{12}O_6$	Galactose
$C_{12}H_{22}O_{11}$	Lactose
$CH_3COOH$	Ácido Acético
$CH_3CH_2CH_2COOH$	Ácido Butírico
$CO_2$	Dióxido de Carbono
CSTR	Reator Contínuo de Tanque Agitado
DQO	Demanda Química de Oxigênio
EtOH	Etanol
$H_2$	Hidrogênio
$H_2O$	Água
$H_2SO_4$	Ácido Sulfúrico
HAc	Ácido Acético
HBr	Ácido Butírico
HCl	Ácido Clorídrico
HLa	Ácido Lático
HPr	Ácido Propiônico
HY	Rendimento de produção de hidrogênio
LCA	Laboratório de Controle Ambiental
LPB	Laboratório de Processos Biológicos
$O_2$	Oxigênio
PVH	Produção Volumétrica de Hidrogênio
RALF	Reator anaeróbico de leito fluidificado
SST	Sólidos Suspensos Totais
SSV	Sólidos Suspensos Voláteis
TCO	Taxa de Carregamento Orgânico
TDH	Tempo de detenção hidráulica
UASB	Reator Anaeróbico de Manta de Lodo
$V_{mf}$	Velocidade Mínima de Fluidificação

## SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	v
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	vii
SUMÁRIO.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
2.1. Objetivo geral .....	4
2.2. Objetivos específicos.....	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1. Hidrogênio como combustível.....	5
3.2. Produção biológica de hidrogênio.....	7
3.2.1. Digestão anaeróbia.....	10
3.3. Reatores utilizados para a produção de hidrogênio.....	12
3.3.1. Reator anaeróbio de leito fluidificado (RALF).....	13
3.3.1.1. Materiais suporte para aderência microbiana.....	17
3.4. Parâmetros importantes para a produção de hidrogênio em reatores anaeróbios.....	18
3.4.1. pH.....	18
3.4.2. Substrato.....	19
3.4.2.1. Soro de queijo.....	22
3.4.2.2. Rotas fermentativas.....	25
3.4.3. Tempo de detenção hidráulica (TDH).....	27
3.4.4. Temperatura.....	30
3.4.5. Inóculo.....	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1. Inóculo.....	40
4.2. Águas residuárias.....	40
4.3. Operação dos reatores anaeróbios de leito fluidificado.....	42

4.4.	Métodos analíticos.....	46
4.5.	Cálculos dos principais parâmetros.....	48
5.	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	49
5.1.	Conversão de carboidratos.....	49
5.2.	Remoção da demanda química de oxigênio.....	52
5.3.	Variação de pH.....	55
5.4.	Sólidos suspensos.....	57
5.5.	Produção de hidrogênio.....	59
5.5.1.	Rendimento de hidrogênio (HY).....	59
5.5.2.	Produção volumétrica de hidrogênio (PVH).....	63
5.5.3.	Conteúdo de hidrogênio no biogás.....	66
5.6.	Ácidos orgânicos verificados no efluentes.....	68
5.7	Balanço de carbono.....	74
5.8	Discussões sobre as melhores condições operacionais para a produção de hidrogênio.....	76
6.	<b>CONCLUSÃO</b> .....	78
7.	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	80

## INTRODUÇÃO

O fornecimento de energia atual depende, em sua maioria, de combustíveis fósseis. Entretanto seu uso excessivo resultou em um aumento na concentração de dióxido de carbono na atmosfera, considerado o principal gás do efeito estufa, contribuindo com grande parte das alterações climáticas, grande preocupação de hoje e gerações futuras. Diante da crescente necessidade por energia, a fim de atenuar a emissão de gases do efeito estufa e substituir os combustíveis fósseis, fontes alternativas de combustíveis vêm sendo exploradas (MOHAMMADI et al., 2012; BAKONYI et al., 2014). O hidrogênio é considerado um combustível limpo, pois é liberado apenas água em sua combustão, de alto conteúdo energético, além de ser o elemento de maior conteúdo energético por unidade de massa ( $142 \text{ kJ.g}^{-1}$ ), podendo ainda ser transportado para uso industrial (DAS e VERZIROGLU, 2008).

Os métodos de produção de hidrogênio podem ser divididos em função de três principais matérias-primas utilizadas: combustíveis fósseis, água e biomassa. Os principais processos incluem a eletrólise da água (ZHOU et al., 2004), reforma termocatalítica de compostos orgânicos ricos em hidrogênio (HAMEED e GONDAL, 2005) e processos biológicos (LEVIN; PITT e LOVE, 2004). A produção biológica tem atraído cada vez mais a atenção de pesquisadores devido ao seu baixo custo, a ampla diversidade de micro-organismos capazes de produzir  $\text{H}_2$  e a possibilidade de se utilizar os mais variados substratos (NATH e DAS, 2004; SHOW; LEE e CHANG, 2011).

A rota mais vantajosa de produzir hidrogênio biológico é por processo fermentativo, por possuir menor custo de implantação e apresentar maiores velocidades de produção de hidrogênio, além de utilizar materiais de fácil obtenção, diminuindo os problemas relacionados ao descarte de rejeitos. Estes processos podem ser utilizados em locais com fonte acessível do substrato ou onde a biomassa ou resíduos estão disponíveis, o que conduz a redução de custos de energia e transporte da matéria-prima (KOTAY e DAS, 2008). Esta tecnologia tem se tornado atrativa também devido, além de produção de biogás ( $\text{H}_2$ ), à produção de substâncias de maior valor agregado, como os ácidos acético, láctico, succínico e butírico (SHOW; LEE e CHANG, 2011).

Diversos estudos relatam sobre a otimização de condições para a produção de hidrogênio por fermentação, entretanto há divergências devido à gama de condições aplicadas. O tipo de substrato é um parâmetro de grande importância em termos de rendimento, entretanto, a maioria dos estudos utilizaram substratos simples para

obtenção de hidrogênio (CHINELLATO et al., 2013). Como substratos, diversos tipos de resíduos industriais e domésticos, ricos em matéria carbonácea, podem ser utilizados durante o processo de produção de hidrogênio (AZBAR et al., 2009b; REIS, 2010).

O soro de queijo é um sub-produto do leite, produzido em todo o território brasileiro, obtido durante a produção de queijo ou de caseína. Consiste em 80-90% do volume do leite utilizado para a produção de queijo e cerca de 50% dos nutrientes do leite que o originou (proteínas solúveis, lactose, vitamina e minerais) (ROSA, 2010). O soro de queijo é considerado um efluente altamente poluente devido a sua elevada carga orgânica e volume gerado, o que representa um impacto ambiental significativo para a indústria de laticínios. Em escala mundial, apenas 50% do soro de queijo produzido é utilizado (CARVALHO; PRAZERES e RIVAS, 2013). Devido ao alto volume gerado, é importante buscar alternativas para a redução da poluição causada e o alto custo de seu tratamento. O soro de queijo possui composição nutricional apropriada para o metabolismo de diversos micro-organismos sendo, portanto ideal para o uso em fermentação.

Dentre os reatores anaeróbios de alta taxa utilizados para a produção biológica de hidrogênio, há o reator anaeróbio de leito fluidificado (RALF) (BARROS e SILVA, 2012). O RALF é um sistema de tratamento biológico de efluentes de baixo TDH e alta eficiência (SHOW et al., 2012), que utilizam o princípio da fluidificação para promover transferência de massa entre o líquido e os micro-organismos que degradam a matéria orgânica (RAJESHWARI et al., 2000). O sistema possui como vantagem em relação a outros sistemas a maior área específica do sólido exposta ao fluido, favorecendo as transferências de calor e massa e altas velocidades de reação, quando comparadas ao leito fixo (SHIDA, 2008).

Um dos desafios mais importantes para manter a produção de hidrogênio em um reator otimizado para fermentação, é evitar o crescimento de bactérias consumidoras de H<sub>2</sub>. A fim de conter essas bactérias há, além do tratamento do inóculo, a otimização de parâmetros do processo, como concentração de substrato usado, e condições operacionais do reator, como TDH, temperatura e pH (CHINELLATO et al., 2013).

Embora a maioria dos estudos realizados utilizem condições mesófilas (30-40°C) para produção de hidrogênio, o RALF pode ser operado também sob condições termófilas (50-60°C), sendo esta considerada mais favorável para a produção de H<sub>2</sub> (SHIN; YOUN e KIM, 2004; VALDEZ-VAZQUEZ et al., 2005). Desta forma, este trabalho teve como objetivo estabelecer condições para a produção de hidrogênio por

fermentação em reator anaeróbio de leito fluidificado em condições termofílicas (55°C), utilizando como substrato soro de queijo.

## **CAPÍTULO 2**

### **OBJETIVOS**

#### **2.1. Objetivo Geral**

O objetivo principal deste trabalho é avaliar a produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidificado utilizando como substrato soro de queijo, em condições termófilas (55°C).

#### **2.2. Objetivos Específicos**

Como objetivos específicos, avaliou-se:

- a influência do tempo de detenção hidráulica (TDH) de 8, 6, 4, 2, 1 e 0,5 hora, com concentração de soro de queijo fixa de 5000 mg<sub>DQO</sub>.L<sup>-1</sup> na produção de hidrogênio.
- o efeito da concentração de soro de queijo, com DQO variando de 3000 a 10000 mg<sub>DQO</sub>.L<sup>-1</sup> em TDH fixo de 6 horas na produção de hidrogênio

## CAPÍTULO 3

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Hidrogênio como combustível

A energia é um elemento imprescindível nas interações entre meio ambiente e sociedade, sendo considerada essencial para o desenvolvimento econômico sustentável. As necessidades globais de energia são, em sua maioria, dependentes de combustíveis fósseis (ANDRADE, 2007), contudo, sabe-se que as reservas desses combustíveis são escassas, e que compostos geram como produto de sua combustão substâncias potencializadoras do efeito estufa. Logo, a percepção de que as reservas de combustíveis fósseis são limitadas e de seus efeitos adversos ao meio ambiente, têm nos forçado a investigar fontes alternativas de energia que causem menor impacto (BEAUPREZ; MEY e SOETAERT, 2010).

No Brasil, segundo dados do Ministério de Minas e Energia (2012), cerca de 42,4% da demanda total de energia no país em 2012 foi de fontes renováveis, contra apenas 8,2% nos países mais ricos, enquanto que a média mundial é de 13,2%. Na tabela 3.1 é apresentada a distribuição da oferta de energia nos anos de 2011 e 2012. O decréscimo na participação das fontes renováveis de energia no último ano se deu devido à queda nos produtos de cana de açúcar. A maior oferta de energia renovável no Brasil vem dos produtos de cana de açúcar, seguidos de energia hidráulica e eletricidade.

O hidrogênio, ao contrário dos combustíveis derivados de petróleo, é uma fonte limpa de energia, já que durante sua combustão há apenas a liberação de água (SUZUKI, 1982; MOHAMMADI et al, 2012). É o elemento mais abundante na Terra e possui ainda o maior conteúdo energético por unidade de massa ( $142 \text{ kJ.g}^{-1}$ ), uma vez que é o elemento mais leve e não tem átomos de carbono (NATH e DAS, 2004; BARROS e SILVA, 2012). A energia liberada durante a reação do  $\text{H}_2$  é aproximadamente 2,75 vezes o poder de combustão de um hidrocarboneto, conforme apresentado na tabela 3.2 (SANTOS e SANTOS, 2007).

Tabela 3.1 – Oferta interna de energia

Especificação	Estrutura %	
	2011	2012
<b>Não renovável</b>	<b>56,0</b>	<b>57,6</b>
Petróleo e derivados	38,6	39,2
Gás natural	10,2	11,5
Carvão mineral e derivados	5,7	5,4
Urânio (U <sub>3</sub> O <sub>8</sub> ) e derivados	1,5	1,5
<b>Renovável</b>	<b>44,0</b>	<b>42,4</b>
Hidráulica e eletricidade	14,7	13,8
Lenha e carvão vegetal	9,5	9,1
Derivados da cana	15,7	15,4
Outras renováveis	4,1	4,1

Fonte: Ministério de Minas e Energia (2012)

Tabela 3.2 – Poder calorífico de diferentes combustíveis

Combustível	Poder calorífico superior	Poder calorífico inferior
	(25°C e 1 atm)	(25°C e 1 atm)
	(kJ.g <sup>-1</sup> )	(kJ.g <sup>-1</sup> )
Hidrogênio	141,86	119,93
Metano	55,53	50,02
Propano	50,36	45,6
Gasolina	47,5	44,5
Gasóleo	44,8	42,5
Metanol	19,96	18,05

Fonte: SANTOS e SANTOS, 2007.

A maior utilização do hidrogênio é como reagente das indústrias químicas e petroquímicas para a produção de fertilizantes (50%), seguida pelo tratamento de petróleo bruto (37%) (DAS e VEZIROGLU, 2008; KOTAY e DAS, 2008). Além desses processos, o hidrogênio também é utilizado como reagente nos processos de hidrogenação, como combustível para motores de foguete e como fluido de refrigeração em geradores elétricos (DAS e VEZIROGLU, 2001). Os métodos de produção de

hidrogênio podem ser divididos em função de três principais matérias-primas utilizadas: combustíveis fósseis, água e biomassa. Na tabela 3.3 são apresentados alguns dos processos mais significativos (SOUZA, 2009).

Tabela 3.3: Métodos de produção de hidrogênio

<b>Matérias-primas</b>	<b>Métodos</b>
Combustíveis fósseis	Reforma a vapor do gás natural
	Oxidação parcial de hidrocarbonetos pesados
	Gaseificação do carvão
Água	Eletrólise da água
	Processos foto-eletróquímicos
	Processos termoquímicos
Biomassa	Processos biológicos
	Gaseificação da biomassa
	Reforma a vapor do etanol
	Reforma em fase líquida

Fonte: SOUZA (2009)

Os processos biológicos possuem como vantagem o uso de diversos substratos, e sua ampla diversidade de micro-organismos capazes de produzir H<sub>2</sub> (NATH e DAS, 2004; SHOW; LEE e CHANG, 2011). Além disso, estes processos são adequados para produção descentralizada de energia em instalações de pequena escala, em locais onde a biomassa ou os resíduos estão disponíveis, evitando assim custos adicionais com transportes (KOTAY e DAS, 2008).

### **3.2. Produção biológica de hidrogênio**

A produção biológica de hidrogênio torna-se mais vantajosa em relação aos processos convencionais devido à capacidade dos micro-organismos em selecionar seu substrato, mesmo quando este se encontra em uma mistura de outros compostos. Portanto, não há necessidade de purificar ou isolar o substrato limitante do processo, havendo menor necessidade de tratamentos químicos (NEVES, 2009).

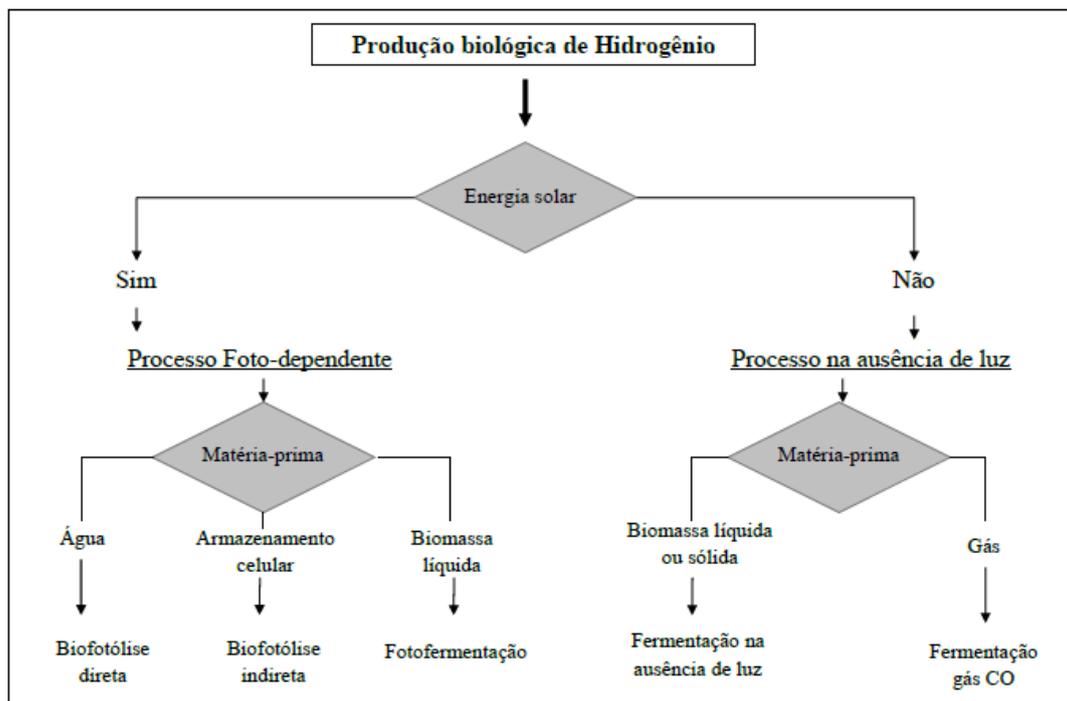
Estes processos podem ser utilizados em locais com fonte acessível do substrato ou onde a biomassa ou resíduos estão disponíveis, o que conduz à redução de custos de energia e transporte da matéria-prima. Os principais critérios para a seleção de matérias-primas são custo, conteúdo de hidratos de carbono, biodegradabilidade e disponibilidade. A matéria orgânica presente em águas residuárias pode representar matéria prima de baixo custo para compor este processo, visto que essas águas são abundantes e seu tratamento é obrigatório (LIN et al., 2012). O objetivo do desenvolvimento de processos biológicos de produção de hidrogênio é a aquisição de um maior rendimento de hidrogênio realizado por um método economicamente viável.

A produção biológica como um subproduto do metabolismo dos micro-organismos inclui tecnologias utilizando diversos recursos renováveis. Os principais processos biológicos são biofotólise da água por meio de algas (direta) e cianobactérias (indireta), foto-decomposição de compostos orgânicos e fermentação, realizada por bactérias fermentativas a partir de compostos orgânicos (SRIKANTH et al., 2009). Nas figuras 3.1 e 3.2 podem ser observadas as classificações e principais vantagens e desvantagens de alguns desses processos biológicos.

A biofotólise é definida como a ação da luz sobre um sistema biológico, resultando na dissociação de um substrato, geralmente água, para produzir hidrogênio. A equação geral que representa a biofotólise é:  $2 \text{H}_2\text{O} + \text{luz solar} \rightarrow 2 \text{H}_2 + \text{O}_2$  (GOMES et al., 2012).

Na digestão anaeróbia de açúcares, um dos produtos finais é o ácido acético. A foto-fermentação pode ser empregada como segunda etapa do processo de dois estágios, no qual o substrato orgânico é convertido em  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2$  (SRIKANTH et al., 2009). As bactérias fotoheterotróficas púrpura não-sulfurosas são os micro-organismos empregados nos processos de foto-fermentação. Estas produzem  $\text{H}_2$  em um processo catalisado pela enzima nitrogenase, sob limitação de nitrogênio, utilizando energia luminosa e compostos reduzidos (ácidos orgânicos) (SEIFERT; WALIGORSKA e LANIECKI, 2010).

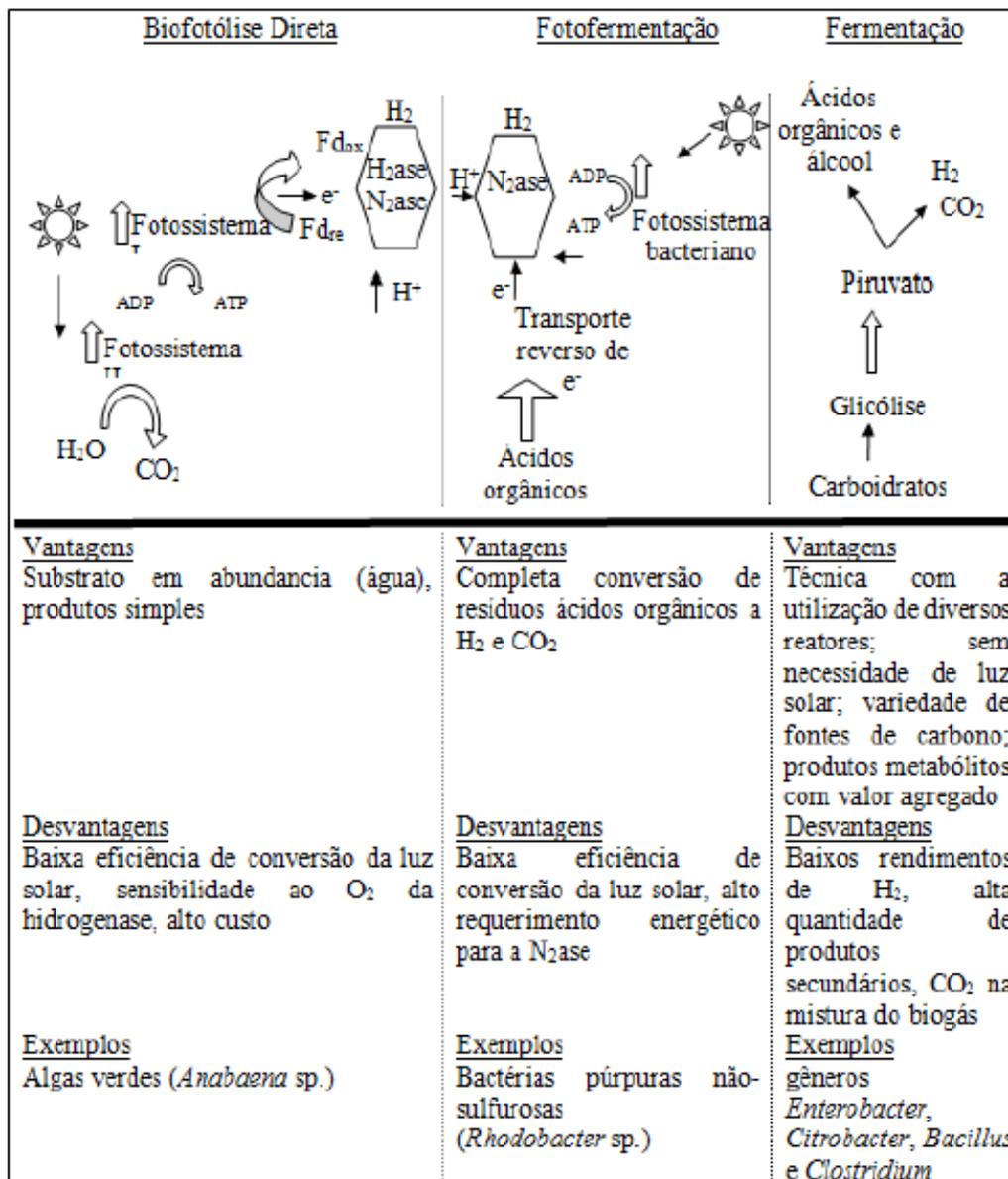
Figura 3.1: Classificação da produção biológica de hidrogênio



Fonte: Kim e Kim (2011) adaptado por Santos (2014)

A fermentação de resíduos orgânicos é um método ambientalmente correto para produzir  $H_2$ , que combina geração de biogás com o tratamento de resíduos. A produção por essa via se destaca por ser um processo simples, com altas velocidades na produção de hidrogênio e de baixo custo de implantação, sem a presença de luz. O substrato utilizado neste processo deve ser de fácil degradação biológica, baixo custo e com elevado teor de hidratos de carbono, como a glicose, lactose e sacarose. Na produção biológica via fermentação, o hidrogênio, ácidos voláteis e álcoois são obtidos, principalmente, de carboidratos presentes em águas residuárias e os ácidos produzidos podem ser ainda utilizados em indústrias químicas e de alimentos (LEITE et al., 2008).

Figura 3.2: Esquema comparativo dos três principais tipos de tecnológicos de bioprodução de hidrogênio.



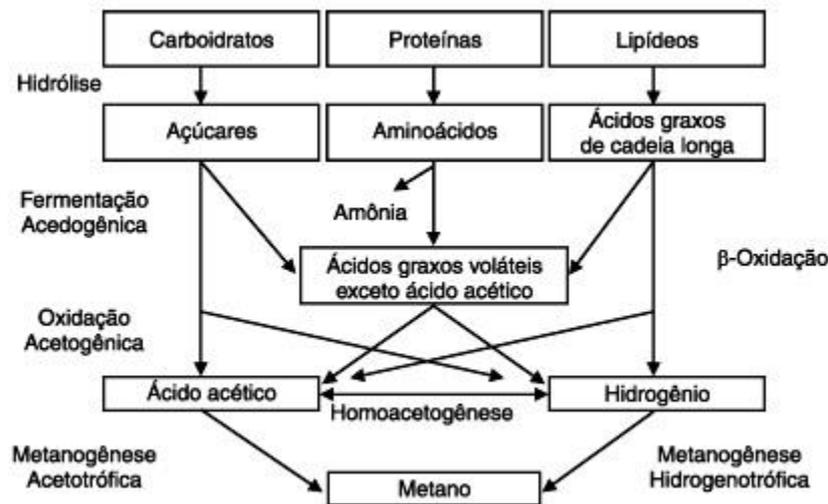
Fonte Sinha e Pandey (2011), adaptado por Santos (2014).

### 3.2.1. Digestão anaeróbia

A digestão anaeróbia é um processo complexo que envolve várias fases intermediárias e diferentes classes de micro-organismos. Inicialmente, se o substrato contem componentes orgânicos mais complexos, estes devem ser hidrolisados em compostos mais simples (polímeros em monômeros). Os produtos gerados são metabolizados pelas bactérias fermentativas, convertidos em ácidos orgânicos, álcoois, ácido láctico, gás carbônico, hidrogênio, amoníaco e sulfato de hidrogênio. Os ácidos

orgânicos com mais de dois carbonos são convertidos em acetato e gás hidrogênio pelas bactérias conhecidas como produtoras obrigatórias de hidrogênio. O acetato e o gás hidrogênio são, finalmente, convertidos em metano pelas arqueias metanogênicas (SPEECE, 1996). Portanto, o processo de digestão anaeróbia é dividido em duas etapas: a acidogênese e a metanogênese. Só é possível obter hidrogênio se o processo for interrompido na primeira fase, já que o hidrogênio é caracterizado como um intermediário do processo, sendo produzido na primeira etapa e consumido na segunda. A figura 3.3 ilustra um esquema das etapas durante a digestão anaeróbia:

Figura 3.3: Ilustração das etapas durante a degradação anaeróbia.



Fonte: Adaptada de Salminen e Rintala, 2002

O acetato formado na acetogênese pode ser consumidor de hidrogênio (SIRIWONGRUNGSON; ZENY e ANGELIDAK, 2007). A reação do hidrogênio reduzindo o dióxido de carbono a acetato é chamada de homoacetogênese (Eq. 1). Esta se torna um importante fator na produção de hidrogênio, uma vez que há consumo e queda no rendimento.



As principais espécies identificadas como responsáveis pela produção biológica de hidrogênio durante a acidogênese de hidratos de carbono são *Enterobacter*, *Bacillus* e *Clostridium* (HAWKES et al., 2002). *Clostridium* também são identificadas pela produção simultânea de  $\text{H}_2$  e etanol (KOSKINEN et al., 2008).

### 3.3. Reatores utilizados para a produção de hidrogênio

Embora grande parte dos estudos de fermentação foram realizados em operações no modo batelada, operações contínuas também são relatadas utilizando diversos substratos e consórcios microbianos. Operações contínuas proporcionam altos valores de rendimento e produção volumétrica de hidrogênio em relação as operações no modo batelada (ARGUN e KARGI, 2011).

A configuração do reator utilizado para processar as reações pode ter um caráter decisivo na formação dos produtos finais da fermentação. As condições fluidodinâmicas impostas pelo reator podem influir em questões de transferência de massa e calor as quais podem ter consequências no crescimento dos micro-organismos produtores de hidrogênio (REIS, 2010).

Com a grande demanda de pesquisas na área de tratamento anaeróbio, foram desenvolvidos os sistemas de alta taxa. Estes se caracterizam pela capacidade em reter grandes quantidades de biomassa, de elevada atividade, mesmo com aplicação de baixos tempos de detenção hidráulica. Dessa forma, consegue-se manter um elevado tempo de retenção de sólidos, mesmo com a aplicação de elevadas cargas hidráulicas no sistema. O resultado é a obtenção de reatores compactos, com volumes inferiores aos reatores anaeróbios de crescimento suspenso, mantendo-se, contudo, elevado grau de estabilidade do lodo (CHERNICHARO, 1997).

Diversos estudos foram realizados com diferentes configurações de reatores para avaliar o desempenho da produção de hidrogênio em condições anaeróbias utilizando os mais variados substratos. A tabela 3.4 resume o desempenho de alguns reatores anaeróbios utilizados a fim de produzir hidrogênio.

Tabela 3.4: Utilização de diferentes configurações de reatores anaeróbios para produção de H<sub>2</sub>.

Reator	Substrato	Produtividade de H <sub>2</sub>	Referência
UASB	Amido	0,075 L.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	Akutsu et al. (2009b)
	Soro de queijo	122 mL.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup>	Castello et al. (2009)
	Soro de queijo	0,36 L H <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup>	Carrillo-Reyes et al. (2012)
Reator anaeróbio de leito fixo	Sacarose	2,981 L H <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup>	Keskin; Aksöyek; Azbar (2011)
	Soro de queijo	1 L H <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup>	Perna et al. (2013)
EGSB	Glicose	2,7 L L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup>	Abreu et al. (2010)
CSTR	Melaço	249 mmol.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup>	Ren et al. (2006)
	Amido	2,8 mol.mol <sup>-1</sup> glicose	Akutsu et al. (2009a)
	Soro de queijo	62,5 mL H <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	Azbar et al. (2009a)
	Sacarose	3,74 mol.mol <sup>-1</sup> glicose	Yuan et al. (2009)
	Amido peptone	412 mmol.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup>	Li et al. (2010)
	Melaço	9,72 L.d <sup>-1</sup> .L <sup>-1</sup>	Ren et al. (2010)
RALF	Glicose	2,11 molH <sub>2</sub> .mol glicose <sup>-1</sup>	Barros e Silva (2012)
	Vinhaça de cana de açúcar	2,23 mmol. g <sub>DQO</sub> <sup>-1</sup>	Santos et al. (2014)
	Soro de queijo	1,33 mol H <sub>2</sub> .mol lactose	Rosa et al. (2014)
	Glicose	1,37 mmol H <sub>2</sub> .g <sup>-1</sup> <sub>DQO</sub>	Rosa, Santos e Silva (2014)

### 3.3.1. Reator Anaeróbio de Leito Fluidificado (RALF)

Os reatores anaeróbios de alta taxa podem ser classificados em dois grupos de acordo com o tipo de crescimento de biomassa no sistema, crescimento microbiano disperso e crescimento microbiano aderido (CHERNICHARO, 1997). O reator

anaeróbico de leito fluidificado está inserido no grupo com crescimento microbiano aderido.

A técnica de leito fluidificado envolve a suspensão do sólido dividido em uma corrente ascendente de fluido a uma velocidade suficientemente elevada para causar a flutuação e movimentação vigorosa das partículas. Neste processo, a biomassa cresce aderida a suportes de pequenos tamanhos, como areia, poliestireno, cinasita e outros, e formam biofilmes. O sistema possui como vantagem em relação a outros sistemas no que se refere à maior área específica do sólido exposta ao fluido, favorecendo as transferências de calor e massa e altas velocidades de reação, quando comparadas ao leito fixo (SHIDA, 2008).

Alguns fatores podem contribuir para a eficiência do processo de leito fluidificado, como: a mínima resistência difusional devido ao movimento das partículas e velocidade do líquido, a minimização de problemas de canais preferenciais, de empacotamento e da retenção de gás, e a habilidade de controlar e otimizar a espessura do biofilme (HICKEY e OWENS, 1981).

Zhang et al. (2007), utilizando reator anaeróbico de leito fluidificado preenchido com carvão ativado como material suporte para adesão da biomassa, avaliaram a redução do TDH de 4 h para 0,5 h em uma concentração de glicose de  $10 \text{ g.L}^{-1}$ . A composição do hidrogênio reduziu de 61,2% para 57,2% com a redução do TDH. Um rendimento de produção de hidrogênio de  $0,94 \text{ mol H}_2.\text{mol}^{-1}$  glicose foi encontrado, em TDH de 4 h e estabilizou em  $1,12\text{-}1,19 \text{ mol H}_2.\text{mol}^{-1}$  de glicose entre o TDH de 0,5 h e 2 h. Ambas a produção volumétrica e a produção específica de hidrogênio aumentaram significativamente com a redução do TDH.

Shida (2008) avaliou a produção de hidrogênio e ácidos orgânicos em reator anaeróbico de leito fluidificado contendo argila expandida como material suporte. O reator foi inoculado com lodo pré-tratado termicamente a  $90^\circ\text{C}$  por 10 minutos para o enriquecimento do inóculo acidogênico. O reator foi operado com TDH de 8 h a 1 h e alimentado com água residuárias sintética contendo  $2000 \text{ mg. L}^{-1}$  de glicose. A um pH de 3,8, a  $30^\circ\text{C}$ , cerca de 92 a 98% da glicose foi removida. A redução do TDH de 8 h a 1 h conduziu a um aumento na produção volumétrica de hidrogênio de 0,28 para  $1,15 \text{ L.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$ , respectivamente. Em geral, o rendimento de produção de hidrogênio aumentou com a redução do TDH. Os maiores metabólicos solúveis foram o ácido butírico (44,64-52,52%) e o ácido acético (41,17-47,48%) com insignificante concentração de etanol

(inferior a 10%). A produção de hidrogênio e a porcentagem de ácido butírico sobre o ácido acético indicam que o tratamento térmico do lodo foi efetivo.

Lin et al. (2009) utilizaram etileno-acetato de vinila como suporte para imobilização da biomassa para a produção de hidrogênio em reator anaeróbico de leito fluidificado. O desempenho do reator alimentado com meio sintético a base de sacarose foi analisado sob diferentes concentrações de sacarose. A maior produção volumétrica de hidrogênio foi de  $1,80 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$  em TDH de 2 h e  $40 \text{ g DQO} \cdot \text{L}^{-1}$ , e o rendimento máximo de produção de hidrogênio ( $4,26 \text{ mol H}_2/\text{mol}$  sacarose) foi obtido em TDH de 6h e  $20 \text{ g DQO} \cdot \text{L}^{-1}$ .

Amorim et al. (2009) avaliaram a produção de hidrogênio em reator anaeróbico de leito fluidificado alimentado com água residuária sintética a base de glicose e utilizando argila expandida como material suporte para a imobilização da biomassa. O reator foi operado com tempo de detenção hidráulica (TDH) variando de 8 a 1 hora. O rendimento de produção de hidrogênio aumentou de 1,41 para  $2,49 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$  glicose com a diminuição do TDH de 8 para 2 horas, entretanto, com o TDH de 1 hora, houve um decréscimo para  $2,41 \text{ mol H}_2/\text{mol}$  glicose. O biogás no reator era composto de  $\text{H}_2$  e  $\text{CO}_2$  e o teor de  $\text{H}_2$  aumentou de 8% para 35% com a diminuição do TDH. Os principais metabólicos solúveis foram ácido acético e ácido butírico.

Reis e Silva (2011) analisaram a influência da velocidade ascensional aplicada em um reator anaeróbico de leito fluidificado para a produção de hidrogênio. Para efeito de comparação, dois reatores foram utilizados com diferentes velocidades:  $1,24 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$  ( $R_{124}$ ) e  $1,88 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$  ( $R_{188}$ ). Como substrato foi utilizado água residuárias sintética a base de glicose ( $5000 \text{ mg}_{\text{DQO}} \cdot \text{L}^{-1}$ ). O  $R_{124}$ , que operou com velocidade mínima de fluidização obteve melhores valores para a produção de hidrogênio. A produção volumétrica de hidrogênio máxima obtida foi  $2,21 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$  para o TDH de 1 hora, enquanto que o melhor rendimento foi de  $2,55 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$  glicose para o TDH de 2 horas. O teor de hidrogênio no biogás foi de cerca de 40,53-67,57%. Uma quantidade elevada de etanol foi produzido, o que sugere que uma via metabólica por meio de etanol foi preferível.

Ngoma et al. (2011) avaliaram a produção de hidrogênio em reator anaeróbico de leito fluidificado utilizando carvão ativado como suporte para imobilização da biomassa e o efeito da temperatura e da taxa de recirculação do efluente na produção. Foi verificado que em temperatura de  $45^\circ\text{C}$ , como a taxa de recirculação foi de  $1,3 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$  para  $3,5 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ , a produção volumétrica de hidrogênio aumentou de 2,1 para  $8,7 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ . Em  $70^\circ\text{C}$ , a taxa de recirculação aumentou de 1,3 a  $3,5 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ , e a produção

volumétrica de hidrogênio aumentou de 2,8 para 14,8 L. h<sup>-1</sup>. L<sup>-1</sup>. Em temperatura de 45°C, a %H<sub>2</sub> produzido foi de 45%, já em 70°C foi de 67%.

Amorim, Sader e Silva (2012) estudaram o efeito da concentração de substrato (glicose) na produção de hidrogênio utilizando reator anaeróbio de leito fluidificado. Quatro reatores foram operados com TDH variando de 8 a 1 hora e concentração afluente de 2 a 25 g.L<sup>-1</sup>, em condição mesofílica. Os reatores operados com TDH de 2 horas e concentrações afluentes de 2, 4 e 10 g.L<sup>-1</sup> apresentaram resultados satisfatórios à produção de hidrogênio. O máximo rendimento encontrado em TDH de 2 horas e concentração de 2g.L<sup>-1</sup>, enquanto que o máximo valor de produção volumétrica de hidrogênio foi encontrado em TDH de 1 hora e concentração afluente de 10g.L<sup>-1</sup>. Os reatores operados com concentrações de glicose de 2 e 4 g.L<sup>-1</sup> produziram maiores quantidades de ácidos acético e butírico.

Barros e Silva (2012) verificaram a influência de diferentes meios suportes (poliestireno, pneu triturado e polietileno tereftalato – PET) na produção de hidrogênio e etanol em três reatores anaeróbios de leito fluidificado. A fonte de carbono utilizado nos três reatores foi glicose (DQO de 4000 mg.L<sup>-1</sup>) e TDH variando de 8 a 1 h em condição mesofílica. Para a produção de hidrogênio e teor de H<sub>2</sub> no biogás, o melhor desempenho foi obtido com R<sub>2</sub> com 2,11 molH<sub>2</sub>.mol glicose<sup>-1</sup> e 65%, respectivamente. Já o R<sub>3</sub> apresentou um melhor desempenho para produção de etanol (1941,78 mg.L<sup>-1</sup>).

Obazu; Ngoma e Gray (2012) utilizaram carvão ativado como suporte para imobilização da biomassa para produção de hidrogênio e avaliaram a inter-relação entre volume do reator, taxa de recirculação do efluente, temperatura, pH e produção de hidrogênio. A maior produção volumétrica de hidrogênio foi de 231,3 mmol H<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> obtido em temperatura de 70°C, com o aumento da taxa de recirculação do efluente para 3,2 L.min<sup>-1</sup> e reduzindo o volume do reator para 5,74L.

Shida et al. (2012) avaliaram o desempenho de dois reatores anaeróbios de leito fluidificado com (1000 mg.L<sup>-1</sup> de bicarbonato de sódio e 1 ml.L<sup>-1</sup> de ácido clorídrico) e sem adição de solução tampão durante a produção de H<sub>2</sub> e sua composição microbiológica. Nos dois reatores foi utilizado argila expandida como suporte para aderência microbiana. O reator foi operado com TDH de 8 h a 1h e alimentado com água residuárias sintética, e o pH do afluente de 6-7. Em ambos os reatores, a produção de hidrogênio aumentou com a diminuição do TDH de 8 a 2 horas, e diminuiu com TDH foi reduzido para 1 h. O reator 1 (sem adição de solução tampão) apresentou maiores valores de produção de hidrogênio e taxa de produção de hidrogênio em todos

os TDH avaliados, e os valores máximos alcançados foram  $2.45 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$  glicose e  $0.95 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ , respectivamente.

Santos et al. (2014) avaliaram o efeito de altas TCO ( $60,0 - 480 \text{ kg}_{\text{DQO}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ ) sobre a produção de hidrogênio a partir de vinhaça de cana de açúcar em dois reatores anaeróbios de leito fluidificado (RALF<sub>1</sub> e RALF<sub>2</sub>) em temperatura termofílica ( $55^\circ\text{C}$ ) e observou que houve tendência de diminuição de HY e conteúdo de hidrogênio com o aumento da TCO. O rendimento de H<sub>2</sub> máximo observado foi em RALF<sub>1</sub> ( $2,23 \text{ mmol} \cdot \text{g}_{\text{DQO}}^{-1}$ ). O aumento da produção volumétrica de hidrogênio foi relacionada com a diminuição do TDH de 6, 4, 2 e 1h e o maior valor obtido foi  $1,49 \text{ L H}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ .

Rosa et al. (2014) utilizando dois reatores anaeróbios de leito fluidificado, avaliaram o efeitos de diferentes tempos de detenção hidráulico (TDH) de 4, 2 e 1 hora em diferentes fontes de inóculos (lodo de suinocultura e lodo de abatedouro de aves) sobre a produção de hidrogênio. Soro de queijo foi usado como fonte de substrato com concentração de  $5000 \text{ mg}_{\text{DQO}} \cdot \text{L}^{-1}$  em toda a operação dos reatores. O maior rendimento de hidrogênio ( $1,33 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}$  lactose) foi obtido no TDH de 4 horas.

Rosa, Santos e Silva (2014) avaliaram o efeito de duas fontes de inoculação (lodo proveniente de reator UASB para tratamento de efluentes de suinocultura e abatedouro de aves), utilizando como substratos glicose, soro de queijo e a mistura glicose-soro de queijo, para a produção de hidrogênio em RALF. Em todos os processos, foi utilizado TDH de 6 horas e concentração de substrato de  $5 \text{ g}_{\text{DQO}} \cdot \text{L}^{-1}$ . Para a glicose, o rendimento de hidrogênio (HY) máximo foi de  $1,37 \text{ mmol H}_2 \cdot \text{g}_{\text{DQO}}^{-1}$ . A mistura de glicose-soro de queijo foi favorável para produção de hidrogênio e etanol, com rendimentos de até  $1,7 \text{ mmol H}_2 \cdot \text{g}_{\text{DQO}}^{-1}$  e  $3,45 \text{ mol EtOH} \cdot \text{g}_{\text{DQO}}^{-1}$ . A utilização de soro de queijo como única fonte de substrato resultou em um HY de  $1,9 \text{ mmol H}_2 \cdot \text{g}_{\text{DQO}}^{-1}$ .

### 3.3.1.1. Materiais suporte para adesão microbiana

Em um reator anaeróbio de leito fluidificado o filme microbiano é retido por meio da adesão natural dos microrganismos às partículas de suportes sólidos. Uma vez que o desempenho do processo é dependente da população microbiana presente no sistema, é fundamental conhecer a influência de parâmetros operacionais, fatores físico-químicos e diferentes propriedades do meio suporte no processo de formação do biofilme (HIDALGO e GÁRCIA-ENCINA, 2002).

Chang, Lee e Lin (2002) investigaram a produção de hidrogênio em reator leito fixo a partir de lodo de esgoto doméstico em três materiais suportes diferentes – esponja de bucha, argila expandida e carvão ativado – a fim de permitir a retenção das bactérias produtoras de hidrogênio dentro dos reatores. Verificou-se que a esponja de bucha foi ineficiente para imobilização da biomassa, enquanto que argila expandida e carvão ativado obtiveram melhores rendimentos. Assim, verificaram a produção de hidrogênio utilizando argila expandida e carvão ativado, em TDH variando de 0,5 a 5 h, utilizando sacarose como principal fonte de carbono. Com concentração de sacarose de 20 g DQO.L<sup>-1</sup>, o reator utilizando argila expandida obteve produção volumétrica de hidrogênio de 0,4151 L.h<sup>-1</sup>.L<sup>-1</sup> em TDH de 2h. Já o reator utilizando carvão ativado, apresentou valor de produção volumétrica de hidrogênio de 1,321 L.h<sup>-1</sup>.L<sup>-1</sup> em TDH de 1 hora. O biogás produzido nos dois reatores foi entre 25 – 35% de H<sub>2</sub>.

### **3.4. Parâmetros importantes para a produção de hidrogênio em reatores anaeróbios**

Há relatos na literatura de que entre os principais fatores que afetam a produção biológica de hidrogênio estão: o inóculo, o tipo de reator, a temperatura e o pH (WANG; WAN, 2009; DAS, 2009; GIOANNIS et al., 2013).

#### **3.4.1. pH**

Um fator de grande importância para a produção de hidrogênio é o pH, pois afeta a ação dos micro-organismos hidrogenotróficos (consumidores de hidrogênio) e a velocidade de produção de hidrogênio. Dois diferentes tipos de experimentos têm sido conduzidos para determinação do pH ótimo para a produção de H<sub>2</sub>. O primeiro envolve o ajuste de diferentes valores iniciais de pH, enquanto que o outro envolve o controle e manutenção do mesmo durante todo o processo (VAN GINKEL; SUNG e LAY, 2001; FANG e LIU, 2002; CAI et al., 2013)

Alguns autores demonstraram que o pH inicial é um dos parâmetros que mais influenciam na produção fermentativa de hidrogênio. O pH abaixo de 4,7 é altamente desfavorável para a produção de hidrogênio, visto que inibe a atividade da hidrogenase e outras enzimas envolvidas no processo (LAY, 2000; WANG e WAN, 2009). Estudos demonstram que, em uma faixa adequada, com o aumento do pH, aumenta a capacidade

das bactérias de produzir hidrogênio durante a produção fermentativa, entretanto, o pH em faixas muito elevadas pode reduzir significativamente essa produção (AMORIM, 2009).

Fang e Yu (2001) avaliaram o efeito da variação do pH (4 – 6,5) em reator de fluxo ascendente, utilizando soro de queijo como fonte de substrato (DQO de  $4\text{g.L}^{-1}$ ), TDH de 12 horas e temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$  sobre a produção de hidrogênio. A conversão de lactose variou de 89 – 93% em pH 5-6,5, enquanto que a conversão foi de 84% e 78% em pH 4,5 e 4, respectivamente. A produção volumétrica de hidrogênio foi de  $5,1\text{ L H}_2\text{.L}^{-1}\text{.d}^{-1}$  em pH 4 e  $13,3\text{ L H}_2\text{.L}^{-1}\text{.d}^{-1}$  em pH 6,5. A composição do efluente foi fortemente influenciada pelo valor de pH. Em geral, valores baixos de pH favoreceram a produção de álcoois, enquanto que valores mais elevados favoreceram a produção de ácidos graxos voláteis (AGV).

Ferchichi et al. (2005) investigaram o efeito do pH afluente, na faixa de 5 e 10, sobre a produção de hidrogênio utilizando soro de queijo como substrato. O hidrogênio foi produzido durante todo o intervalo de pH estudado, entretanto a produção volumétrica e o rendimento de hidrogênio foram máximos em pH afluente de 6, e em seguida foram reduzidos de forma constante com a elevação do pH. O consumo de lactose não foi afetado durante o experimento.

Diversos relatos na literatura mostram que o valor de pH ótimo para a produção de hidrogênio se encontra na faixa de 5,5 e 6,0. Já o valor pH na faixa de 6,1 e 6,5 pode produzir uma quantidade excessiva de ácido propiônico (VAN GINKEL; SUNG e LAY, 2001; FANG e LIU, 2002). Wu e Chang (2007) relatam um aumento na produção de  $\text{H}_2$  a  $4,02\text{ molH}_2\text{.g}^{-1}\text{DQO.d}^{-1}$  com o aumento do pH de 5,5 para 6, no entanto o PVH caiu para  $1,8\text{ molH}_2\text{.g}^{-1}\text{DQO.d}^{-1}$  quando o pH 6,5 foi analisado.

### **3.4.2. Substrato**

A composição do substrato é um fator de impacto sobre a taxa de produção de  $\text{H}_2$ . Entre os substratos mais utilizados estão a glicose, a sacarose e o amido, contudo, outros resíduos orgânicos têm sido utilizados em estudos nos últimos tempos para a produção de hidrogênio (WANG e WAN, 2009; KAPDAN e KARGI, 2006).

Diversos estudos vêm sendo direcionados a fim de investigar a produção fermentativa de hidrogênio utilizando águas residuárias reais com alta taxa orgânica em reatores contínuos, dentre eles resíduos de casca de arroz (TAWFIK e SALEM, 2012),

melaço (HAN et al., 2012), óleo de palma (SINGH et al., 2013), vinhaça de cana de açúcar (SANTOS et al., 2014), águas residuárias do processamento de mandioca (WANG et al., 2012) e soro de queijo (ROSA; SANTOS e SILVA, 2014; ROSA et al., 2014). Existem várias divergências sobre a concentração ótima de um substrato para a produção fermentativa de hidrogênio. A razão disso se deve à diferença da origem do inóculo, do método de enriquecimento, entre outros.

De acordo com a equação de Monod para a velocidade específica de crescimento das bactérias produtoras de hidrogênio e a concentração de substrato, o rendimento de hidrogênio é aumentado com o aumento da concentração de substrato, até que a taxa de crescimento máxima específica ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ) é alcançada. Assim, uma faixa apropriada do aumento da concentração do substrato pode aumentar a capacidade das bactérias produtoras de hidrogênio de produzir hidrogênio, entretanto, concentrações muito elevadas de substratos podem limitar ou reduzir sua produção (LO et al., 2008; VAN GINKEL; SUNG e LAY, 2001).

A produção de hidrogênio a partir de águas residuárias reais é ainda fortemente influenciada pela taxa de carregamento orgânico (TCO) aplicada nos reatores. A TCO é dependente do tempo de detenção hidráulico (TDH) e da concentração de matéria orgânica fornecida no substrato, portanto é essencial definir um intervalo de TCO, a fim de se determinar um intervalo ótimo para a máxima produção de hidrogênio (HAFEZ et al., 2010; MOHAMMADI et al., 2012; SANTOS et al., 2014).

As rotas fermentativas e os produtos finais dos metabólicos podem ser modificados em função da TCO aplicada, assim como a eficiência da conversão de substrato. As diversas concentrações de substrato e, portanto os valores de TCO, ideais para a produção máxima de hidrogênio utilizando águas residuárias encontrados na literatura (Tabela 3.5) são atribuídos às diferenças nas configurações do reator, tipo de águas residuárias, inóculo, faixa de TCO aplicada, temperatura, pH entre outros fatores (MOHAMMADI et al., 2012; GIOANNIS et al., 2013). Uma ampla faixa de TCO de 3 a 60.000g DQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> foi em reatores contínuos ou em batelada com diversos substratos orgânicos, tais como glicose, sacarose, amido, soro de queijo e vinhaça de cana de açúcar. Como apresentados, não há uma relação clara entre o rendimento de hidrogênio e a taxa de carregamento orgânico. Em alguns casos TCOs mais elevadas reduziram a produção de hidrogênio, no entanto em outros TCOs maiores, essa produção foi elevada.

Tabela 3.5: Efeito da TCO na produção fermentativa de hidrogênio.

Tipo de reator	Substrato	Faixa de TCO <sup>A</sup>	TCO ótima <sup>B</sup>	Rendimento máximo de H <sub>2</sub> <sup>C</sup>	Referência
<b>Batelada</b>	Sacarose	10-40	20	4,0	Wu et al. (2005)
	Glicose	3-18	9	9,53	Liu et al. (2009)
	Amido cru	10-25	10	9,05	Su et al. (2009)
	Amido gelatinizado	10-25	10	9,47	Su et al. (2009)
	Amido hidrolisado	10-25	25	10,4	Su et al. (2009)
	Glicose	5-90	5	2,14	Ruggeri, Tommasi e Sassi (2009)
<b>Contínuo</b>	Soro de queijo	5-14	14	3,12	Yang et al. (2007)
	Glicose	4-30	22	9,27	Shen, Bagley e Liss (2009)
	Sacarose	20-160	120	9,88	Lin et al. (2009)
	Soro de queijo	21-47	35	9,0	Azbar et al., (2009a)
	Vinhaça de cana de açúcar	60-480	60	2,23	Santos et al. (2014)

A: (gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>)B: (gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>)C: mmolH<sub>2</sub>.g<sup>-1</sup>DQO

Lin et al. (2009), utilizando reator de leito fluidificado alimentado com efluente sintético à base de sacarose, avaliaram diversas TCOs e encontraram o máximo rendimento de hidrogênio em TCO de 120 g DQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, enquanto que Ruggeri, Tommasi e Sassi (2009) relataram 5 g DQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> como o melhor valor de TCO. De acordo com Mohammadi et al. (2012) este fenômeno se deve à diversidade ambiental, condições de funcionamento ou intervalos das variáveis utilizadas nos estudos.

Lin et al. (2009) relataram, ainda, um aumento de produção de H<sub>2</sub> de 3,46 molH<sub>2</sub>.g<sup>-1</sup>DQO com o aumento da TCO de 20 para 120 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, no entanto, o rendimento caiu para 1,96 molH<sub>2</sub>.g<sup>-1</sup>DQO com o aumento da TCO para 160 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> em reator anaeróbico de leito fluidificado. Os autores sugerem que a alta concentração de substrato pode inibir a capacidade de produção de hidrogênio das

bactérias envolvidas. O mesmo foi relatado por Liu et al. (2009) quando glicose foi utilizado como única fonte de carbono.

#### **3.4.2.1. Soro de Queijo**

Águas residuais ricas em carbono podem ser utilizadas como substrato para produção de hidrogênio por fermentação. Recentemente alguns estudos relataram o potencial do uso de soro de queijo como substrato para a produção de hidrogênio devido seu elevado conteúdo de hidratos de carbono e grande disponibilidade (DAVILA-VAZQUEZ et al., 2009; CARRILLO-REYES et al, 2012; PERNA et al., 2013).

Em termos mundiais, alguns países vêm apresentando expressivos índices de crescimento da produção leiteira. O Brasil é um dos maiores produtores mundiais, ocupando a 5<sup>o</sup> posição no ranking em 2011, com produção de 32.297.667 litros (EMBRAPA, 2012), gerando uma renda de R\$17 bilhões, que corresponde a 10% do valor gerado pela agropecuária brasileira e 76% do valor gerado pela pecuária (IBGE, 2013)

Líder na produção de leite no Brasil, a região sudeste representa cerca de 35,5% na produção de leite, onde Minas Gerais concentra 27,3% da produção nacional (IBGE, 2012). Na tabela 3.6 é apresentado o volume de produção nacional total de leite.

O constante aumento na produção do leite resultou no aumento da produção de queijo, gerando, portanto um crescente volume de soro de queijo. O soro de queijo é um subproduto do leite, obtido durante a produção de queijo. Consiste em 80-90% do volume do leite utilizado para a produção de queijo e contém cerca de 50% dos nutrientes do leite que o originou (FERCHICHI et al., 2005; ROSA, 2010). É composto principalmente por lactose (70-72%), proteínas (8-10%) e sais minerais (12-15%) (PANESAR et al., 2007).

Tabela 3.6: Volume de produção nacional total de leite

Estado	Volume de produção (1000L)		Taxa de crescimento	% total
	2010	2011		
Minas Gerais	8.388.039	8.767.932	0,045	27,3
Rio Grande do Sul	3.633.834	3.896.650	0,072	11,8
Paraná	3.595.775	3.930.428	0,093	11,7
Goiás	3.193.731	3.365.703	0,054	10,4
Santa Catarina	2.381.130	2.573.337	0,081	7,8
São Paulo	1.605.657	1.593.515	-0,008	5,2
Bahia	1.238.547	1.354.714	0,094	4,0
Pernambuco	877.420	964.769	0,100	2,9
Rondônia	802.969	841.092	0,047	2,6
Mato Grosso	708.481	735.719	0,038	2,3
Pará	563.777	540.287	-0,042	1,8
Mato Grosso do Sul	511.270	517.185	0,012	1,7
Rio de Janeiro	488.786	495.411	0,014	1,6
Ceará	444.144	457.464	0,030	1,4
Espírito Santo	437.205	441.178	0,009	1,4
Maranhão	375.898	387.737	0,031	1,2
Sergipe	296.650	316.496	0,067	1,0
Tocantins	269.491	289.639	0,075	0,9
Alagoas	231.367	229.687	-0,007	0,8
Rio Grande do Norte	229.492	232.860	0,015	0,7
Paraíba	217.018	233.518	0,076	0,7
Piauí	87.354	90.585	0,037	0,3
Amazonas	47.203	57.368	0,215	0,2
Acre	41.059	34.386	-0,163	0,1
Distrito Federal	36.256	37.745	0,041	0,1
Amapá	6.952	7.737	0,113	0,0
Roraima	5.954	6.172	0,037	0,0
<b>TOTAL</b>	<b>30.715.460</b>	<b>32.297.667</b>	<b>0,052</b>	<b>100,0</b>

Fonte: IBGE/Pesquisa da Pecuária Municipal, 2012.

O queijo é um dos principais produtos agrícolas e o soro de queijo é considerado um efluente altamente poluente devido a sua elevada carga orgânica e volume gerado, o que representa um impacto ambiental significativo para a indústria de laticínios. Em escala mundial, apenas 50% do soro de queijo produzido é utilizado. A quantidade de soro de queijo produzido e suas composições estão relacionadas com a produtividade do queijo. A composição do soro de queijo pode ser afetada ainda, pelo método empregado para manufaturar a caseína, pelo tratamento térmico do leite, manipulação, entre outros fatores. (CARVALHO; PRAZERES e RIVAS, 2013). Na Tabela 3.7 é apresentada a produção de soro de queijo por tipo de leite processado.

A matéria orgânica elevada é devido o conteúdo de lactose, proteína e gorduras, e é em torno de 99% biodegradável (PRAZERES; CARVALHO e RIVAS, 2012). As matérias minerais mais importantes do soro estão representadas na tabela 3.8 (ROSA, 2010).

Levando-se em consideração o alto custo do descarte do efluente e o valor nutricional do soro de queijo, é interessante a utilização do soro de queijo e seus componentes de diversas formas, dentro ou fora da indústria de alimentos. Devido à composição nutricional apropriado para o metabolismo de diversos micro-organismos, é ideal o uso do soro de queijo para fermentação. Esses micro-organismos consomem os nutrientes do soro de forma a reduzir a alta demanda química de oxigênio (DQO) e o volume de soro gerado (RICHARDS, 2002).

Tabela 3.7: Produção de volume de soro de queijo por tipo de leite processado.

<b>Tipo de leite trabalhado</b>	<b>Densidade média do leite (g.cm<sup>-3</sup>)</b>	<b>Rendimento kg queijo. 100 Kg leite<sup>-1</sup></b>	<b>Volume de queijo produzido (L.L<sup>-1</sup>)</b>
Vaca	1,032	9,86	0,873
Ovelha	1,036	14,78	0,822
Cabra	1,034	9,84	0,872

Fonte: Carvalho; Prazeres e Rivas, 2013.

Tabela 3.8 – Matérias mineirais contidas no soro de queijo (100 g)

<b>Minerais</b>	<b>mg.100 g<sup>-1</sup> soro de queijo</b>
Cálcio	500 – 725
Sódio	650 – 950
Magnésio	880 – 1600
Potássio	2400 – 2900
Fósforo	700 - 800

Fonte: Rosa, 2010.

### 3.4.2.2. Rotas fermentativas

Os principais metabólicos produzidos nos processos de tratamento de efluentes e na produção de hidrogênio são os ácidos acético e butírico. A produção de ambos leva à formação de hidrogênio. A razão entre a quantidade de ácido acético e ácido butírico produzidos é um dos parâmetros utilizados para demonstrar o favorecimento da produção de hidrogênio num determinado processo. Quanto maior essa relação, maior será o rendimento da produção de hidrogênio (REIS, 2010).

O controle de alguns fatores, como pH, tipo de reator, substrato utilizado como fonte de carbono, inóculo utilizado, tempo de detenção hidráulico (TDH) e uso de co-substratos influenciam as rotas fermentativas que favorecem a produção de hidrogênio (GIOANNIS et al, 2013). Na literatura é relatada a influência de alguns desses parâmetros sobre as condições ideais para a produção fermentativa de hidrogênio. Entretanto, a maior parte dos estudos utilizaram glicose e sacarose como substrato e já foram estabelecidas condições ótimas para a produção (WANG e WAN, 2009). Estudos utilizando águas residuais reais demonstram forte evidência de produção de hidrogênio, como óleo de palma (CHONG et al., 2009; NOPARAT; PRASERTSAN e O-THONG, 2012; CHONG et al., 2013), vinhaça de cana de cana de açúcar (HAN et al., 2012; SANTOS et al., 2014), manipueira (WANG et al., 2012) e soro de queijo (DAVILA-VAZQUEZ et al., 2009; ROSA; SANTOS e SILVA, 2014).

No tratamento de águas residuárias com soro de queijo (cujo principal componente é a lactose – um dissacarídeo que consiste de uma molécula de glicose e uma molécula de galactose), o efluente resultante após a produção de hidrogênio contém matéria orgânica na forma de ácidos orgânicos voláteis (acético, propiônico,

butírico), álcool (etanol) e carboidratos (lactose remanescente) (PRAZERES; CARVALHO e RIVAS, 2012).

A produção molar de hidrogênio pode alcançar valores máximos de 8,0 e de 4,0 mol H<sub>2</sub>.mol lactose<sup>-1</sup> (Equações (2) e (3)) por meio de fermentação de acetato e do butirato, respectivamente (DAVILA-VASQUEZ et al., 2011).



Apesar da formação de outros metabólicos, como ácido láctico e etanol, estar associada a valores inferiores a 4,0 mol H<sub>2</sub>.mol<sup>-1</sup> lactose (LEVIN; PITT e LOVE, 2004), a conversão de lactose em etanol tem sido considerada como uma possível rota (OZMIHCI e KARGI, 2008). A hidrólise da lactose conduz à geração de monossacarídeo (equação (4)) como a glicose e a galactose. O soro de queijo destaca sua relevância na produção de ácido láctico, ácido butírico, ácido acético, butanol, glicerol, acetona, etanol e hidrogênio (PRAZERES; CARVALHO e RIVAS, 2012).



Diversos estudos utilizaram soro de queijo como fonte exclusiva de carbono para a produção biológica de hidrogênio por fermentação por diferentes métodos. Fang e Yu (2001) investigaram o efeito do aumento da concentração de substrato (DQO de 2 a 30g.L<sup>-1</sup>) em reator de fluxo ascendente utilizando soro de queijo como fonte de substrato em TDH de 12 horas, pH 5,5 e temperatura de 37°C. A conversão de lactose decresceu com o aumento da concentração de soro de queijo de 94% em DQO de 2g.L<sup>-1</sup> a 84% em DQO de 30 g.L<sup>-1</sup>. A produção volumétrica de hidrogênio aumentou com o aumento da concentração de substrato de 6 L H<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> em DQO de 2g.L<sup>-1</sup> a 33,2 L H<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> em DQO de 30g.L<sup>-1</sup>. Baixas concentrações de soro de queijo favoreceram a produção de ácidos graxos voláteis (AGV). Em concentração de 2g.L<sup>-1</sup> de soro de queijo, 84% dos produtos no efluente eram de AGV e 16% de álcoois. Já em concentração de 30g.L<sup>-1</sup>, 46% eram de AGV e 54% de álcoois. Os AGV eram compostos, na maioria, de ácido acético e ácido propiônico.

Yang et al. (2007) avaliaram a produção de hidrogênio utilizando soro de queijo como substrato e concentração de  $5\text{g}_{\text{DQO}}\cdot\text{L}^{-1}$  em condição mesofílica. Foram observados rendimentos de hidrogênio de  $10\text{mM}\cdot\text{g}^{-1}_{\text{DQO}}$ . Em fermentações contínuas e concentrações de DQO variando de 10, 12 e  $14\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  e TDH de 24 horas, os maiores rendimentos de hidrogênio foram 1,8 e  $2,3\text{mm}\cdot\text{g}^{-1}_{\text{DQO}}$ .

Davila-Vazquez et al. (2008) investigaram o efeito do pH (3,88 – 8,12) e concentração inicial ( $0,86 - 29,14\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) de soro de queijo sobre o rendimento de hidrogênio e a produção volumétrica de hidrogênio. O maior rendimento de hidrogênio ( $3,1\text{mol H}_2\cdot\text{mol}^{-1}$  lactose) foi obtido em pH 6 e DQO de  $15\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , enquanto que a maior produção volumétrica de hidrogênio foi  $8,1\text{mmol H}_2\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ , alcançados em pH 7,5 e DQO de  $25\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Os principais metabólitos orgânicos detectados foram ácido acético e butírico.

Castello et al. (2009) estudaram a viabilidade de produção de hidrogênio por fermentação utilizando soro de queijo como substrato em um reator UASB. Para a maior taxa de carregamento orgânico testada ( $20\text{g}_{\text{DQO}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ), a produção volumétrica de hidrogênio foi de  $122\text{ml H}_2\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ . Os estudos microbiológicos apresentaram a prevalência de organismos fermentativos dos gêneros *Megasphaera*, *Anaerotruncus*, *Pectinatus* e *Lactobacillus*, que podem ser reconhecidos como produtores de hidrogênio.

Carrillo-Reyes et al. (2012) utilizando reator UASB e soro de queijo como substrato avaliaram diferentes estratégias operacionais e inóculos para a produção de hidrogênio. Os maiores valores de produção volumétricas de hidrogênio obtidos foram 0,38 e  $0,36\text{L H}_2\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  em ambos inóculos com concentrações constantes. Já nos reatores operados com o aumento da carga orgânica aplicada, foi verificado queda na produção de  $\text{H}_2$  de 0,03 para  $0,015\text{L H}_2\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ , devido à presença de metano.

Perna et al. (2013) investigaram o efeito de três diferentes TCOs (22, 33 e  $37\text{g}_{\text{DQO}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) em reator anaeróbio de leito fixo com TDH de 24 horas utilizando soro de queijo como substrato. O aumento da carga orgânica a partir do valor inicial tiveram efeito positivo sobre a produção de hidrogênio e valores de até  $1\text{L H}_2\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  foram alcançados.

### 3.4.3. Tempo de detenção hidráulica (TDH)

O TDH também é um parâmetro importante no processo de fermentação. Chang; Lee e Lin (2002), Lee et al. (2003) e Chen e Lin (2003) apresentaram a operação de reatores anaeróbios em baixos tempos de detenção hidráulica (TDH) como um dos métodos de inibição dos processos metanogênicos, o que facilita o arraste das arqueias metanogênicas para fora dos sistemas. O arraste desses micro-organismos para fora dos reatores ocorre devido a velocidade máxima de crescimento das arqueias metanogênicas ( $\mu_{\text{máx}}$ , da ordem de  $0,0167 \text{ h}^{-1}$ ) serem menor que a das bactérias acidogênicas (cerca de  $0,083 \text{ h}^{-1}$ ). Dessa forma, os micro-organismos metanogênicos são incapazes de se reproduzir ou manter-se em equilíbrio nessas condições, e acabam sendo eliminados do sistema (CHEN; LIN e CHANG, 2001).

As maiores taxas de produção volumétrica e percentuais de hidrogênio podem ser obtidas por meio da diminuição do TDH, aumentando assim a taxa de carregamento orgânico (TCO) (DAVILA-VAZQUEZ et al., 2009; CARRILO-REYES et al., 2012; THANWISED; WIROJANAGUD e REUNGSANG, 2012). Assim, alterações no TDH podem ter influencia considerável sobre a diversidade da população microbiana que podem favorecer a produção de hidrogênio (HAFEZ et al, 2010). Na literatura, alguns autores verificaram aumento no rendimento de hidrogênio com o aumento da TCO. No entanto, outros autores observaram uma diminuição no rendimento com esse aumento de TDH devido aos desvios nas reações de produção de hidrogênio (MOHAMMADI et al., 2012).

Fang e Yu (2001) avaliaram o efeito da variação de TDH de 2 a 24 horas utilizando soro de queijo como fonte de substrato (DQO de  $4 \text{ g.L}^{-1}$ ) em pH 5,5, e temperatura de  $37^\circ\text{C}$  em reator de fluxo ascendente. A conversão de lactose foi de 83% em TDH de 2 horas, 93% em 12 horas, atingindo até 97% em 24 horas. Entretanto, a produção volumétrica de hidrogênio decresceu com o aumento do TDH, de  $43,2 \text{ H}_2\text{.L}^{-1}\text{.d}^{-1}$  em TDH de 2 horas a  $7,3 \text{ H}_2\text{.L}^{-1}\text{.d}^{-1}$  em TDH de 14 horas. Em todos os TDHs, o biogás no reator foi, em maioria, de hidrogênio e dióxido de carbono, com uma pequena fração de nitrogênio. Em todas as condições operacionais, os principais metabólicos foram ácido acético, ácido propiônico e etanol.

Chen e Lin (2003) investigaram o desempenho de um reator de agitação contínua utilizando sacarose como substrato para produção de hidrogênio variando o TDH. A produção volumétrica de hidrogênio aumentou de 4,9 para  $26,9 \text{ L H}_2\text{.L}^{-1}\text{.d}^{-1}$ , com a diminuição do TDH de 13,3 para 3h, entretanto caiu para  $20,8 \text{ L H}_2\text{.L}^{-1}\text{.d}^{-1}$  com a diminuição do TDH para 2 h. O biogás contido no reator variou de 35 e 47,2% de

hidrogênio, aumentando o percentual com a diminuição do TDH de 13,3 para 3 h e caindo com o TDH de 2h.

Lee et al. (2003) utilizaram sacarose como fonte de substrato a fim de verificar a produção biológica de hidrogênio variando o TDH (0,5 e 4h) e DQO de 20g.L<sup>-1</sup>. O menor TDH avaliado favoreceu a produção volumétrica de hidrogênio com valores de até 7,4 L.h<sup>-1</sup>.L<sup>-1</sup>. O biogás no reator consistiu em 30-40% de H<sub>2</sub>. Os principais metabólicos foram ácido butírico, ácido propiônico e ácido valérico.

Azbar et al. (2009a) avaliaram os efeitos da variação do tempo de detenção hidráulica (TDH) entre 1, 2 e 3,5 dias e altas taxas de carregamento orgânico (TCOs de 21, 35 e 47g DQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) sobre a produção biológica de hidrogênio em reator de agitação contínua. O biogás variou de 5 a 82% de hidrogênio e a PVH de 0,3 – 7,9 LH<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. Os rendimentos alcançados foram 22, 15 e 5 mmol.g<sup>-1</sup> DQO para os TDHs de 3,5, 2 e 1, respectivamente e concentração de substrato fixa em 40g.L<sup>-1</sup>. Já para o TDH fixo de 1 dia, os rendimentos de H<sub>2</sub> alcançados foram 3, 9 e 6 mmol.g<sup>-1</sup> DQO para os valores de TCO de 47, 35 e 21 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>.

Davila-Vazquez et al. (2009) estudaram a produção de H<sub>2</sub> em um reator de agitação contínua utilizando soro de queijo como substrato. Três tempos de detenção hidráulica (TDH) foram testadas – 10, 6 e 4h. O maior valor de produção volumétrica de hidrogênio (PVH) foi obtida em TDH de 6 horas. Assim, quatro taxas de carregamento orgânico, em TDH fixo de 6 horas, foram testados – 92,4, 115,5, 138,6 e 184,4 g lactose.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. Os maiores valores de PVH (46,61 mmol H<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) e rendimento de hidrogênio (HY - de 2,8 mol H<sub>2</sub>.mol<sup>-1</sup> lactose) foram encontrados em TCO de 138,6 g lactose.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. Uma queda acentuada ocorreu em TCO de 184,4 g lactose.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. Os principais metabólicos solúveis encontrados foram ácido butírico, ácido propiônico e ácido acético.

Zahedi et al. (2013) investigaram a influência da variação de TDH entre 240 e 6 horas na produção de hidrogênio a partir de resíduos sólidos municipais em condição termofílica. Foi observado um aumento na produção de hidrogênio e na atividade microbiana com a diminuição do TDH. O maior conteúdo de H<sub>2</sub> no biogás (57%) foi obtido em TDH de 12 horas.

Assim, é possível verificar que não há um TDH ótimo para produção biológica de hidrogênio e, mesmo com os mesmos substratos os resultados podem não estar em consenso. De acordo com Mohammadi et al. (2012) isso se deve ao conjunto de condições que o reator está inserido, incluindo diversidade ambiental, cargas orgânicas

aplicadas, condições de funcionamento ou intervalos das variáveis utilizadas nos estudos.

#### 3.4.4. Temperatura

A temperatura é um fator fundamental nas atividades dos micro-organismos fermentativos produtores de hidrogênio. Há duas fases de temperatura que são comumente utilizadas para a produção biológica de hidrogênio – condições mesofílicas e termofílicas (AKUTSU et al., 2009a). Geralmente as condições mesofílicas (30 – 40°C) são mais empregadas para geração de hidrogênio, no entanto, vem sendo realizados estudos em condições termofílicas (45 – 55°C), devido às vantagens consideráveis, tais como o aumento da capacidade dos micro-organismos produtores de hidrogênio durante a produção fermentativa (ZHAO et al., 2009; AKUTSU et al., 2009a; KARADAG et al., 2009; WANG et al., 2009), acarretando em altas taxas de produção e rendimento de hidrogênio, além de direcionar à rota de acetato, a qual favorece a formação de H<sub>2</sub> em maior extensão, quando comparados aos sistemas mesofílicos (HAWKES et al., 2007). Isso ocorre devido, principalmente, ao maior favorecimento termodinâmico – o qual aumenta as velocidades das reações químicas e biológicas, à dominância da via metabólica do acetato e à maior tolerância à pressão parcial de hidrogênio (O-THONG, PRASERTSAN e BIRKELANDD, 2009).

A temperatura ótima para produção de hidrogênio por fermentação depende ainda, das espécies produtoras de H<sub>2</sub> e da fonte de carbono utilizada (MOHAMMADI et al., 2005). As bactérias termofílicas produzem uma menor variedade de produtos finais de fermentação em comparação às mesofílicas (NOIKE e MIZUNO, 2000), entretanto, a temperatura a níveis muito elevados poderia reduzir significativamente a atividade das produtoras de hidrogênio devido à taxa de desnaturação do sistema de enzimas (WANG e WAN, 2008b; KHAMTIB e REUNGSANG, 2012).

Em fase aquosa, o hidrogênio apresenta baixa solubilidade (GUWY et al., 1997). Considerando a Lei de Henry, temperaturas elevadas reduzem a solubilidade do gás na fase aquosa e a interação do gás com os micro-organismos presentes no processo, desfavorecendo o consumo do gás para geração de outros produtos do processo fermentativo, aumentando, portanto, a eficiência de remoção do biogás.

É que crucial a pressão parcial de hidrogênio (P<sub>H<sub>2</sub></sub>) na fase gasosa seja baixa. Quando a concentração de hidrogênio no *headspace* aumenta, a síntese de H<sub>2</sub> torna-se

termodinamicamente desfavorável e o metabolismo é deslocado para a produção de produtos finais reduzidos (LEVIN; PITT e LOVE, 2004).

Com base em resultados de testes de análises enzimáticas e de metabólicos, foi proposto um sistema de metabolismo para a lactose, assumindo a utilização da via de Leloir para conversão de galactose em glicose. A figura 3.4 ilustra as vias metabólicas que podem ocorrer a partir da degradação do substrato para a produção biológica de H<sub>2</sub>.

Na transferência líquido-gás do hidrogênio, o hidrogênio deve ser direcionado do líquido para a fase gasosa rapidamente, mantendo um elevado fluxo de produção de hidrogênio pelas células. A explicação baseia-se nas propriedades termodinâmicas, entretanto, há uma possível saturação de hidrogênio na fase líquida (PEINTNER; ZEIDAN e SCHNITZHOFER, 2010). Em temperaturas elevadas, o hidrogênio é transferido a partir do líquido para a fase gasosa promovendo alta produção de H<sub>2</sub> (SONNLEITNER et al., 2012)

Processos fermentativos em condições termofílicas, ainda, resultam em elevada degradação de matéria orgânica, acelerando a estabilização do processo e favorecendo a aplicação de menores TDH e maiores cargas orgânicas volumétricas. Esses sistemas produzem também biogás de forma mais eficaz (KESKIN; AKSÖYEK e AZBAR, 2011; HASYIM et al., 2011; KARGI; EREN e OZMIHCI, 2012a).

Fang e Yu (2001) avaliaram o efeito da variação de temperatura (20 – 60°C) sobre a produção de hidrogênio em reator de fluxo ascendente, utilizando soro de queijo como fonte de substrato (DQO de 4g.L<sup>-1</sup>), TDH de 12 horas e pH 5,5. A conversão de lactose aumentou de 85% em 20°C para 95% em 55°C, entretanto caiu para 90% em 60°C. A produção volumétrica de hidrogênio foi de 8,6 L H<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> e 9,6 L H<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> em 20°C. Os principais metabólicos em todas as condições de operação foram ácido acético, ácido propiônico e etanol.

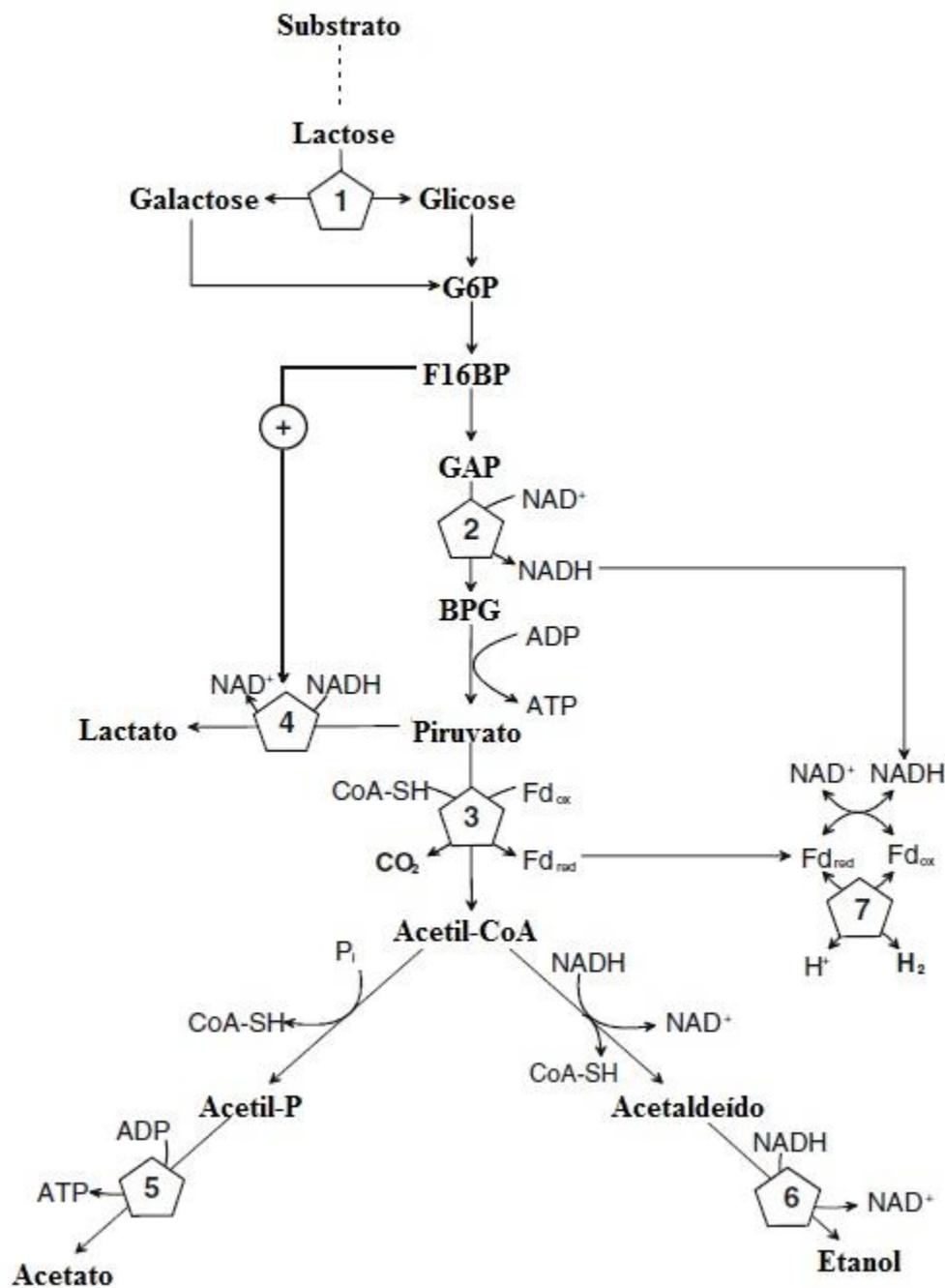


Figura 3.4: Diagrama das vias metabólicas envolvidas na fermentação de H<sub>2</sub> (1: beta-galactosidase; 2: gliceraldeído-3-fosfato; 3: Piruvato:ferridoxina oxidoreductase; 4: lactato desidrogenase; 5: acetato-quinase; 6: álcool desidrogenase; 7: hidrogenase; Fd<sub>ox</sub>: ferridoxina oxidada; Fd<sub>red</sub>: ferridoxina reduzida; G6P: glicose-6-fosfato; F16BP: frutose 1,6-bifosfato; BPG: 1,3-bifosfoglicerato). Fonte: Adaptado de Collet et al. (2006).

Youn e Shin (2005) compararam a produção biológica de hidrogênio a partir de resíduos de alimentos em condições mesofílicas e termofílicas em diferentes TCOs. Em condição termofílica, a produção volumétrica de hidrogênio variou de 0,4 a 0,9 L H<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, já em condições mesofílicas, a produção volumétrica de hidrogênio variou de 0,01

a  $0,09 \text{ L H}_2\text{.L}^{-1}\text{.d}^{-1}$  nas TCOs testadas. Para eficiência de conversão de carboidrato, o reator termofílico atingiu eficiências de 87 a 94,1%, no entanto, o reator termofílico obteve eficiência de até 83,3%. Ainda no reator mesofílico, uma quantidade significativa de metano foi detectada com o aumento da concentração de substrato. Ácido acético e ácido butírico foram os principais metabólicos envolvidos no reator termofílico, enquanto que no reator mesofílico foi o ácido propiônico.

Lin, Wu e Hung (2008) avaliaram o efeito da variação de temperatura entre 30 e 55°C em reator quimiostato com pH 7,1, TDH de 12 horas e utilizando xilose como fonte de substrato (DQO de  $20\text{g.L}^{-1}$ ). Foi verificado que em 50°C foram obtidos os maiores valores de teor de hidrogênio no biogás, rendimento de hidrogênio e produção volumétrica de hidrogênio (42,2%,  $1,4 \text{ mol H}_2\text{.mol}^{-1}$  xilose e  $0,24 \text{ mol H}_2\text{.L}^{-1}\text{.d}^{-1}$ , respectivamente). Na temperatura de transição (45°C) foram encontrados os menores valores para produção de hidrogênio. Butirato e etanol foram os principais metabólicos encontrados.

Tang et al. (2008) verificaram o efeito da temperatura e do pH na produção de hidrogênio a partir de efluentes de gado. Os resultados experimentais mostraram que ambos, pH e temperatura, afetaram de forma significativa a produção de hidrogênio. O rendimento máximo de  $\text{H}_2$  foi obtido em 45°C, assim como a produção volumétrica de hidrogênio e a proporção butirato/acetato. A presença de etanol e ácido propiônico diminuíram a produção de  $\text{H}_2$  e suas concentrações também foram afetadas pelo pH e temperatura.

Wang e Wan (2008a) avaliaram o efeito da variação de temperatura, entre 20°C e 55°C na produção de hidrogênio utilizando glicose como substrato. No pH 7,0 inicial, durante a produção fermentativa de hidrogênio utilizando glicose como substrato, a eficiência de degradação de substrato e potencial de produção de hidrogênio aumentam com o aumento da temperatura de 20°C a 40°C. A eficiência máxima de degradação do substrato foi de 98,1% e o potencial máximo de produção de hidrogênio foi de 269,9 mL obtidos a 40°C. Portanto, a temperatura ideal para produção de hidrogênio foi de 40°C.

Akutsu et al. (2009b) avaliaram o efeito do TDH, pH e concentrações de substrato sobre a produção de hidrogênio em reatores UASB, utilizando amido como substrato, em condições termofílicas. Os autores obtiveram rendimento máximo de  $1,7 \text{ mol H}_2\text{.mol glicose}^{-1}$  e produção volumétrica de hidrogênio de  $0,075 \text{ L.L}^{-1}\text{.h}^{-1}$  em TDH de 48 horas.

Azbar et al (2009a), utilizando soro de queijo como substrato sob condições termofílicas em diferentes TDH (3,5, 2 e 1 dia) e DQO (21, 35 e 47g DQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) em reator CSTR, obtiveram em média 45% de hidrogênio no conteúdo de biogás, com produção volumétrica de 2,5 L.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> em TDH fixado em 1 dia. Já para DQO constante de 40g.L<sup>-1</sup> obtiveram rendimentos de hidrogênio de 22, 15 e 5 mmol H<sub>2</sub>.g<sub>DQO</sub> para os TDH de 3,5, 2 e 1, respectivamente.

Cakir; Ozmihci e Kargi (2010) avaliaram o efeito da temperatura sobre a produção de hidrogênio utilizando trigo hidrolisado como substrato. As maiores produções de H<sub>2</sub> foram de 752 mL em temperatura de 55°C.

Luo et al. (2010a) verificaram a influência da variação de temperatura em reator CSTR para produção de hidrogênio utilizando manipueira como fonte de substrato. Os autores verificaram que o rendimento de hidrogênio aumentaram de 14 mL H<sub>2</sub>.gSV em condição mesofílica para 69,6 mL H<sub>2</sub>.gSV sob condição termofílica e associaram esse aumento com a diminuição da concentração de propionato.

Luo et al. (2010b), utilizando manipueira como fonte de substrato, investigaram a influência da temperatura (37°, 60° e 70°C) sobre a produção fermentativa de hidrogênio. Embora tenha sido utilizado lodo mesofílico, o valor máximo de rendimento de hidrogênio (53,8 mol H<sub>2</sub>.gSV) foi obtido em condição termofílica (60°C), 53,5 e 198% superior aos encontrados em 37° e 70°C, respectivamente. Os autores justificaram as altas concentrações de ácidos acético e butírico ao alto rendimento de hidrogênio nesta condição.

Keskin; Aksöyek e Azbar (2011) avaliaram a produção de hidrogênio utilizando reator anaeróbio de leito fixo em condições termófilas (55°C) contendo anel de cerâmica e pedra-pomes como material suporte. Os reatores foram operados de forma contínua utilizando sacarose como fonte de carbono em diferentes tempos de detenção hidráulica (TDH). Em termos de produção volumétrica de hidrogênio, o melhor valor obtido foi utilizando anel de cerâmica com TDH de 1,5 h (2,981 H<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>). Entretanto, o reator com pedra-pomes resultou em 30% a menos de produção volumétrica (2,281 H<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) com TDH maior (3 h).

Kim et al. (2011) demonstraram o fraco desempenho para produção de hidrogênio a partir de resíduos de alimentos em temperatura mesofílica devido à produção de ácido láctico que inibiu o crescimento de bactérias produtoras de hidrogênio. Os autores verificaram que o biohidrogênio foi produzido de maneira eficaz em condição termofílica mesmo sem o pré-tratamento térmico do inóculo.

Obazu; Nigoma e Gray (2012) verificaram elevados valores de produção volumétrica de hidrogênio ( $231,3 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) e de rendimentos ( $3,55 \text{ mol H}_2.\text{mol glicose}^{-1}$ ) com o aumento da temperatura ( $70^\circ\text{C}$ ), redução do volume total do reator e aumento da taxa de reciclagem de efluentes desgaseificados, utilizando sacarose como substrato.

Khamtib e Reungsang (2012) investigaram o efeito da variação de temperatura ( $35^\circ$  a  $70^\circ\text{C}$ ) em reatores em batelada sobre a produção de hidrogênio utilizando xilose (concentração inicial de  $10.000\text{mg.L}^{-1}$ ) como fonte de substrato. Aumento no rendimento e produção volumétrica de hidrogênio foram observados com o aumento da temperatura de  $35^\circ$  a  $60^\circ\text{C}$ , entretanto, com temperatura superior a  $60^\circ\text{C}$ , esses valores diminuíram. Os valores máximos de rendimento e produção volumétrica de hidrogênio foram  $2,09 \text{ molH}_2.\text{mol}^{-1}$  xilose e  $3,95 \text{ mmol H}_2.\text{L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , respectivamente em  $60^\circ\text{C}$ . Ácidos acético e butírico foram os principais metabólicos detectados.

#### 3.4.5. Inóculo

A escolha do inóculo é importante para a seleção de micro-organismos e, portanto, para uma produção favorável de hidrogênio (TANG et al., 2008). Utilizando diferentes fontes de inóculo a um pH controlado pode resultar em diferentes porcentagens de metabólicos produzidos, tais como acetato e etanol, bem como quantidades diferentes de substrato consumido (ABREU et al., 2010). Os micro-organismos capazes de produzir  $\text{H}_2$  são facilmente encontrados no habitat natural, como no solo, lodo de tratamento de águas residuárias, adubo, entre outros. Assim, estes materiais podem ser usados como fonte potencial de inóculo para produção fermentativa de  $\text{H}_2$  (SINHA e PANDEY, 2011). Além disso, a diversidade de micro-organismos presentes no inóculo podem fornecer interações sinérgicas que podem melhorar a degradação de substrato e, assim, aumentando a produção de  $\text{H}_2$  (WONG, WU e JUAN, 2014).

O potencial para produção de hidrogênio de diversas culturas de inóculo foi explorado com diversas fontes de substratos. Conforme ilustrado na tabela 3.9, os membros de *Clostridium* e *Enterobacter* são amplamente utilizados como inóculo para produção fermentativa de hidrogênio. A maior parte dos estudos utilizaram culturas puras de bactérias e glicose como fonte de substrato.

Tabela 3.9: Culturas de bactérias utilizadas para produção fermentativa de hidrogênio.

<b>Inóculo</b>	<b>Substrato</b>	<b>Tipo de reator</b>	<b>Rendimento máximo de hidrogênio</b>	<b>Referência</b>
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Glicose	Batelada	2,0 mol.mol <sup>-1</sup> glicose	Chin, Chen e Chou (2003)
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC824	Glicose	Contínuo	1,08 mol.mol <sup>-1</sup> glicose	Zhang, Bruns e Logan (2006)
<i>Clostridium acetobutylicum</i> CGS5	Xilose	Batelada	0,73 mol.mol <sup>-1</sup> xilose	Lo et al. (2008)
<i>Clostridium acetobutylicum</i> GCS2	Amido	Batelada	9,95 mmol.g <sup>-1</sup> glicose	Chen et al. (2007)
<i>Clostridium pasteurianum</i> CH <sub>4</sub>	Sacarose	Batelada	2,07 mol.mol <sup>-1</sup> hexose	Lo et al. (2008)
<i>Clostridium thermolacticum</i>	Lactose	Contínuo	3,0 mol.mol <sup>-1</sup> lactose	Collet et al. (2004)
<i>Clostridium thermocellum</i> 27405	Celulose	Batelada	2,3 mol.mol <sup>-1</sup> glicose	Levin et al. (2006)
<i>Enterobacter aerogens</i> HO-39	Glicose	Batelada	1,0 mol.mol <sup>-1</sup> glicose	Yokoi et al. (1995)
<i>Enterobacter aerogens</i> NBRC 13534	Glicose	Batelada	0,05 mol.L <sup>-1</sup> glicose	Ogino et al. (2005)
<i>Enterobacter aerogens</i> HU-101	Glicerol	Batelada	0,6 mol.mol <sup>-1</sup> glicose	Nakashimada et al. (2002)
<i>Enterobacter aerogens</i>	Amido	Batelada	1,09 mol.mol <sup>-1</sup> glicose	Jo et al. (2008)
<i>Enterobacter aerogens</i> E 82005	Melaço	Contínuo	3,5 mol. mol <sup>-1</sup> açúcar	Tanisho e Ishiwata (1995)

Fonte: Adaptado de Sinha e Pandey (2011).

Tabela 3.9: Culturas de bactérias utilizadas para produção fermentativa de hidrogênio (Continuação).

Inóculo	Substrato	Tipo de reator	Rendimento máximo de hidrogênio	Referência
<i>Enterobacter cloacae</i> IIT-BT-08	Glicose	Contínuo	2,2 mol.mol <sup>-1</sup> glicose	Kumar e Das (2001)
<i>Enterobacter cloacae</i> IIT-BT-08	Sacarose	Batelada	6,0 mol. mol <sup>-1</sup> sacarose	Kumar e Das (2000)
<i>Escherichia Coli</i>	Glicose	Contínuo	2,0 mol.mol <sup>-1</sup> glicose	Turcot, Bisailon e Hallambeck (2008)
<i>Escherichia Coli</i> MC 13-4	Glicose	Batelada	1,2 mol.mol <sup>-1</sup> glicose	Ishikawa et al. (2006)
<i>Escherichia Coli</i>	Glicose	Batelada	2,0 mol.mol <sup>-1</sup> glicose	Bisailon, Turcot e Hallambeck, (2006)
<i>Escherichia Coli</i> XL1-Blue	Glicose	Batelada	0,96 mol.mol <sup>-1</sup> glicose	Sivagurunathan; Kumar e Lin (2014)
<i>Escherichia Coli</i> XL1-Blue	Frutose	Batelada	1,17 mol.mol <sup>-1</sup> frutose	Sivagurunathan; Kumar e Lin (2014)
<i>Escherichia Coli</i> XL1-Blue	Xilose	Batelada	0,69 mol.mol <sup>-1</sup> xilose	Sivagurunathan; Kumar e Lin (2014)
<i>Thermoanaerobacterium</i>	Glicose	Batelada	2,4 mol.mol <sup>-1</sup> glicose	Ueno et al. (2001)
<i>Thermosaccharolyticum</i>				
<i>Citrobacter amalonaticus</i> Y-19	Glicose	Batelada	2,49 mol.mol <sup>-1</sup> glicose	Oh et al. (2008)

Fonte: Adaptado de Sinha e Pandey (2011).

Tabela 3.9: Culturas de bactérias utilizadas para produção fermentativa de hidrogênio (Continuação).

Inóculo	Substrato	Tipo de reator	Rendimento máximo de hidrogênio	Referência
<i>Citrobacter</i> CDN-1	Glicose	Batelada	2,1 mol.mol <sup>-1</sup> glicose	Pandey et al. (2009)
<i>Enterobacter cloacae</i> DM11	Glicose	Batelada	3,31 mol. mol <sup>-1</sup> glicose	Nath, Kumar e Das (2006)
<i>Enterobacter cloacae</i> IIT-BT08	Sacarose	Batelada	3,01431 mol. mol <sup>-1</sup> sacarose	Kumar e Das (2000)
<i>Enterobacter cloacae</i> IIT-BT08	Glicose	Batelada	2,231 mol. mol <sup>-1</sup> glicose	Kumar e Das (2000)
<i>Ethanoligenens harbinense</i> B4	Glicose	Batelada	2,26 mol. mol <sup>-1</sup> glicose	Xu et al. (2008)
<i>Thermotoga neopolitana</i> DSM 4359	Xilose	Contínuo	3,36 mol. mol <sup>-1</sup> glicose	Ngo, Nguyen e Bui (2012)
<i>Thermotoga neopolitana</i> DSM 4359	Glicose	Batelada	331 mol. mol <sup>-1</sup> glicose	Ngo, Nguyen e Bui (2012)
<i>Thermotoga neopolitana</i> DSM 4359	Glicose	Batelada	3,531 mol. mol <sup>-1</sup> glicose	Vrije et al. (2010)
<i>Thermotoga neopolitana</i> DSM 4359	Frutose	Batelada	3,431 mol. mol <sup>-1</sup> glicose	Vrije et al. (2010)
<i>Thermotoga neopolitana</i> DSM 4359	Glicose + Frutose	Batelada	3,331 mol. mol <sup>-1</sup> glicose	Vrije et al. (2010)
<i>Thermotoga neopolitana</i>	Soro de queijo	Batelada	5,8 mmolH <sub>2</sub> .g <sup>-1</sup> lactose	Frasconi et al. (2013)

Fonte: Adaptado de Sinha e Pandey (2011).

Entretanto, os micro-organismos presentes no inóculo consistem geralmente em produtores de H<sub>2</sub> e consumidores de H<sub>2</sub>. Assim, é necessário eliminar a atividade das bactérias consumidoras de H<sub>2</sub>, a fim de aumentar a produção de H<sub>2</sub> pelas bactérias produtoras de H<sub>2</sub> (WONG, WU e JUAN, 2014).

O tratamento térmico do inóculo é o método mais utilizado para preparação do inóculo por remover células vegetativas metanogênicas, enriquecendo, portanto, as culturas produtoras de hidrogênio. Ainda a fim garantir um alto rendimento de produção de H<sub>2</sub>, é fundamental também impedir o crescimento de bactérias metanogênicas consumidoras de hidrogênio. Alguns parâmetros são fundamentais para o controle do desenvolvimento dessas bactérias, como por exemplo, operar sistemas com curto tempo de retenção celular e baixo pH (LIN e CHANG, 1999; NOIKE e MIZUNO, 2000; MU; YU e WANG, 2007).

O pré-tratamento de inóculo por cinco métodos foi realizada por Wang e Wan (2008b) em testes bateladas a fim de avaliar e comparar sua adequação no enriquecimento de bactérias produtoras de hidrogênio. Em todos os testes para produção de hidrogênio a partir de glicose, o inóculo tratado por choque térmico apresentou maior potencial para produção de hidrogênio, bem como maior eficiência de degradação de substrato.

O-Thong; Prasertsan e Birkeland (2009) avaliaram cinco métodos de tratamento de inóculo para melhor desempenho em produção de hidrogênio em condição termofílica. Os resultados mostraram que os melhores métodos foram os tratamentos ácido e térmico para o enriquecimento de culturas termófilas para produção de hidrogênio, uma vez que toda a atividade metanogênica foi contida. Os tratamentos térmico e ácido resultaram ainda na predominância de espécies *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, ácidos acético e butírico.

## CAPÍTULO 4

### Materiais e Métodos

Neste capítulo estão apresentados a fonte de inóculo empregada para a produção biológica de  $H_2$ , o método adotado de pré-tratamento, bem como a configuração do sistema utilizado para o desenvolvimento da parte experimental, juntamente com os procedimentos de partida e condições operacionais dos reatores termofílicos. Estão apresentados ainda a caracterização da águas residuárias ao longo do experimento, o detalhamento e a frequência das análises físico-químicas e os cálculos dos principais parâmetros para avaliar a produção biológica de hidrogênio.

#### 4.1. Inóculo

A fonte de inóculo utilizada para a partida operacional do reator termofílico foi proveniente de lodo granular de reator anaeróbico de fluxo ascendente de manda de lodo (UASB) termofílico, localizado na Usina São Martinho, em Pradópolis, SP, Brasil, para o tratamento de vinhaça. Foram observados valores de pH 7,06 e  $41,3 \text{ g.L}^{-1}$  para a concentração de sólidos voláteis totais no inóculo. Foi realizado o pré-tratamento térmico da biomassa conforme a metodologia adaptada proposta por Kim, Han e Shin (2006), promovendo a eliminação de células vegetativas metanogênicas, inibindo a metanogênese, e favorecendo a permanência de células acidogênicas por meio da formação de endósporos.

#### 4.2. Águas residuárias

Os reatores foram alimentados com águas residuárias, composta por soro de queijo como principal fonte de carbono. O soro de queijo em pó utilizado como substrato foi fornecido pela Indústria Cargill Agrícola S/A, que faz o processamento, distribuição de produtos e serviços aos parceiros nos setores agrícola, alimentícia, industrial, financeiro e de gerenciamento de risco. Nas tabelas 4.1 e 4.2, fornecidas pela Cargill Agrícola S/A, são apresentadas as especificações e informações nutricionais do soro de queijo. Nutrientes foram adicionados de acordo com Del Nery (1987), nas seguintes relações ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) apresentadas da tabela 4.3.

Tabela 4.1 – Especificações do soro de queijo em pó

Umidade(%)	Máx 4,5
pH (1:9)*	Min. 6
Cinzas (%)	Máx. 10
Bactérias mesófilas (UFC/g)	Máx. 30.000
Coliformes fecais (UFC/g)	Máx. 10
<i>Salmonella sp</i> (/25g)	ausente
<i>Staphylococcus aureus</i> (/g)	Máx. 100

(\*) - Fator de diluição.

Tabela 4.2- Informação nutricional (porção de 100 gramas)

<b>Valor energético</b>	<b>380 Kcal( 1590 kj)</b>
Carboidratos	73,9 g
Proteínas	12,5 g
Gorduras Totais	3,8 g
Gorduras Saturadas	2,3 g
Gorduras Trans	0,1 g
Fibra Alimentar	Menor 0,5 g
Sódio	1205,05 mg

O soro de queijo em pó foi diluído para as concentrações definidas de 5000 mg DQO.L<sup>-1</sup> (R<sub>1</sub>) e de 3000 a 10000 mg DQO.L<sup>-1</sup> (R<sub>2</sub>) e foi adicionado HCl, para se realizar o controle do pH do afluente na faixa de 5,5 a 6,0.

Tabela 4.3: Nutrientes adicionados às águas residuárias

Composto	Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )
Uréia	125,0
Sulfato de Níquel	1,0
Sulfato ferroso	5,0
Cloreto férrico	0,5
Cloreto de cálcio	47,0
Cloreto de cobalto	0,08
Óxido de Selênio	0,07
Fosfato de potássio monibásico	85,0
Fosfato de potássio dibásico	21,7
Fosfato de sódio dibásico	33,4

Fonte: Del Nery, 1987

### 4.3. Operação dos reatores anaeróbios de leito fluidificado

Neste estudo foram utilizados dois reatores semelhantes ( $R_1$  e  $R_2$ ) construídos em aço inox que apresentavam as seguintes dimensões: altura de 150 cm e diâmetro interno de 4,1 cm, com volume total de 1980 cm<sup>3</sup>, conforme ilustrado na figura 4.1 (configuração idêntica para ambos reatores), preenchido com partículas de argila expandida (figura 4.2) com diâmetro entre 2,80 e 3,35mm, densidade real de 1,5g.cm<sup>-3</sup>, e porosidade de 23% como material suporte de imobilização e adesão de biomassa. Foram utilizadas aproximadamente 520g de argila expandida. As características físicas da argila expandida são apresentadas na tabela 4.4 e estão de acordo com Ortega et al. (2001). A temperatura do sistema foi mantida a 55 ±1°C.

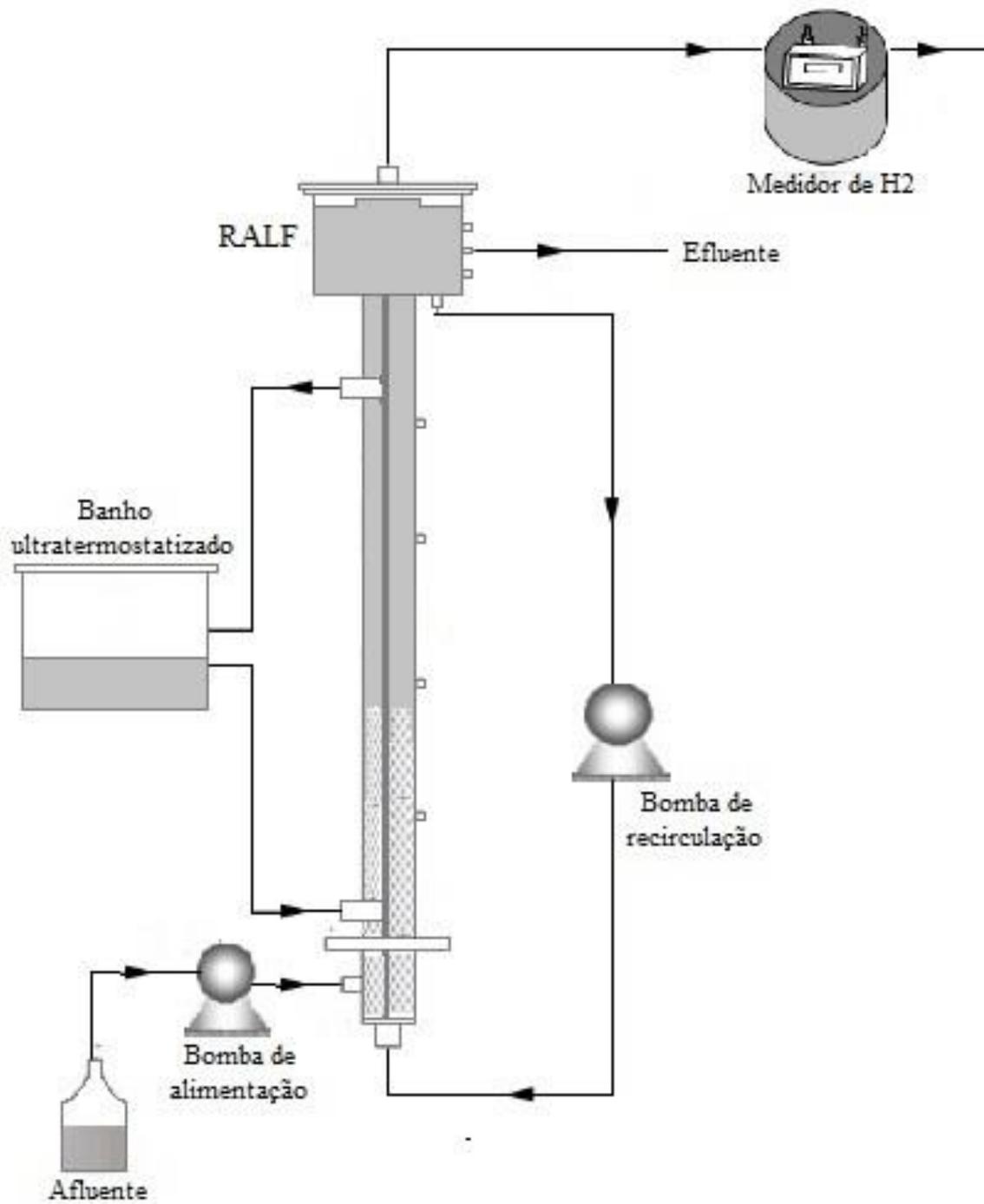


Figura 4.1: Esquema ilustrativo da instalação do reator anaeróbio de leito fluidificado.

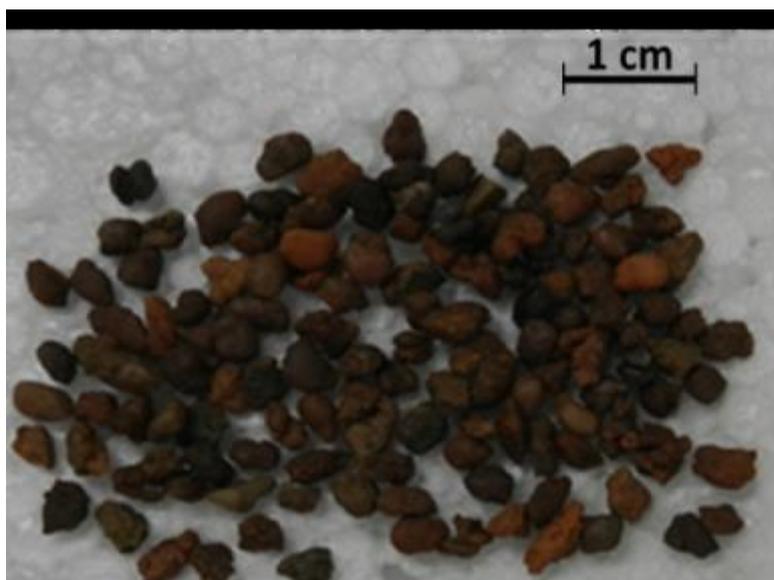


Figura 4.2: Fotografia das partículas de argila expandida selecionadas para utilização como suporte para aderência das populações microbianas.

Tabela 4.4: Características físicas da argila expandida

Fonte: Ortega et al. (2001)

<b>Características</b>	<b>Valor</b>
Densidade real ( $\text{g.cm}^{-3}$ )	1,50
Densidade aparente ( $\text{g.cm}^{-3}$ )	1,06
Diâmetro médio do poro ( $\mu\text{m}$ )	0,19

Antes de serem adicionadas aos reatores, as partículas de argila expandida foram lavadas com água e selecionadas. Posteriormente, foram lavadas novamente e secas em estufa a  $40^{\circ}\text{C}$ .

As condições fluidodinâmicas do reator, tais como velocidade de mínima fluidificação 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). Características como dimensão, densidade e velocidade de mínima fluidificação são apresentadas na tabela 4.5. A vazão de recirculação nos biorreatores termofílicos foi mantida em  $76,58 \text{ L.h}^{-1}$  (expansão = 30%), e velocidade superficial 1,30 vez maior que a velocidade mínima de fluidização.

Tabela 4.5: Dimensão, densidade e velocidade mínima de fluidização para as partículas de argila expandida.

<b>Partícula</b>	<b>Dimensão (mm)</b>	<b>Densidade (g.cm<sup>-3</sup>)</b>	<b>V<sub>mf</sub> (cm.s<sup>-1</sup>)</b>
Argila expandida	2,8-3,35	1,50	1,24

Os reatores foram preenchidos com as partículas de material suporte. Posteriormente, houve o acionamento das bombas dosadoras (ECOSAN), alimentando os reatores com soro de queijo em pó diluído nas concentrações estipuladas (5000 mg em R<sub>1</sub> e 3000 mg em R<sub>2</sub>) e lodo pré-tratado (10%), deixando os reatores permanecerem em recirculação, operado no modo batelada, com vazão de recirculação correspondente a 1,3 vezes a vazão mínima de fluidificação por 72 horas. O pH inicial quando ocorreu a partida dos sistemas foi de 5,5. Nesta fase, foram monitoradas as concentrações de lactose dos reatores e, em seguida, foram acopladas as mangueiras de alimentação, passando assim a operar os sistemas continuamente com TDH de 8 e 6 horas para R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub>, respectivamente. As condições anaeróbias foram garantidas pelo uso de nitrogênio.

Quando era alcançado o estado estacionário (variação inferior a 10% na produção de hidrogênio), era realizado a redução de TDH em R<sub>1</sub> em 8, 6, 4, 2, 1 e 0,5 hora. Para R<sub>2</sub> era realizado o aumento da DQO aplicada em 3000, 5000, 7000 e 10000 mg DQO.L<sup>-1</sup>.

O reator R<sub>1</sub> foi operado por 226 dias (tabela 4.6), divididos em 6 fases, com concentração de 5000 mg DQO.L<sup>-1</sup> e redução de TDH de 8, 6, 4, 2, 1 e 0,5 horas, aumentando conseqüentemente a taxa de carregamento orgânico (TCO) em 25, 35, 50, 85, 190 e 380 Kg<sub>DQO</sub>.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>. O reator R<sub>2</sub> foi operado por 146 dias (tabela 4.7), divididos em 4 fases (tabela 4.5), com o aumento da concentração de 3000, 5000, 7000 e 10000 mg DQO.L<sup>-1</sup> e TDH fixado em 6 horas, resultando no aumento da taxa de carregamento orgânico de 18, 35, 47 e 70 Kg<sub>DQO</sub>.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>. O pH foi controlado com HCl e mantido em 4-4,5.

Tabela 4.6: Condições operacionais impostas ao RALF termofílico ( $R_1$ ) para a produção de  $H_2$  a partir de soro de queijo, a  $5000 \text{ mg DQO.L}^{-1}$ , e taxas de carregamento orgânico (TCO) aplicadas.

$R_1$			
Fase	TDH (h)	Concentração ( $\text{mg DQO. L}^{-1}$ )	TCO ( $\text{kg DQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ )
1	8	5000	25
2	6	5000	35
3	4	5000	50
4	2	5000	85
5	1	5000	190
6	0,5	5000	380

Tabela 4.7: Condições operacionais impostas ao RALF termofílico ( $R_2$ ) para a produção de  $H_2$  a partir de soro de queijo, com TDH de 6 horas, e taxas de carregamento orgânico (TCO) aplicadas.

$R_2$			
Fase	TDH (h)	Concentração ( $\text{mg DQO. L}^{-1}$ )	TCO ( $\text{kg DQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ )
1	6	3000	18
2	6	5000	35
3	6	7000	47
4	6	10000	70

#### 4.4. Métodos Analíticos

A produção volumétrica de todo o biogás formado no reator foi medida por meio de medidor de gás (tipo TG-1, Ritter Inc.®, Alemanha). O medidor forneceu a vazão total de biogás, sendo este valor multiplicado pela concentração de  $H_2$  para se obter a produção volumétrica de  $H_2$ .

A determinação do gás hidrogênio foi feita por cromatografia gasosa (Shimadzu GC-2010), sendo o aparelho equipado com detector de condutividade térmica, utilizando a coluna Supelco Carboxen 1010 Plot (30 m de comprimento e diâmetro

interno de 0,53 mm). Para tanto, foram retiradas amostras triplicatas de 0,1 mL da fase gasosa do *headspace* do reator em operação (seringa *gastigh* com trava). O gás de arraste na cromatografia gasosa foi o argônio, sob velocidade de 21,9 cm.s<sup>-1</sup>. As temperaturas do forno, da coluna e do detector foram de 30, 200 e 230°C, respectivamente.

Amostras afluentes e efluentes foram coletadas para análises físico-químicas e metabólicas ao longo de todo o período operacional do reator. As concentrações dos ácidos orgânicos (cítrico, málico, succínico, láctico, fórmico, acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico, e capróico) e álcoois (etanol e metanol) foram determinadas por cromatografia líquida (HPLC Shimadzu) equipado com uma bomba (LC-10ADVP), auto amostrador (SIL-20A HT), forno de coluna (CTO-20A) a 43°C, detector de índice de refração (RID-10A), controlador de sistema (SCL-10AVP) e coluna HPX-87H Aminex (300 milímetros, 7,8 milímetros, BioRad) . A fase móvel consistiu de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,01 N). Os limites de detecção (mg L<sup>-1</sup>) para cada ácido orgânico e para o etanol foram: ácido succínico: 6,37; ácido láctico: 3,43; ácido acético: 3,36; ácido propiônico: 12,77; ácido butírico: 6,91; ácido iso-butírico: 4,10 e etanol: 19,28.

As análises de sólidos suspensos totais (SST), sólidos suspensos voláteis (SSV), pH e demanda química de oxigênio (DQO) foram realizadas de acordo com o APHA: Standard Methods for the Examinations of Water and Wastewater (2012). A determinação de carboidratos totais foi realizada em triplicata por método colorimétrico de acordo com Dubois et al. (1956). Ao longo do procedimento operacional dos reatores termofílicos, foram realizadas análises físico-químicas para o monitoramento dos mesmos. A tabela 4.8 apresenta a frequência de coleta e análise de amostras para todas as fases deste estudo.

Tabela 4.8: Análises realizadas em amostras coletadas nas fases operacionais de R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub>.

Análises	Frequência
pH, vazão, altura e temperatura do leito	Diária
Carboidratos totais e demanda química de oxigênio	3x semana
Produção, rendimento e conteúdo de H <sub>2</sub> no biogás	3x semana
Ácidos orgânicos	3x semana
Sólidos suspensos (totais, fixos e voláteis)	3x semana

#### 4.5. Cálculo dos principais parâmetros

Nesse item serão apresentados os principais cálculos realizados para a execução desse estudo, os quais abrangem a taxa de carregamento orgânico aplicada teórica (1), a produção volumétrica (2), o rendimento de hidrogênio (3), a taxa de carregamento orgânico aplicada real (4) e conversão de carboidrato (5).

$$(1) \text{ Taxa de carregamento orgânico} = \left[ \frac{\text{concentração do substrato (g.L}^{-1}\text{)}}{\text{TDH teórico (dias)}} \right] \text{KgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$$

(TCO aplicada teórica)

$$(2) \text{ Produção volumétrica de H}_2 = \left[ \frac{\left( \frac{\text{Quantidade de H}_2 \text{ (L) produzida}}{\text{tempo (h)}} \right)}{\text{Volume real (L) do reator}} \right] \text{LH}_2.\text{h}^{-1}.\text{L}^{-1}$$

(PVH)

$$(3) \text{ Rendimento de hidrogênio} = \left[ \frac{\text{quantidade (mol) de H}_2 \text{ produzido}}{\text{quantidade (mol) de lactose consumido}} \right] \text{molH}_2.\text{mol}^{-1} \text{ lactose}$$

(HY)

$$(4) \text{ Taxa de carregamento orgânico} = \left[ \frac{\text{concentração do substrato (g.L}^{-1}\text{)}}{\text{TDH real (dias)}} \right] \text{KgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$$

(TCO aplicada real)

$$(5) \text{ Conversão de carboidrato} = 100 \times \left[ \frac{(\text{Carboidrato afluyente} - \text{carboidrato efluyente})}{\text{carboidrato afluyente}} \right]$$

## CAPÍTULO 5

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo foram expressos os principais resultados dos parâmetros analisados durante a operação do reator. As principais informações foram ilustradas por meio de figuras e tabelas, a fim de facilitar a interpretação de dados. O trabalho foi realizado em dois reatores anaeróbios de leito fluidificado termofílico ( $R_1$  e  $R_2$ ), realizado em seis e quatro etapas, respectivamente, denominadas fases  $R_{1,1}$ ,  $R_{1,2}$ ,  $R_{1,3}$ ,  $R_{1,4}$ ,  $R_{1,5}$ ,  $R_{1,6}$ ,  $R_{2,1}$ ,  $R_{2,2}$ ,  $R_{2,3}$ ,  $R_{2,4}$ . As fases de  $R_1$  foram de acordo com os tempos de detenção hidráulica de 8, 6, 4, 3, 2, 1 e 0,5 horas, todas com concentração fixa de  $5000 \text{ mg}_{\text{DQO}} \cdot \text{L}^{-1}$ . Já as fases de  $R_2$  foram de acordo com as concentrações de 3000, 5000, 7000 e  $10000 \text{ mg}_{\text{DQO}} \cdot \text{L}^{-1}$ , todas com TDH fixo de 6 horas. Os resultados apresentados são os valores médios das análises realizadas em cada etapa.

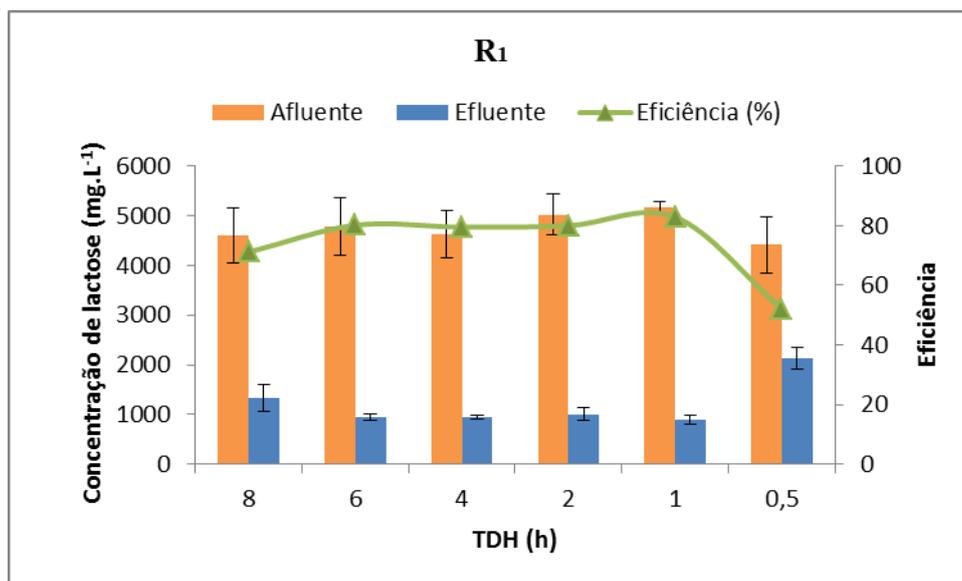
#### 5.1. Conversão de carboidrato

Para o reator  $R_1$ , foi avaliado o efeito do TDH aplicado de 8, 6, 4, 2, 1 e 0,5 horas sobre a produção de hidrogênio. Na figura 5.1 é ilustrado o comportamento da concentração de afluente, efluente e eficiência de conversão de lactose durante todas as fases para estes reatores.

A conversão de substrato para o TDH de 8 para 6 horas teve um aumento de 71 para 80%. Entre os TDH de 6 a 1 hora, essa conversão manteve-se estável entre 79 e 83%, sendo que para o TDH de 1 hora se obteve a maior eficiência de conversão (83%), entretanto, com a diminuição do TDH para 0,5 hora, a conversão de lactose apresentou uma queda, atingindo seu menor valor, chegando a 52%.

A diminuição da conversão de lactose sob o TDH de 0,5h mostra que sob esse tempo de detenção hidráulica não houve condições para maiores valores de degradação. Um TDH muito baixo pode ocasionar limitações cinéticas no consumo de lactose.

Figura 5.1 – Comportamento da concentração média de carboidrato afluente e efluente, e eficiência de conversão de carboidratos em função do TDH.



Para o reator R<sub>2</sub>, foi avaliado o efeito da concentração de 3000, 5000, 7000 e 10000 mg<sub>DQO</sub>.L<sup>-1</sup> sobre a produção de hidrogênio. A figura 5.2 ilustra o comportamento da concentração de afluente, efluente e conversão de lactose para estes reatores.

A conversão de substrato para a concentração de soro de queijo afluente de 3000, 5000, 7000 e 10000 mg<sub>DQO</sub>.L<sup>-1</sup> manteve-se estável entre DQO de 3000 e 5000 mg<sub>DQO</sub>.L<sup>-1</sup> com 84 e 85%, respectivamente. Entre as concentrações de 5000 e 7000 mg<sub>DQO</sub>.L<sup>-1</sup> houve uma pequena queda de 85 para 80%. Com o aumento da concentração para 10000 mg<sub>DQO</sub>.L<sup>-1</sup>, a conversão de lactose apresentou uma queda, chegando a 22%. Na tabela 5.1 são apresentados os valores médios obtidos de conversão de lactose para R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> durante a operação.

Em ambos os reatores foram altas as conversões de carboidratos em algumas fases operacionais, atribuídas aos baixos valores verificados de concentração efluente. Entretanto, o R<sub>1</sub> apresentou baixa eficiência de conversão de lactose para TDH baixos (0,5 h) e R<sub>2</sub> baixa eficiência em altas concentrações (10000 mg<sub>DQO</sub>.L<sup>-1</sup>). Aparentemente, tanto o TDH quanto a concentração de substrato influenciam fortemente na conversão de substrato.

Figura 5.2 – Comportamento da concentração média de carboidrato afluente e efluente, e a conversão de carboidratos em função da concentração.

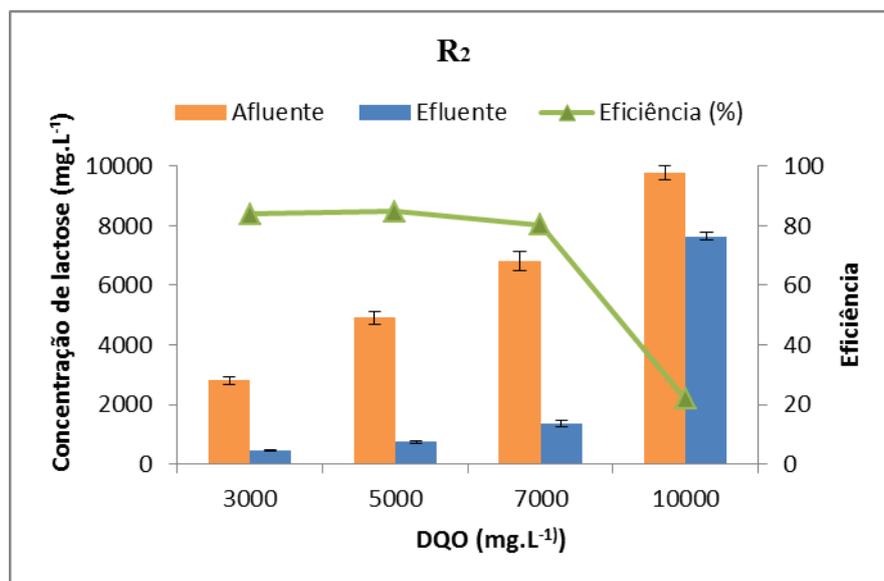


Tabela 5.1: Valores médios obtidos de conversão de lactose para R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub>.

Fases	TDH (h)	DQO (mg.L <sup>-1</sup> )	Lactose afluente (mg.L <sup>-1</sup> )	Lactose efluente (mg.L <sup>-1</sup> )	Conversão de lactose (%)
<b>R<sub>1</sub></b>					
R <sub>1,1</sub>	8	5000	4596±550,8	1325±265,4	71±4,61
R <sub>1,2</sub>	6	5000	4795±580,13	950±265,4	80±2,54
R <sub>1,3</sub>	4	5000	4621±481,4	944±60,9	79±2,11
R <sub>1,4</sub>	2	5000	5020±409,4	943±43,5	80±2,39
R <sub>1,5</sub>	1	5000	5169±125,9	882±89,9	83±1,38
R <sub>1,6</sub>	0,5	5000	4414±559,4	2119±219,5	52±4,12
<b>R<sub>2</sub></b>					
R <sub>2,1</sub>	6	3000	2798±128,9	453±9,8	84±0,76
R <sub>2,2</sub>	6	5000	4910±210,5	749±42,9	85±1,42
R <sub>2,3</sub>	6	7000	6815±323,3	1344±114,0	80±0,47
R <sub>2,4</sub>	6	10000	9775±242,1	7617±242,1	22±1,34

Resultados similares foram obtidos por Fang e Yu (2001) que, utilizando reator ascendente e lactose como fonte de substrato, investigaram os efeitos do TDH (2-24h) e concentração de lactose (2-30g DQO.L<sup>-1</sup>) sobre a produção de hidrogênio. Em pH 5,5, 37°C e concentração afluente de 4g.L<sup>-1</sup>, a conversão de lactose foi de 83% em TDH de

2 horas. Já em TDH fixo de 12 horas, a conversão de lactose teve queda de 94% em concentração afluyente de  $2000\text{mg.L}^{-1}$  para 84% em  $30000\text{ mg.L}^{-1}$ . O mesmo comportamento foi obtido por Yu e Fang (2001) que, utilizando água residuária do processamento de queijo em reator UASB, obtiveram queda na conversão de carboidrato de 99,2 para 86,2% com o aumento da concentração de substrato de 2 para  $30\text{ g.L}^{-1}$ .

A verificação e a comprovada viabilidade da produção de hidrogênio, mesmo em situações de eficiências incompletas de conversão de carboidratos totais, também foram observadas por outros autores. Rosa et al. (2014), utilizando reator anaeróbio de leiteo fluidificado (RALF) mesofílico e soro de queijo como substrato, obteve rendimento de  $1,21\text{ molH}_2.\text{mol}^{-1}$  lactose, com conversão de carboidrato entre 85 e 95% com a variação de TDH de 4 a 1 hora e concentração afluyente de  $5000\text{ mg}_{\text{DQO}}.\text{L}^{-1}$ .

A temperatura também pode ser um fator de influência na conversão de carboidratos. Kargi, Eren e Ozmihci (2012b) compararam a produção de hidrogênio, utilizando soro de queijo como substrato ( $10,77\text{ g.L}^{-1}$ ) em testes realizados em bateladas, em condição mesofílica ( $35^\circ\text{C}$ ) e termofílica ( $55^\circ\text{C}$ ). Na condição mesofílica, o consumo de carboidrato diminuiu de forma constante em um período curto de tempo, enquanto que em condição termofílica, esse consumo levou um período maior de tempo.

## 5.2. Remoção da demanda química de oxigênio

Os valores da DQO do afluyente, efluyente e redução da DQO nos reatores  $R_1$  e  $R_2$  são apresentados nas figuras 5.3 e 5.4, respectivamente.

A concentração média afluyente foi próxima de  $5109\text{ mg}_{\text{DQO}}.\text{L}^{-1}$  em todas as fases operacionais de  $R_1$ . No TDH de 8 horas, a eficiência de redução de DQO foi de 32,5%, tendo uma queda no TDH de 6 horas. Entre os TDH de 6 e 2 horas, essa remoção mante-se estável próximas de 27,0%. Com a diminuição do TDH para 1 hora, houve aumento de 26,4 para 33,4%, entretanto, para o TDH de 0,5 hora, a remoção apresentou queda, chegando a 15,7%. As concentrações médias afluyentes, efluyentes e eficiência de remoção são apresentadas na tabela 5.2. Azbar et al. (2009a), utilizando soro de queijo como substrato em reator CSTR, obtiveram remoção média de DQO de 27,0%, resultados similares a este estudo. Yu e Fang (2001), utilizando reator ascendente a  $55^\circ\text{C}$  e utilizando água residuária do processamento de queijo (DQO de  $4000\text{ mg.L}^{-1}$ ),

obtiveram remoção de DQO de 6,5% em TDH de 4 horas e 15,2% em TDH de 24 horas. Intanoo et al. (2012) sugerem que maiores taxas de carregamento orgânico ocasionam em aumento de AVT, acarretando um decréscimo na eficiência de remoção da matéria orgânica.

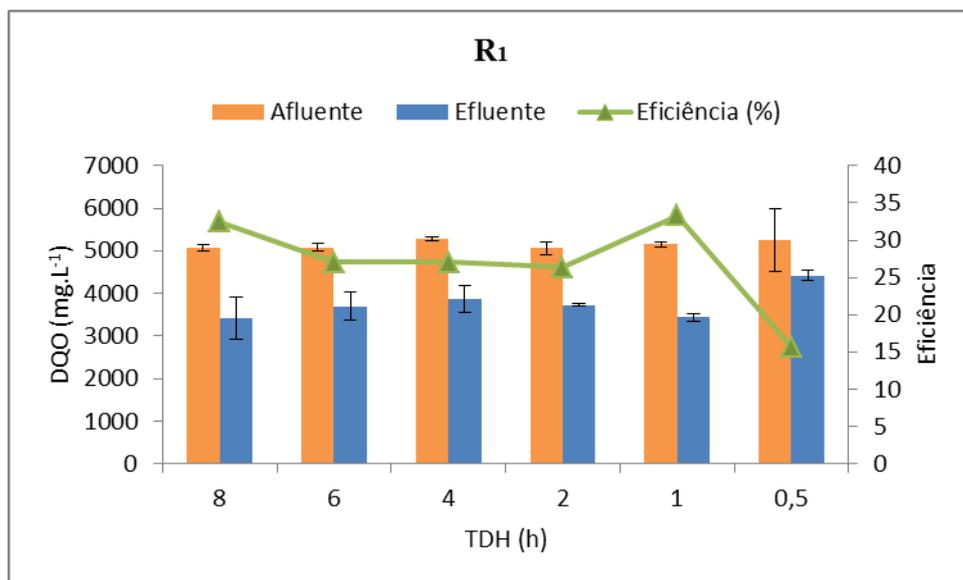


Figura 5.3- Valores de DQO afluente, efluente e eficiência de remoção em R<sub>1</sub>.

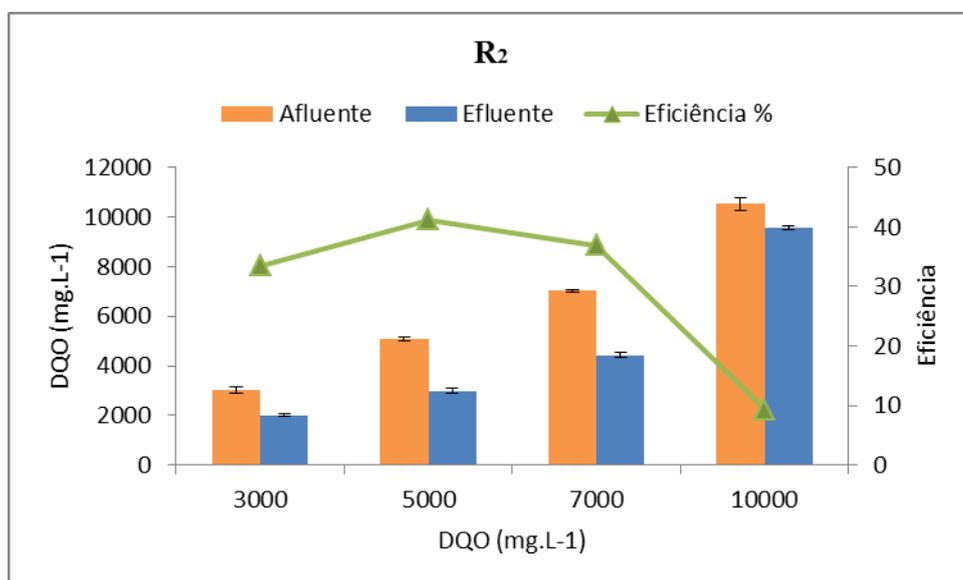


Figura 5.4- Valores de DQO afluente, efluente e eficiência de remoção em R<sub>2</sub>.

O consumo de substrato para a concentração de soro de queijo afluente de 3000 mg<sub>DQO</sub>.L<sup>-1</sup> foi de 33,4%. Para a concentração de 5000 mg<sub>DQO</sub>.L<sup>-1</sup>, houve um aumento para 41,2%, entretanto para 7000 e 10000 mg<sub>DQO</sub>.L<sup>-1</sup> a remoção de DQO reduziram para

36,9 e 9,3%, respectivamente. As concentrações afluentes tiveram médias de 3025, 5092, 7031 e 10534  $\text{mg}_{\text{DQO}}\cdot\text{L}^{-1}$  e as concentrações efluentes tiveram médias de 2014, 2993, 4439, 9554  $\text{mg}_{\text{DQO}}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectivamente. As concentrações médias afluentes, efluentes e eficiência de remoção de DQO são apresentadas na tabela 5.2.

Utilizando soro de queijo em reator de leito fixo, Perna et al. (2013) avaliaram o efeito da concentração de substrato em TDH fixo de 24 horas sobre a produção de hidrogênio. Ao aplicar uma TCO de  $22\text{g}_{\text{DQO}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  obteve remoção de DQO de 16,5%. Ao aplicar uma carga de  $24\text{g}_{\text{DQO}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ , alcançou remoção máxima de 31,7%, resultados similares a este trabalho, entretanto, com o aumento de TCO de 24 para 37  $\text{g}_{\text{DQO}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ , a eficiência de remoção caiu para 18%. Os autores justificaram a baixa remoção devido, principalmente, à produção dos ácidos acético, butírico e lático.

A temperatura também pode ser um fator de influência sobre a remoção de DQO. Azbar et al. (2009b), utilizando soro de queijo como substrato em testes bateladas, avaliaram a remoção de DQO em condição mesofílica e termofílica. Em condição mesofílica, a eficiência de remoção de DQO variou de 43-90%, já em condição termofílica, a remoção foi obtida em uma faixa de 27-56%.

Tabela 5.2: Concentrações médias afluentes, efluentes e eficiência de remoção de DQO em  $R_1$  e  $R_2$ .

Fases	TDH (h)	DQO ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	DQO afluente ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	DQO efluente ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Remoção de DQO (%)
<b><math>R_1</math></b>					
$R_{1,1}$	8	5000	$5069,7\pm 89,2$	$3424,5\pm 502,1$	$32,5\pm 7,3$
$R_{1,2}$	6	5000	$5071,4\pm 89,7$	$3699,0\pm 338,1$	$27\pm 1,4$
$R_{1,3}$	4	5000	$5282,5\pm 54,0$	$3856,3\pm 313,3$	$27\pm 0,8$
$R_{1,4}$	2	5000	$5059,1\pm 147,7$	$3725,2\pm 22,6$	$26,4\pm 3,7$
$R_{1,5}$	1	5000	$5151,2\pm 66,5$	$3433,5\pm 90,6$	$33,4\pm 0,3$
$R_{1,6}$	0,5	5000	$5243,8\pm 741,4$	$4419\pm 127,6$	$15,7\pm 1,5$
<b><math>R_2</math></b>					
$R_{2,1}$	6	3000	$3025,8\pm 121,8$	$2014,2\pm 59,7$	$33,4\pm 2,2$
$R_{2,2}$	6	5000	$5092,2\pm 71,8$	$2993,9\pm 90,1$	$41,2\pm 0,3$
$R_{2,3}$	6	7000	$7031,2\pm 44,7$	$4439,2\pm 90,2$	$36,9\pm 0,4$
$R_{2,4}$	6	10000	$10534,4\pm 261,1$	$9554,2\pm 66,6$	$9,3\pm 2,4$

### 5.3. Variação de pH

Os valores de pH no afluente e efluente mantiveram-se similares durante todas as fases operacionais nos dois reatores, com valores médios de 5,7 e 4,3 nos afluentes e efluentes para R<sub>1</sub>, respectivamente e 5,3 e 4,3 nos afluentes e efluentes de R<sub>2</sub>. Ao longo das fases operacionais não foram verificadas modificações nos valores de pH, evitando assim alterações nas inter-relações microbianas, no metabolismo e na competição pelo substrato.

As figuras 5.5 e 5.6 ilustram a variação do pH ao longo das etapas de R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub>, respectivamente. O pH apresentou-se dentro da faixa estabelecida devido ao controle através da adição de ácido clorídrico no afluente.

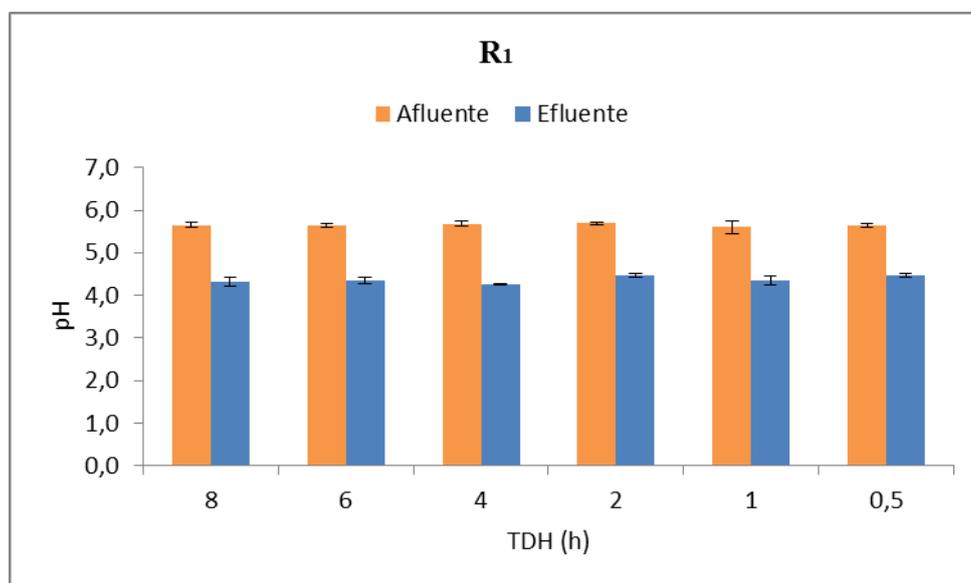


Figura 5.5: Variação do pH em função do TDH para R<sub>1</sub>.

Poggi-Varaldo (2009) afirmaram que o pH é um fator de grande impacto sobre a produção anaeróbia de hidrogênio, uma vez que afeta a atividade da hidrogenase e as vias metabólicas. Ferchichi et. al.(2005) avaliaram a produção de hidrogênio utilizando soro de queijo em reator operado em modo batelada, variando o pH entre 5 e 10. Essa variação influenciou a máxima taxa e um maior rendimento na produção de hidrogênio, sendo que em pH mais baixos foram encontrados melhores resultados. A melhor taxa de produção e o maior rendimento foi encontrado para pH 6. Outros trabalhos apresentam conclusões similares de que o aumento de pH do substrato resultam na diminuição da produção de hidrogênio (LEE; MIYAHARA e NOIKE, 2002; WU e LIN, 2004).

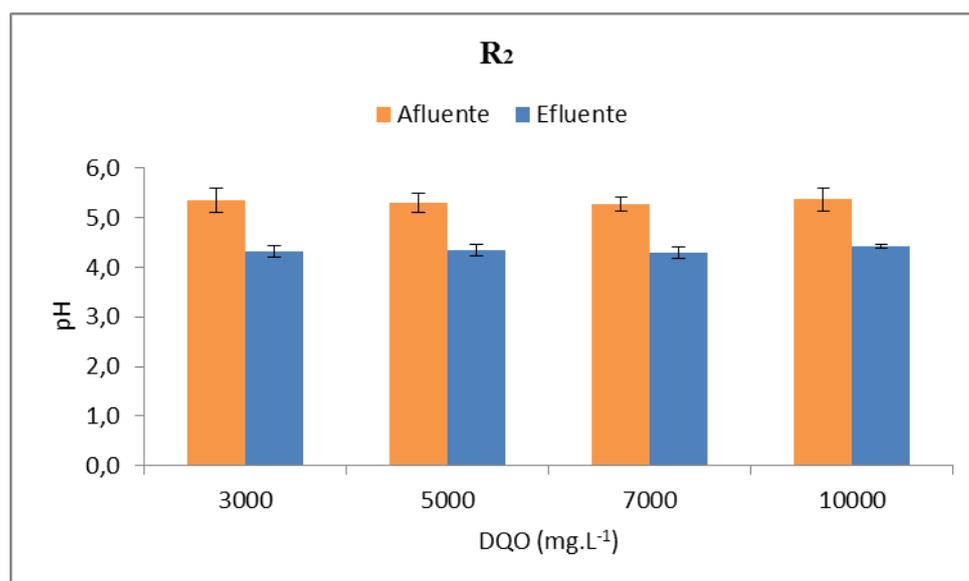


Figura 5.6: Variação do pH em função da concentração para R<sub>2</sub>.

Os valores médios de pH durante todas as fases operacionais de R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> estão apresentados na tabela 5.3.

Tabela 5.3: Valores médios de pH durante as fases operacionais de R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub>.

Fases	TDH (h)	DQO (mg.L <sup>-1</sup> )	pH afluente	pH efluente
<b>R<sub>1</sub></b>				
R <sub>1,1</sub>	8	5000	5,6±0,1	4,3±0,1
R <sub>1,2</sub>	6	5000	5,6±0,1	4,4±0,1
R <sub>1,3</sub>	4	5000	5,7±0,1	4,3±0,1
R <sub>1,4</sub>	2	5000	5,7±0,1	4,5±0,1
R <sub>1,5</sub>	1	5000	5,6±0,2	4,3±0,2
R <sub>1,6</sub>	0,5	5000	5,6±0,1	4,5±0,2
<b>R<sub>2</sub></b>				
R <sub>2,1</sub>	6	3000	5,4±0,3	4,3±0,1
R <sub>2,2</sub>	6	5000	5,3±0,2	4,3±0,1
R <sub>2,3</sub>	6	7000	5,3±0,1	4,3±0,1
R <sub>2,4</sub>	6	10000	5,4±0,2	4,4±0,1

Perna et al. (2013), utilizando reator anaeróbico de fluxo ascendente com soro de queijo como substrato, verificaram que valores de pH superiores a 5,0 tiveram efeito

positivo sobre a produção de hidrogênio, alcançando em seus experimentos, valores de até  $1,0 \text{ LH}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ . A maior taxa de produção de hidrogênio foi obtida em pH 5,6 e nenhum metano foi verificado.

#### 5.4. Sólidos suspensos

Nas figuras 5.7 e 5.8 são apresentadas as porcentagens de sólidos suspensos voláteis nos efluentes dos reatores ao longo das fases operacionais. Na tabela 5.4 são apresentadas as concentrações dos sólidos suspensos voláteis nos efluentes ao longo das fases operacionais em  $R_1$  e  $R_2$ . Para  $R_1$ , os SSV variaram de 239,2 a 356,7  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , e para  $R_2$  variaram entre 236,6 e 632,2  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ .

Tabela 5.4: Concentração ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) de sólidos suspensos voláteis nos efluentes de  $R_1$  e  $R_2$  ao longo da diminuição do TDH e aumento da concentração de substrato.

Reator	TCO ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	TDH (h)	SSV ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )
<b><math>R_1</math></b>			
$R_{1,1}$	25	8	318,1
$R_{1,2}$	35	6	297,5
$R_{1,3}$	50	4	259,3
$R_{1,4}$	85	2	239,2
$R_{1,5}$	190	1	278,9
$R_{1,6}$	380	0,5	356,7
<b><math>R_2</math></b>			
$R_{2,1}$	18	6	294,7
$R_{2,2}$	35	6	249,9
$R_{2,3}$	47	6	632,2
$R_{2,4}$	70	6	236,6

A concentração de sólidos suspensos presentes no substrato, no contexto da produção fermentativa de hidrogênio é considerada um problema, uma vez que é necessário elevado tempo de contato a fim de hidrolisar os carboidratos particulados (NASR et al., 2011; ROBLEDO-NARVÁEZ et al., 2013). O aumento de sólidos totais geralmente leva ao acúmulo de metabólicos orgânicos e diminuição do pH, podendo afetar a atividade microbiana (VAN GINKEL; OH e LOGAN, 2005; ESCAMILLA-

ALVARADO et al., 2012; ROBLEDO-NARVÁEZ et al., 2013). Com o aumento da TCO nos reatores, não foram detectados arraste de sólidos suspensos nos efluentes. A maior parte dos sólidos suspensos contidos no efluente foi representada por sólidos suspensos voláteis.

Figura 5.7: Concentrações médias de sólidos suspensos fixos e voláteis (efluentes) e respectivas porcentagens verificadas ao longo das fases operacionais de R<sub>1</sub>.

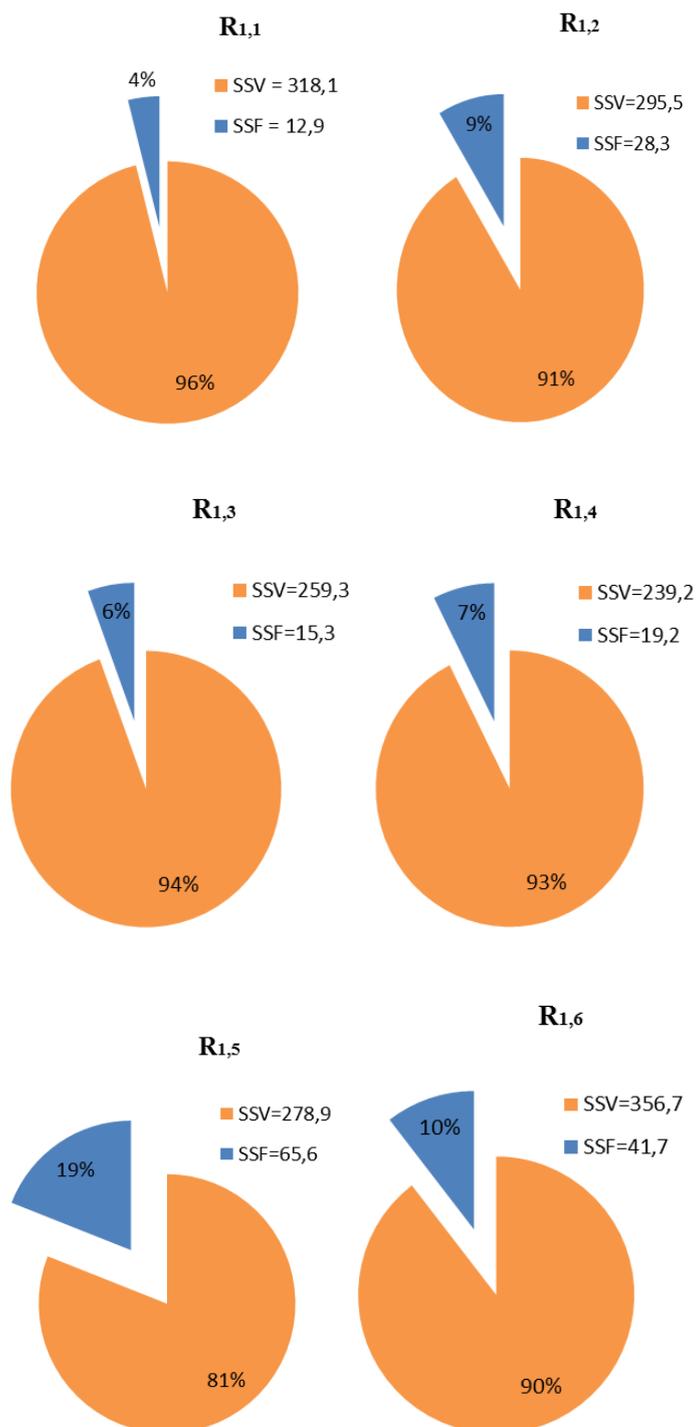
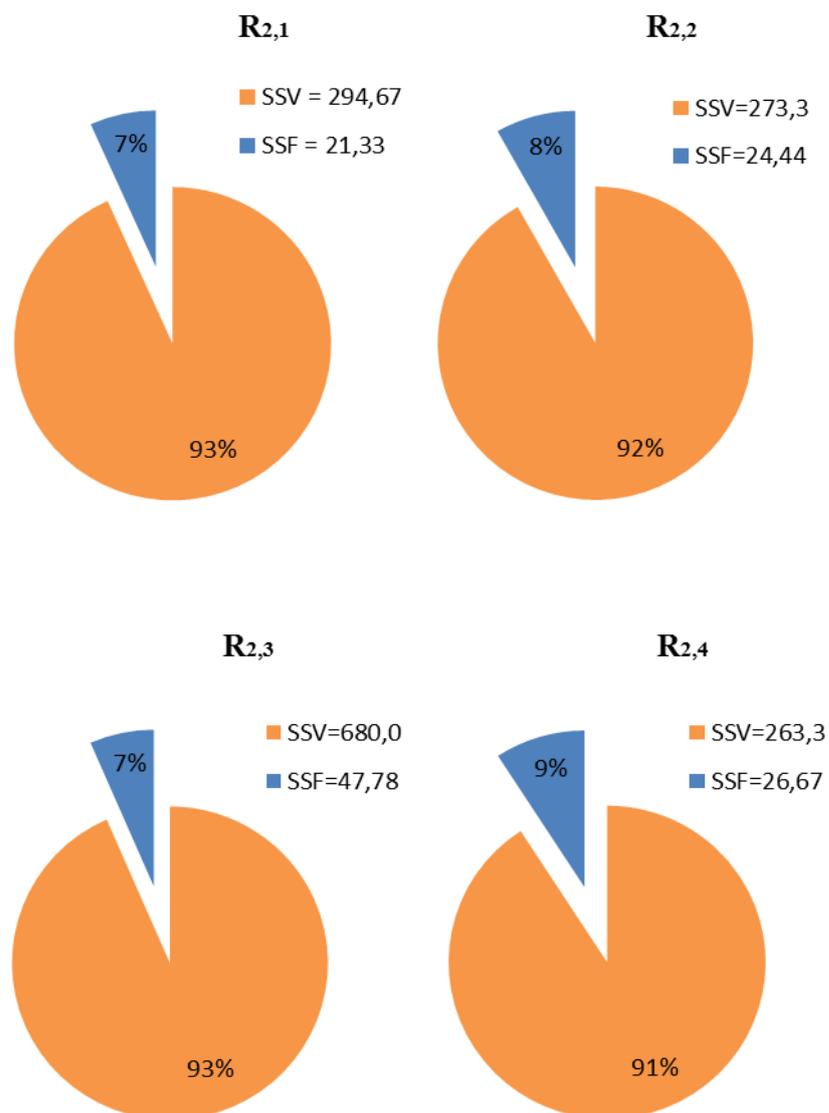


Figura 5.8: Concentrações médias de sólidos suspensos fixos e voláteis (efluentes) e respectivas porcentagens verificadas ao longo das fases operacionais de R<sub>2</sub>.



## 5.5. Produção de hidrogênio

Neste item serão apresentados os dados de produção volumétrica de hidrogênio, rendimento de hidrogênio e o conteúdo de hidrogênio presente no biogás formado ao longo das fases operacionais de R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub>, em relação ao aumento da taxa de carregamento orgânico e diminuição do TDH.

### 5.5.1. Rendimento de hidrogênio (HY)

De acordo com os dados apresentados na tabela 5.5 e figuras 5.9 e 5.10, os valores obtidos de HY em R<sub>1</sub> estiveram entre 0,6 e 3,3 mol H<sub>2</sub>. mol lactose<sup>-1</sup>. Para R<sub>2</sub>, os valores mínimos e máximos de HY foram 0,7 e 2,6 mol H<sub>2</sub>. mol lactose<sup>-1</sup>.

Tabela 5.5: Valores médios de rendimento de H<sub>2</sub> (HY) para as diferentes taxas de carregamento orgânico e TDH aplicados ao longo das fases operacionais de R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub>.

Fase operacional	TDH (h)	TCO (Kg <sub>DQO</sub> .m <sup>-3</sup> .d <sup>-1</sup> )	Rendimento de hidrogênio (HY) molH <sub>2</sub> .mol <sup>-1</sup> lactose
<b>R<sub>1</sub></b>			
R <sub>1,1</sub>	8	25	2,1
R <sub>1,2</sub>	6	35	3,1
R <sub>1,3</sub>	4	50	3,3
R <sub>1,4</sub>	2	85	2,7
R <sub>1,5</sub>	1	190	2,4
R <sub>1,6</sub>	0,5	380	0,6
<b>R<sub>2</sub></b>			
R <sub>2,1</sub>	6	18	2,6
R <sub>2,2</sub>	6	35	2,5
R <sub>2,3</sub>	6	47	1,4
R <sub>2,4</sub>	6	70	0,7

Para R<sub>1</sub>, o valor máximo de HY foi encontrado em TDH de 4 horas e taxa de carregamento orgânico de 50 Kg<sub>DQO</sub>.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>. A partir da redução do TDH de 4 para 0,5 hora há uma queda acentuada de HY para 0,6 molH<sub>2</sub>.mol<sup>-1</sup> lactose. É possível observar, portanto que a diminuição do TDH, e conseqüentemente o aumento da taxa de carregamento orgânico não obteve efeito positivo para o rendimento de hidrogênio.

Rosa et al. (2014), utilizando soro de queijo como substrato em reator anaeróbio de leite fluidificado (RALF) em condição mesófila, observaram queda no valor de rendimento de hidrogênio de 1,9 para 0,7 molH<sub>2</sub>.mol<sup>-1</sup> lactose com a redução do TDH de 14 para 8 hora. Azbar et al. (2009a) observou o mesmo comportamento, também utilizando o mesmo resíduo. Ao diminuir o TDH de 3,5 para 1 dia, obteve queda de HY de 22 mmolH<sub>2</sub>.g<sup>-1</sup>DQO para 5 mmolH<sub>2</sub>.g<sup>-1</sup>DQO.

Figura 5.9: Taxa de carregamento orgânico (TCO) aplicada e rendimento de  $H_2$  em  $R_1$  ao longo da diminuição do tempo de detenção hidráulico.

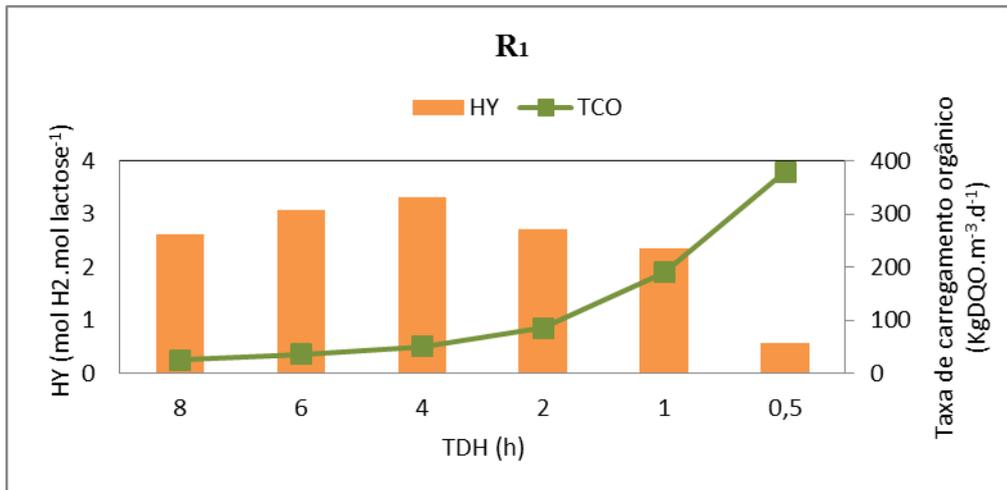
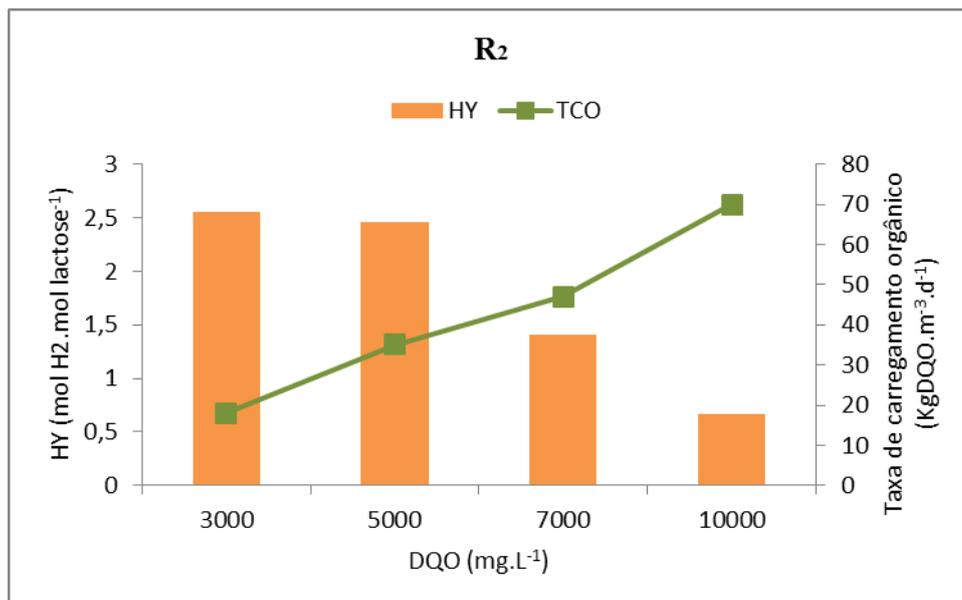


Figura 5.10: Taxa de carregamento orgânico (TCO) aplicada e rendimento de  $H_2$  em  $R_2$  ao longo do aumento da concentração de substrato.



Para  $R_2$ , o valor máximo de HY foi encontrado com concentração de soro de queijo de  $3000 \text{mg}_{\text{DQO}} \cdot \text{L}^{-1}$  e taxa de carregamento orgânico de  $18 \text{Kg}_{\text{DQO}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ . A partir do aumento da concentração de substrato, e aumento da taxa de carregamento orgânico há uma queda acentuada de HY para  $0,7 \text{mol } H_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{ lactose}$ . É possível concluir, portanto, que a aplicação de maiores taxas de carregamento orgânico reflete negativamente para o rendimento de hidrogênio devido à sobrecarga ao sistema. Rosa (2014) verificou o mesmo comportamento utilizando soro de queijo em RALF

mesofílico. Foi observado com o aumento da concentração de substrato de 3000 para 10000 mg<sub>DQO</sub>.L<sup>-1</sup> uma queda de HY de 2,3 para 0,2 molH<sub>2</sub>.mol<sup>-1</sup> lactose, mostrando que o aumento da concentração de substrato inibiu a produção de hidrogênio.

A fermentação da lactose pode ser descrita como:



Baseado na reação, o rendimento teórico de hidrogênio por fermentação de lactose pode gerar 8 mols de hidrogênio por mol de lactose. Entretanto, o maior valor encontrado na literatura é 3,7 molH<sub>2</sub>.mol<sup>-1</sup> lactose (CALLI et al., 2008). Na literatura são apresentados estudos que relatam a relação inversa entre TCO e rendimento de hidrogênio, onde o uso de maiores TCO inibiram o rendimento de hidrogênio. Azbar et al (2009a) obtiveram o mesmo comportamento que R<sub>2</sub> neste estudo. Utilizando soro de queijo como substrato em reator CSTR, os autores verificaram uma relação inversa entre o aumento da TCO (21, 35 e 47 Kg.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup> em TDH fixo de 24) e o rendimento de hidrogênio (HY). Os valores de HY (3, 9 e 6 mmol.g<sup>-1</sup>DQO) foram obtidos em TCOs de 47, 35 e 21 Kg.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>, respectivamente. Kargi; Eren e Ozmihci (2012a), investigando a produção de hidrogênio por fermentação escuro em condição termofílica (55°C) em diferentes concentrações de substrato (5,2, 9,4, 16,5, 20, 23,5 e 28,5g.L<sup>-1</sup>) obteve valor máximo de rendimento (1,03 molH<sub>2</sub>.mol<sup>-1</sup> glicose) em concentração inicial de substrato de 9,4 g.L<sup>-1</sup>. Kraemer e Bagley (2007) afirmam que esse comportamento se deve ao fato da atividade acetogênica ser afetada por altas TCOs, diminuindo portanto o rendimento de hidrogênio.

Na tabela 5.6 é apresentada a comparação entre os rendimentos apresentados neste trabalho e de outros autores utilizando soro de queijo como substrato. Devido às diferentes configurações e outros fatores essenciais para a produção de hidrogênio, alguns estudos apresentaram maiores e outros menores rendimentos de hidrogênio.

Azbar et al (2009b), avaliando a influência da temperatura na produção fermentativa de hidrogênio reportaram rendimento máximo de hidrogênio de 2,4 molH<sub>2</sub>.mol<sup>-1</sup> lactose, em pH controlado de 5,5, em condição termofílica (55°C). Rendimento comparável ao obtido por Ferchichi et al. (2005), que ao avaliar o efeito do pH na produção biológica de hidrogênio, obtiveram valor máximo de rendimento de 2,7 molH<sub>2</sub>.mol<sup>-1</sup> lactose em pH 6. Também em testes bateladas, Kargi; Eren e Ozmihci (2012b), obtiveram rendimento máximo de 1,55 molH<sub>2</sub>.mol<sup>-1</sup> lactose em condição

termofílica, ao avaliar o efeito da temperatura na produção biológica de hidrogênio. Enquanto que Davila-Vazquez et al. (2008), ao avaliar o efeito do pH e concentração inicial de substrato, obtiveram valor máximo de rendimento de  $3,1 \text{ molH}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$  lactose em pH 7,5 e concentração inicial de substrato de  $25 \text{ g}_{\text{lactose}} \cdot \text{L}^{-1}$ .

Collet et al. (2004), utilizando bioreator em temperatura termofílica e concentração de substrato de  $10 \text{ g}_{\text{lactose}} \cdot \text{L}^{-1}$  e variando o pH, obtiveram valor máximo de rendimento de  $1,5 \text{ molH}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$  lactose em pH 7. Rendimento similar foi obtido por Rosa; Santos e Silva (2014), em reator anaeróbico de leito fluidificado em condição mesofílica, que com concentração inicial de  $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  e TDH de 6 horas, obteve rendimento máximo de  $1,7 \text{ molH}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$  lactose.

Tabela 5.6: Comparação de valores de rendimentos de hidrogênio obtidos utilizando soro de queijo como substrato.

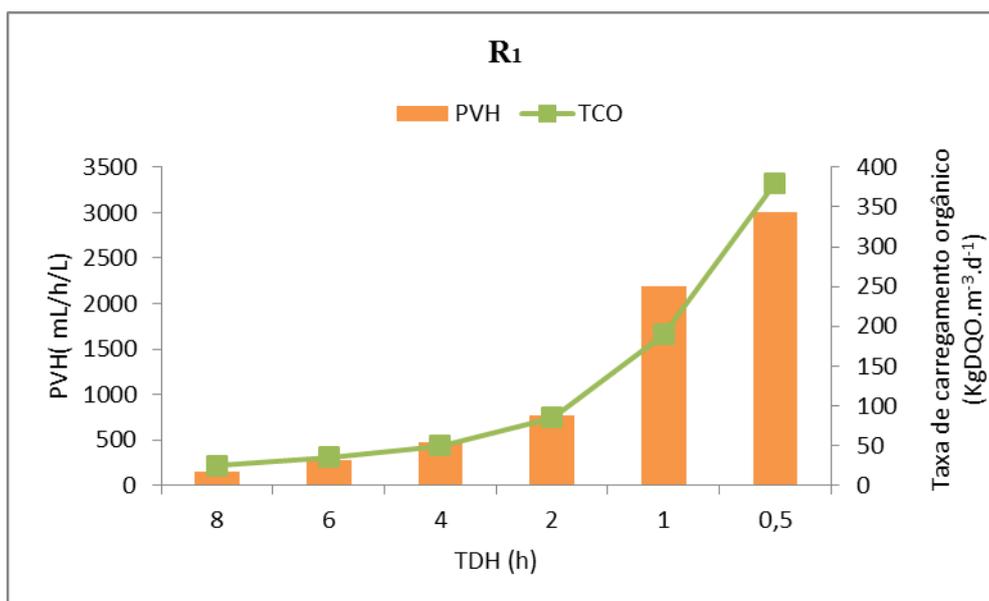
<b>Tipo de reator</b>	<b>Rendimento máxima de hidrogênio (HY)</b>	<b>Referência</b>
<b>Batelada</b>	$2,4 \text{ molH}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$ lactose	Azbar et al. (2009b)
	$2,7 \text{ molH}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$ lactose	Ferchichi et al (2005)
	$3,1 \text{ molH}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$ lactose	Davila-Vazquez et al. (2008)
	$1,55 \text{ molH}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$ lactose	Kargi; Eren e Ozmihci (2012b)
<b>Contínuo</b>	$1,5 \text{ molH}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$ lactose	Collet et al. (2004)
	$1,7 \text{ molH}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$ lactose	Rosa; Santos e Silva (2014)

### 5.5.2. Produção volumétrica de hidrogênio (PVH)

Os valores obtidos neste estudo de produção volumétrica de hidrogênio (PVH) estão apresentados nas figuras 5.11 e 5.12 e tabela 5.7. Para  $R_1$  os valores mínimos e máximos de produção volumétrica de hidrogênio (PVH) foram  $156,2$  e  $2999,4 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ . Já para  $R_2$ , os valores mínimos e máximos de PVH foram  $354,9$  e  $853,9 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ .

A produção volumétrica de hidrogênio (PVH) manteve-se com tendência de elevação mediante o efeito da diminuição do TDH em  $R_1$ . Este comportamento de aumento de PVH com a diminuição de TDH também foi reportado em outros estudos utilizando soro de queijo como substrato.

Figura 5.11: Produção volumétrica de  $H_2$  em  $R_1$  ao longo do aumento do TDH



Rosa et al. (2014), utilizando RALF e soro de queijo como substrato, observaram um aumento no valor de PVH, de 230 para 740 mL.h<sup>-1</sup>.L<sup>-1</sup> com a diminuição do TDH de 4 para 1 hora. Davila-Vazquez et al. (2009), ao utilizar soro de queijo como substrato e também obtiveram efeito de tendência de elevação na produção volumétrica de hidrogênio ao longo do diminuição de TDH aplicado. Ao reduzir o TDH de 10 para 6 hora, houve aumento de PVH de 496 mL.h<sup>-1</sup>.L<sup>-1</sup> para 583 mL.h<sup>-1</sup>.L<sup>-1</sup>. O mesmo comportamento foi observado por Carrilo-Reyes et al. (2014) em reator UASB que, utilizando soro de queijo como substrato, obtiveram aumento de PVH de 3,45 para 4,30 L.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> ao diminuir o TDH de 13 para 10 horas.

Em  $R_2$  foi observado um aumento na PVH com o aumento da concentração de substrato, entretanto, a partir de 7000 mg<sub>DQO</sub>.L<sup>-1</sup> de soro de queijo, o PVH teve uma pequena queda. O mesmo comportamento foi observado por Carrilo-Reyes et al. (2014) que, utilizando soro de queijo como substrato em reator UASB e variando a TCO de 20 para 40 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, obtiveram um aumento de 172% nos valores de PVH ao aumentar a TCO de 20 para 30 gDQO.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, chegando ao valor máximo de PVH de 1,67 LH<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>.

Figura 5.12: Produção volumétrica de H<sub>2</sub> em R<sub>2</sub> ao longo do aumento da concentração de substrato.

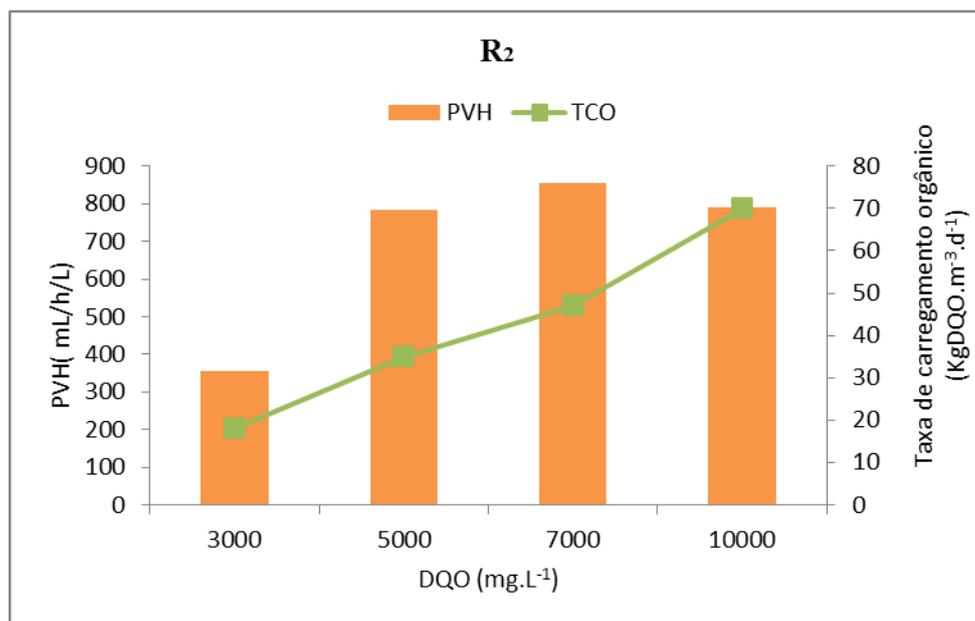


Tabela 5.7: Valores médios produção volumétrica de H<sub>2</sub> (PVH) para as diferentes taxas de carregamento orgânico e TDH aplicados ao longo das fases operacionais de R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub>.

Fase operacional	TDH (h)	TCO (Kg <sub>DQO</sub> .m <sup>-3</sup> .d <sup>-1</sup> )	Produção volumétrica de hidrogênio (PVH) ml.h <sup>-1</sup> .L <sup>-1</sup>
<b>R<sub>1</sub></b>			
R <sub>1,1</sub>	8	25	156,2
R <sub>1,2</sub>	6	35	279,4
R <sub>1,3</sub>	4	50	469,5
R <sub>1,4</sub>	2	85	771,7
R <sub>1,5</sub>	1	190	2183,4
R <sub>1,6</sub>	0,5	380	2999,4
<b>R<sub>2</sub></b>			
R <sub>2,1</sub>	6	18	354,9
R <sub>2,2</sub>	6	35	782,1
R <sub>2,3</sub>	6	47	853,9
R <sub>2,4</sub>	6	70	791,1

Rosa (2014), utilizando soro de queijo em RALF com TDH fixo de 6 horas, observou um aumento de PVH de 3,17 para 4,73  $L.d^{-1}.L^{-1}$  com o aumento da concentração de substrato de 3 para 5  $g_{DQO}.L^{-1}$ , entretanto obteve uma queda para 0,7  $L.d^{-1}.L^{-1}$  com concentração de 10  $g_{DQO}.L^{-1}$ . Azbar et al (2009a), utilizando o mesmo substrato em reator CSTR a 55°C, obtiveram também um aumento de PVH com o aumento da TCO (21, 35 e 45  $g_{DQO}.L^{-1}.d^{-1}$ ) de 0,2 para 2,9  $LH_2.L^{-1}.d^{-1}$ . Os valores de produção biológica de hidrogênio obtidas neste estudo podem também ser atribuídos às vantagens da temperatura termofílica. Segundo Akutsu et al. (2009a) a produção de  $H_2$  pode ser aumentada devido o favorecimento de transferência líquido-gás do  $H_2$ , aumentando valores de produtividade.

### 5.5.3. Conteúdo de hidrogênio no biogás

As porcentagens de hidrogênio obtidas no biogás dos reatores mantiveram-se constantes e elevadas, com valores médios entre 40 e 55% durante as fases operacionais, de acordo com exposto nas figuras 5.13 e 5.14.

Os valores médios do conteúdo de  $H_2$  foram 48 e 55% para  $R_1$  e 40 e 50% para  $R_2$  durante as fases operacionais. Isso indica que tanto o efeito da diminuição do TDH quanto o efeito do aumento da concentração de substrato não afeta significativamente a composição do biogás no reator. Não houve produção de metano nas condições operacionais avaliadas.

Figura 5.13: Conteúdo médio de  $H_2$  no biogás em função do TDH em  $R_1$ .

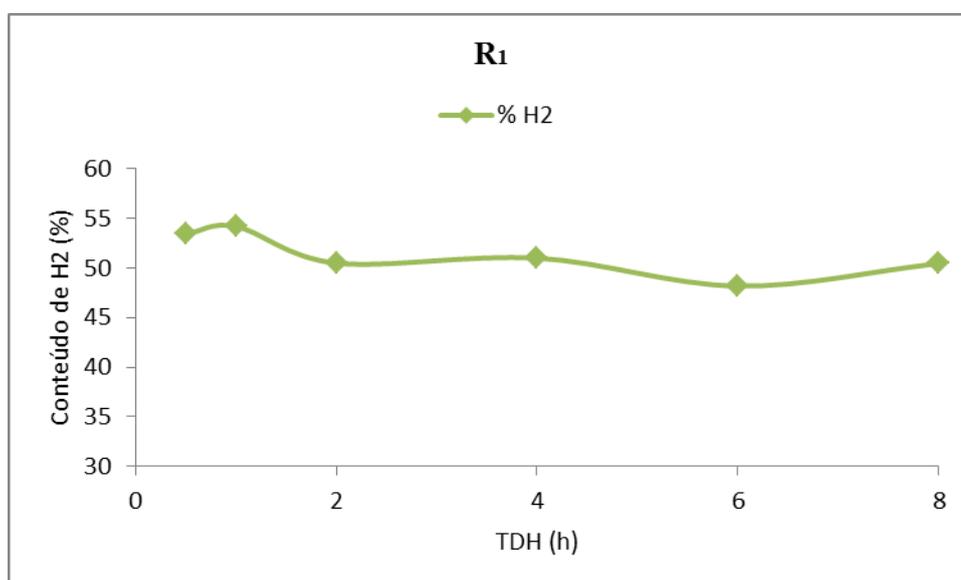
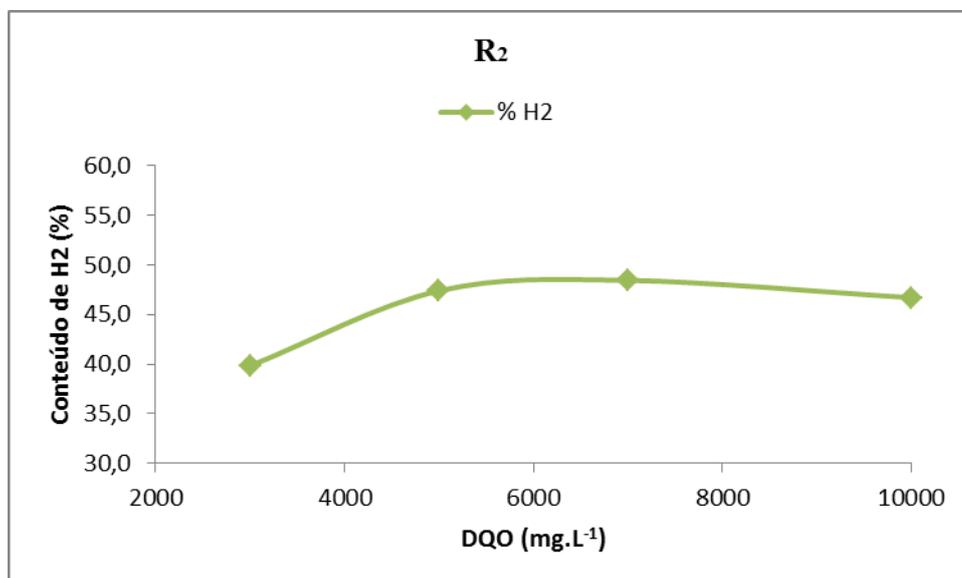


Figura 5.14: Conteúdo médio de H<sub>2</sub> em função da concentração de soro de queijo em R<sub>2</sub>.



Outros autores obtiveram resultados semelhantes de H<sub>2</sub> no biogás com variação de TDH e concentração de substrato (BARROS e SILVA, 2012; INTANOO et al., 2012; ZAHEDI et al.; 2013). Davilla-Vazquez et al. (2008), em testes bateladas e utilizando soro de queijo como fonte de substrato, obtiveram valores entre 49 e 58% de H<sub>2</sub> no biogás Na Tabela 5.8 são apresentados os valores médios do conteúdo de H<sub>2</sub> para os reatores R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub>.

Este trabalho, no entanto, apresentou valores de H<sub>2</sub> no biogás superiores a outros utilizando soro de queijo como substrato. Castello et al. (2009), em reator UASB, analisaram da viabilidade de produção de hidrogênio e verificaram que o hidrogênio foi produzido em pequenas quantidades. A manutenção de pH não foi suficiente para conter a atividade das metanogênicas, o que fez com que o metano fosse produzido concomitantemente com o hidrogênio. Assim, os autores apresentaram valores reduzidos de hidrogênio no biogás, sendo os máximos valor obtido na faixa de 20-30%.

Rosa (2014), utilizando RALF e variando a TCO, obteve valores de conteúdo de hidrogênio no biogás estáveis (15-17%) com o aumento da TCO de 12 para 28 kg.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>, entretanto houve uma queda com o aumento da TCO para 40 kg.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>. Para as TCOs de 28 e 40 kg.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup> foi verificada ainda a presença de metano com 4 e 8%, respectivamente.

Tabela 5.8- Valores médios do conteúdo de H<sub>2</sub> no biogás para R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub>

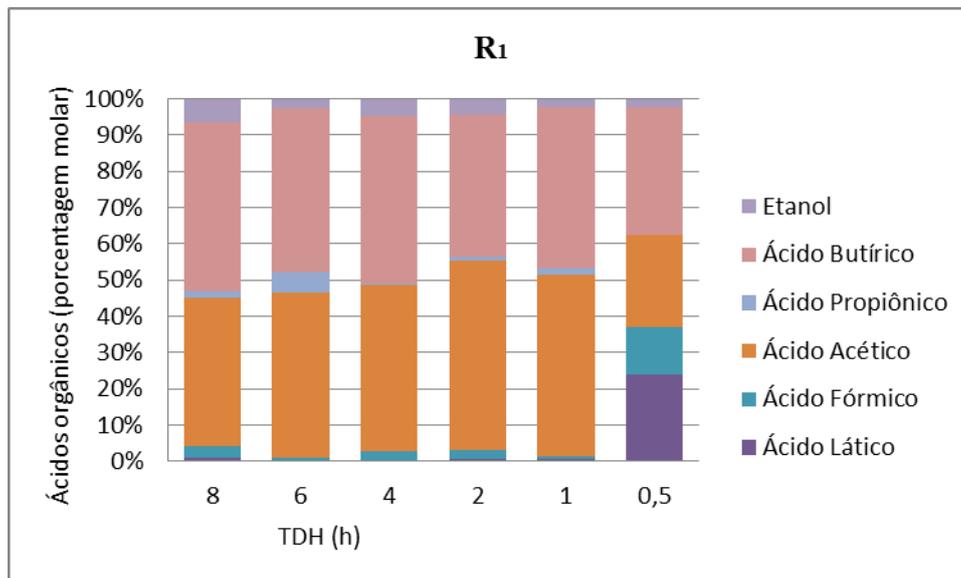
Fase operacional	TDH (h)	TCO (Kg <sub>DQO</sub> .m <sup>-3</sup> .d <sup>-1</sup> )	Conteúdo de H <sub>2</sub> no biogás (%)
<b>R<sub>1</sub></b>			
R <sub>1,1</sub>	8	25	50,5
R <sub>1,2</sub>	6	35	48,2
R <sub>1,3</sub>	4	50	51,0
R <sub>1,4</sub>	2	85	50,5
R <sub>1,5</sub>	1	190	54,2
R <sub>1,6</sub>	0,5	380	53,4
<b>R<sub>2</sub></b>			
R <sub>2,1</sub>	6	18	39,8
R <sub>2,2</sub>	6	35	47,4
R <sub>2,3</sub>	6	47	48,4
R <sub>2,4</sub>	6	70	46,7

## 5.6. Ácidos orgânicos verificados nos efluentes

A quantificação dos produtos finais da fermentação, tais como ácidos orgânicos voláteis é de suma importância devido ao seu papel como reguladores de mudanças metabólicas dos produtores de hidrogênio a consumidores de hidrogênio (produção de acetona, etanol, propanol ou butanol), o que reduz o rendimento de hidrogênio. Além disso, alguns ácidos orgânicos podem ainda ter papel tóxico ou inibitório para as populações microbianas produtoras de H<sub>2</sub> (DAVILA-VAZQUEZ et al., 2008).

Dentre os principais ácidos orgânicos encontrados nas análises do efluente do reator R<sub>1</sub> foram observados os ácidos acético e butírico, com porcentagens entre 24,1-48,5% e 23-44,4%, respectivamente, conforme apresentado na figura 5.15. Foram ainda obtidos concentrações de ácidos fórmico, propiônico e láctico, entre 0,6-6,5%, 0,4-5,7% e 0,2-22,7%, respectivamente. O etanol foi encontrado em todas as fases operacionais realizadas, com porcentagens entre 1,0 e 6,1%. Na tabela 5.9 são apresentadas as concentrações e porcentagens dos principais metabólicos observados em R<sub>1</sub> durante todas as fases operacionais.

Figura 5.15: Ácidos orgânicos (%) presentes nos efluentes do reator anaeróbico de leito fluidificado (R<sub>1</sub>) ao longo da diminuição do tempo de detenção hidráulica (TDH)



A distribuição dos metabólicos mostra uma maior produção de ácidos acético e butírico em R<sub>1</sub>, enquanto que o ácido propiônico foi encontrado em menor proporção. Os ácidos acético e butírico são os principais ácidos orgânicos intimamente relacionados com a alta produtividade do hidrogênio (KIM e KIM, 2012). A produção molar de hidrogênio pode alcançar valores máximos de 8,0 e de 4,0 mol H<sub>2</sub>.mol lactose<sup>-1</sup> (Equações (2) e (3)) por meio de fermentação de acetato e do butirato, respectivamente (DAVILA-VASQUEZ et al., 2011).



Talabardon; Schwitzguébel e Péringer (2000) afirmam que diversas bactérias anaeróbicas são capazes de produzir ácido acético como produtos da fermentação. Entretanto, é sabido que é difícil a produção de acetato a partir da lactose. Assim, é necessária a conversão da lactose a lactato, e em seguida à acetato por bactérias anaeróbicas. As bactérias anaeróbicas, entretanto, produzem além de acetato, outros metabólicos, o que podem acarretar em menores valores de rendimento de hidrogênio. As condições experimentais que produziram maiores valores de rendimentos de

hidrogênio (HY) resultaram também em maiores concentrações de ácidos acético e butírico, e menor concentração de ácido propiônico.

Com a diminuição do TDH de 8 para 6 horas, houve um aumento das concentrações de ácidos acético (289,88 para 533,87 mg.L<sup>-1</sup>) e butírico (485,19 para 775,56 mg.L<sup>-1</sup>), refletindo em um aumento de HY de 2,6 para 3,1 molH<sub>2</sub>.mol<sup>-1</sup> lactose, embora a concentração de ácido propiônico também tenha sido elevada (de 14,26 para 85,54 mg.L<sup>-1</sup>). Possivelmente houve o favorecimento de outras rotas metabólicas à produção de hidrogênio como acetato e butirato, prevalecendo sobre a rota do propiônico, obtendo resultados de rendimentos satisfatórios quando comparados com a literatura. Perna et al. (2013), em reator anaeróbico de leito fixo, observaram aumento de HY quando a produção de ácido butírico foi elevada, juntamente com a queda da produção de ácido láctico, utilizando soro de queijo como substrato. Os autores também observaram baixas proporções de etanol durante todo o experimento.

O maior rendimento de hidrogênio (HY) obtido em R<sub>1</sub> foi 3,3 molH<sub>2</sub>.mol<sup>-1</sup> lactose no TDH de 4 horas. Nesta fase operacional, embora as concentrações de ácidos acético (457,26 mg.L<sup>-1</sup>) e butírico (674,41 mg.L<sup>-1</sup>) seja menor que em TDH de 6 horas, as porcentagens obtidas desses ácidos foram 43,1 e 43,4%, respectivamente, enquanto que a porcentagem de ácido propiônico foi de apenas 0,4% (5,66 mg.L<sup>-1</sup>). O limite de TDH aplicado sem diminuição de HY forneceu elevado rendimento de hidrogênio e produção volumétrica de hidrogênio. Esses valores foram encontrados a partir da presença de 23% de ácido butírico entre os ácidos verificados nos efluentes. A tabela 5.10 apresenta os valores de rendimentos de hidrogênio obtidos em relação às concentrações e porcentagem de ácidos orgânicos observados em R<sub>1</sub>.

Para o TDH de 0,5 hora, foi verificada elevada porcentagem de ácido láctico (22,7%). Nesta mesma etapa operacional ocorreu a diminuição do rendimento de hidrogênio de 2,4 para 0,6 molH<sub>2</sub>.mol<sup>-1</sup> lactose. Nissila et al (2011), avaliando a condição termofílica de hidrogênio a partir de celulose em testes bateladas, mesmo com altas concentrações de ácidos acético e butírico, observaram baixos valores de rendimento de hidrogênio quando houve o aumento de ácido láctico nos metabólitos observados.

Entretanto, a maior produção volumétrica obtida neste reator, de 2,9 LH<sub>2</sub>.h<sup>-1</sup>.L<sup>-1</sup>, foi verificada juntamente com a presença de 22,7% de ácido láctico. Santos (2014) também observou a presença de ácido láctico (21,8%) e aumento da produção volumétrica de hidrogênio (1,20 LH<sub>2</sub>.h<sup>-1</sup>.L<sup>-1</sup>) em baixos valores de TDH ao verificar a

viabilidade da produção de hidrogênio em RALF termofílico a partir de vinhaça de cana-de-açúcar.

Tabela 5.9: Valores médios de ácidos orgânicos verificados ( $\text{mg.L}^{-1}$  e porcentagem) para as diferentes TDH aplicados em  $R_1$ .

TDH	Ácidos orgânicos e álcoois observados em $R_1$											
	(h)		$(\text{mg.L}^{-1})$		$(\%)*$							
	HAc	%	HBu	%	HPr	%	HLa	%	EtOH	%	HFo	%
8	289,88	38,9	485,19	44,4	14,26	1,6	9,59	0,9	34,71	6,1	17,15	3,0
6	533,87	44,0	775,56	43,6	85,54	5,7	6,57	0,4	24,0	2,6	5,12	0,6
4	457,26	43,1	674,41	43,4	5,66	0,4	3,44	0,2	35,30	4,3	19,17	2,4
2	369,49	30,5	408,4	23,0	8,52	0,6	7,51	0,4	23,79	2,6	12,71	1,4
1	374,87	48,5	491,92	43,4	13,82	1,5	7,81	0,7	12,02	2,0	4,29	0,7
0,5	109,07	24,1	223,56	33,6	nd	nd	154,48	22,7	7,0	1,0	43,15	6,5

(HAc: Ácido acético; HBu: Ácido Butírico; HPr: Ácido Propiônico; HLa: Ácido Lático; EtOH: Etanol; HFo: Ácido Fórmico)

nd: Não detectado

\* As concentrações dos ácidos cítrico, málico, succínico, isobutírico, isovalérico, valérico e capróico não estão apresentadas na soma dos ácidos totais

Em  $R_2$ , os ácidos acético e butírico também foram os principais ácidos orgânicos observados, com porcentagens entre 47,5-49,3% e 36,6-42,1%, respectivamente, conforme apresentado na figura 5.16. Foram ainda obtidos concentrações de ácido propiônico e lático, entre 0,7-7,1% e 0,2-4,5%, respectivamente. O etanol foi encontrado em todas as fases operacionais realizadas, com porcentagens entre 0,8 e 4,5%. Na tabela 5.11 são apresentadas as concentrações e porcentagens dos principais metabólicos observados em  $R_2$  durante todas as fases operacionais.

A distribuição dos metabólicos mostra uma maior produção de ácidos acético e butírico em  $R_2$ , enquanto que o ácido propiônico foi encontrado em menor proporção. Entretanto, o aumento da concentração de substrato aplicada inibiu a produção de hidrogênio, bem como promover um acúmulo de ácido acético. Este acúmulo de ácidos afetou o rendimento de hidrogênio, assim como reportado por outros autores (Searmsirimongkol et al., 2011; Singh et al., 2013).

Tabela 5.10: Valores de rendimentos de hidrogênio (HY) e produção volumétrica de hidrogênio (PVH) obtidos em relação às concentrações de ácidos orgânicos observados em R<sub>1</sub>.

TDH	Ácidos orgânicos (mg.L <sup>-1</sup> ) (%)								HY	PVH
	HAc	%	HBu	%	HPr	%	HLa	%		
(h)										
8	288,88	38,9	485,19	44,4	14,26	1,6	9,59	0,9	2,6	156,2
6	533,87	44,0	775,56	43,6	85,54	5,7	6,57	0,4	3,1	279,4
4	457,26	43,1	674,41	43,4	5,66	0,4	3,44	0,2	3,3	469,5
2	369,49	30,5	408,4	23,0	8,52	0,6	7,51	0,4	2,7	771,7
1	374,87	48,5	491,92	43,4	13,82	1,5	7,81	0,7	2,4	2183,4
0,5	324,97	37,3	519,39	40,7	nd	nd	154,48	22,7	0,6	2999,4

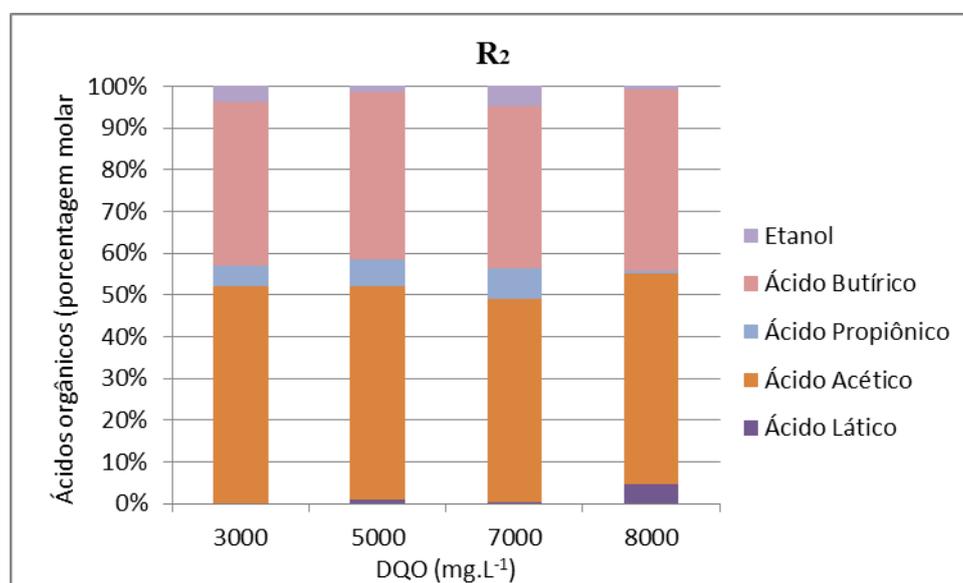
(HAc: Ácido acético; HBu: Ácido Butírico; HPr: Ácido Propiônico; HLa: Ácido Lático)

nd: Não detectado

HY: Rendimento de hidrogênio ( $\text{molH}_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{lactose}$ )

PVH: Produção volumétrica de hidrogênio ( $\text{mL} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ )

Figura 5.16: Ácidos orgânicos (%) presentes nos efluentes do reator anaeróbico de leite fluidificado termofílico (R<sub>2</sub>) ao longo do aumento da concentração de substrato.



Van Ginkel e Logan (2005), ao adicionar 25 mM de ácidos acético e butírico em reator contínuo, utilizando glicose como substrato, verificaram a redução do rendimento de hidrogênio de 13% com ácido acético e 22% com ácido butírico, atribuindo esta diminuição de rendimento a este fato. Os autores observaram ainda que com valores

menores de concentração de substrato, a auto produção de ácidos voláteis era menor, favorecendo o rendimento de hidrogênio.

Tabela 5.11: Valores médios de ácidos orgânicos verificados ( $\text{mg.L}^{-1}$  e porcentagem) para as diferentes concentrações aplicadas em  $R_2$ .

DQO	Ácidos orgânicos e álcoois observados em $R_2$									
	(mg.L <sup>-1</sup> )		(%)*							
	HAc	%	HBu	%	HPr	%	HLa	%	EtOH	%
3000	281,28	48,4	311,52	36,6	32,57	4,5	1,39	0,2	15,58	3,5
5000	406,67	49,3	468,83	38,8	63,43	6,2	10,85	0,9	8,97	1,4
7000	451,04	47,5	528,14	37,9	83,11	7,1	3,38	0,2	32,88	4,5
10000	632,21	48,7	800,74	42,1	10,59	0,7	87,811	4,5	7,93	0,8

DQO: Demanda Química de Oxigênio ( $\text{mg.L}^{-1}$ )

(HAc: Ácido acético; HBu: Ácido Butírico; HPr: Ácido Propiônico; HLa: Ácido Lático; EtOH: Etanol)

nd: Não detectado

\* As concentrações dos ácidos cítrico, málico, succínico, isobutírico, isovalérico, valérico, fórmico e capríco não estão apresentadas na soma dos ácidos totais

O acúmulo de acetato com DQO de  $10000 \text{ mg}_{\text{DQO}}.\text{L}^{-1}$ , ativou o metabolismo das bactérias homoacetogênicas, consumidoras de  $\text{H}_2$ , resultando em menores rendimentos de hidrogênio. De acordo com Siritwongrungron et al. (2007), o acetato formado na acetogênese pode ser um consumidor de hidrogênio, a partir da redução de  $\text{H}_2$  e  $\text{CO}_2$  (Eq. 8).



Assim como neste trabalho, a homoacetogênese já foi observada em RALF. Rosa (2014), utilizando soro de queijo como substrato, observou um aumento de ácido acético e queda de produção de hidrogênio (de 3,2 para  $0,2 \text{ molH}_2.\text{mol}^{-1}$  lactose), com um aumento de TCO de 12 para  $40 \text{ kg.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ . Barros e Silva (2012) também observaram um aumento de ácido acético e queda na produção de hidrogênio em baixo TDH e atribuíram esse comportamento de consumo de hidrogênio às bactérias homoacetogênicas

O maior rendimento de hidrogênio (HY) obtido em R<sub>2</sub> foi 2,6 molH<sub>2</sub>.mol<sup>-1</sup> lactose com concentração afluente de substrato de 3000 mg<sub>DQO</sub>.L<sup>-1</sup>. O limite de DQO afluente sem diminuição de HY e ação das homoacetogênicas é de 7000 mg<sub>DQO</sub>.L<sup>-1</sup>. A tabela 5.12 apresenta os valores de rendimentos de hidrogênio obtidos em relação às concentrações e porcentagem de ácidos orgânicos observados em R<sub>2</sub>.

Tabela 5.12: Valores de rendimentos de hidrogênio (HY) e produção volumétrica de hidrogênio (PVH) obtidos em relação às concentrações de ácidos orgânicos observados em R<sub>2</sub>.

DQO (mg.L <sup>-1</sup> )	Ácidos orgânicos (mg.L <sup>-1</sup> ) (%)						HY	PVH
	HAc	%	HBu	%	HPr	%		
3000	281,28	48,4	311,52	36,6	32,57	4,5	2,6	354,9
5000	406,67	49,3	468,83	38,8	63,43	6,2	2,5	782,1
7000	451,04	47,5	528,14	37,9	83,11	7,1	1,4	853,9
10000	632,21	48,7	800,74	42,1	10,59	0,7	0,7	791,1

(HAc: Ácido acético; HBu: Ácido Butírico; HPr: Ácido Propiônico; HLa: Ácido Lático)

nd: Não detectado

HY: Rendimento de hidrogênio (molH<sub>2</sub>.mol<sup>-1</sup> lactose)

PVH: Produção volumétrica de hidrogênio (mL.h<sup>-1</sup>.L<sup>-1</sup>)

## 5.7. Balanço de DQO

O balanço de DQO foi estimado em função do cálculo teórico da DQO com base nas relações estequiométricas para oxidação de lactose, ácido acético, ácido butírico, ácido propiônico, ácido lático, etanol, entre outros. Nas tabelas 5.13 e 5.14 são apresentados os valores de DQO teórica (DQO<sub>t</sub>) para lactose remanescente, metabólitos solúveis e sólidos suspensos voláteis (SSV), bem como a diferença entre a DQO teórica e DQO medida (DQO<sub>m</sub>) em R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub>, respectivamente. O balanço demonstrou que houve uma diferença negativa em ambos reatores (93,22 à 949,73 mg.L<sup>-1</sup> em R<sub>1</sub> e 106,85 à 312,47 mg.L<sup>-1</sup> em R<sub>2</sub>), e bastante significativa, entre a soma da DQO<sub>t</sub> e DQO<sub>m</sub>. (Dif). Assim, é possível a existência de outros metabólitos, os quais não foram quantificados, e que poderiam ser levados em consideração.

Tabela 5.13: Balanço de carbono em função de DQO<sub>t</sub> e DQO<sub>m</sub> em R<sub>1</sub>.

Reator	TCO	Hac DQO <sub>t</sub>	HBu DQO <sub>t</sub>	HPr DQO <sub>t</sub>	HLa DQO <sub>t</sub>	EtOH DQO <sub>t</sub>	HFo DQO <sub>t</sub>	HSuc DQO <sub>t</sub>	HVa DQO <sub>t</sub>	SSV DQO <sub>t</sub>	DQO lactose <sub>rem</sub>	DQO <sub>t</sub> total SMP	DQO medida	(DQO <sub>m</sub> - DQO <sub>t</sub> )	Dif (%)
	25	309,01	882,09	21,58	10,22	48,28	5,96	17,12	0,0	426,25	1610,72	3331,23	3424,45	93,22	2,72
	35	569,11	1409,97	129,42	7,00	33,39	1,78	24,26	13,38	398,65	1155,23	3755,56	3899,05	143,49	3,68
<b>R<sub>1</sub></b>	50	487,45	1226,08	8,57	3,67	49,10	6,67	18,18	16,89	347,51	1147,11	3328,11	3856,25	528,13	13,70
	85	393,88	742,47	12,89	8,00	33,09	4,42	14,36	12,75	320,48	1220,38	2775,49	3725,22	949,73	25,49
	190	399,61	894,31	20,91	8,32	16,72	1,49	6,36	0,00	373,71	1072,25	2793,70	3433,52	639,82	18,63
	380	116,27	406,42	0,0	164,63	9,75	15,00	3,56	9,18	477,92	2576,82	3788,75	4419,02	630,27	14,26

TCO: Taxa de carregamento orgânico (KgDQO.m-3.d-1); HAC: ácido acético; HBu: ácido butírico; HPr: ácido propiônico; HLa: ácido láctico; EtOH: etanol; HFo: ácido fórmico; HSuc: ácido succínico; HVa: ácido valérico; SSV: sólidos suspensos voláteis; DQO<sub>t</sub>: demanda química de oxigênio teórica; DQO lactoserem: demanda química de oxigênio de lactose remanescente; DQO<sub>m</sub>: demanda química de oxigênio medida; Dif: Diferença. Os ácidos cítrico, málico, isobutírico e isovalérico foram medidos, entretanto não foram detectados.

Tabela 5.14: Balanço de carbono em função de DQO<sub>t</sub> e DQO<sub>m</sub> em R<sub>2</sub>.

Reator	TCO	Hac DQO <sub>t</sub>	HBu DQO <sub>t</sub>	HPr DQO <sub>t</sub>	HLa DQO <sub>t</sub>	EtOH DQO <sub>t</sub>	HFo DQO <sub>t</sub>	HSuc DQO <sub>t</sub>	HVa DQO <sub>t</sub>	SSV DQO <sub>t</sub>	DQO lactose <sub>rem</sub>	DQO <sub>t</sub> total SMP	DQO medida	(DQO <sub>m</sub> - DQO <sub>t</sub> )	Dif (%)
		299,85	566,34	49,28	1,48	21,67	3,19	20,00	0,00	394,85	550,72	1907,37	2014,22	106,85	5,30
<b>R<sub>2</sub></b>		433,51	852,33	95,97	11,55	12,47	0,00	11,15	9,81	333,51	911,29	2681,41	2993,87	312,47	10,44
		480,81	960,16	125,74	3,61	45,74	0,00	13,28	12,52	847,18	1635,06	4136,61	4439,19	302,57	6,82
		673,93	882,09	16,02	93,58	11,02	0,00	12,81	8,60	317,13	8300,00	10323,78	10554,35	230,57	2,18

TCO: Taxa de carregamento orgânico (KgDQO.m-3.d-1); HAC: ácido acético; HBu: ácido butírico; HPr: ácido propiônico; HLa: ácido láctico; EtOH: etanol; HFo: ácido fórmico; HSuc: ácido succínico; HVa: ácido valérico; SSV: sólidos suspensos voláteis; DQO<sub>t</sub>: demanda química de oxigênio teórica; DQO lactoserem: demanda química de oxigênio de lactose remanescente; DQO<sub>m</sub>: demanda química de oxigênio medida; Dif: Diferença. Os ácidos cítrico, málico, isobutírico e isovalérico foram medidos, entretanto não foram detectados.

## 5.8. Discussões sobre as melhores condições operacionais para a produção de hidrogênio.

Neste item estão apresentadas as comparações entre os melhores valores de rendimentos, produção volumétrica, conteúdo de hidrogênio no biogás, remoção de DQO e consumo de carboidratos entre os dois reatores operados  $R_1$  e  $R_2$ . Para  $R_1$ , o aumento da TCO ocorreu com a diminuição do TDH de 8 para 0,5 horas, com concentração de substrato fixa em  $5000 \text{ mg}_{\text{DQO}} \cdot \text{L}^{-1}$ . Para  $R_2$ , a TCO foi aumentada com o aumento da concentração de substrato de 3000 para  $10000 \text{ mg}_{\text{DQO}} \cdot \text{L}^{-1}$  e TDH fixo em 6 horas.

Para  $R_1$ , o maior rendimento de hidrogênio obtido foi de  $3,3 \text{ molH}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$  lactose em TCO de  $50 \text{ Kg}_{\text{DQO}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$  (TDH de 4 horas). Nessa fase operacional também foram obtidos melhores resultados para remoção de DQO ( $33,4 \pm 2,2\%$ ) e consumo de lactose ( $83 \pm 1,38\%$ ). Entretanto, maiores valores de TCO (menores valores de TDH) foram propícios para a produção volumétrica de  $\text{H}_2$  (PVH) e conteúdo de hidrogênio no biogás ( $\% \text{H}_2$ ). Para PVH, a melhor condição operacional foi a maior TCO aplicado no reator ( $380 \text{ Kg}_{\text{DQO}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ ), atingindo valor próximo de  $3,0 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ . Enquanto que para  $\% \text{H}_2$ , para TCO de  $190 \text{ Kg}_{\text{DQO}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$  foi obtido  $54,2\%$ .

Para  $R_2$ , o maior valor de HY, de  $2,6 \text{ molH}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$  lactose, foi obtido na condição de menor TCO aplicada ( $18 \text{ Kg}_{\text{DQO}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ ). Já para remoção de DQO, bem como para o consumo de carboidrato, a melhor fase operacional foi a de TCO aplicada de  $35 \text{ Kg}_{\text{DQO}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ . Para a TCO de  $47 \text{ Kg}_{\text{DQO}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$  foram obtidos os maiores valores para PVH ( $853,9 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ ) e  $\% \text{H}_2$  ( $48,4$ ). Na tabela 5.15 estão resumidos os melhores valores obtidos para os parâmetros citados acima.

Ainda que tenham sido verificados resultados diferenciados de produção de  $\text{H}_2$ , ambos reatores apresentaram comportamento similar. Assim, é possível afirmar que menores TCOs aplicadas são favoráveis à remoção de DQO, consumo de carboidrato e para rendimento de hidrogênio. Já com o aumento da TCO aplicada, a PVH e  $\% \text{H}_2$  foram favorecidos.

Tabela 5.15: Resumo dos principais valores obtidos para HY, PVH, %H<sub>2</sub>, remoção de DQO e consumo de carboidrato em R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub>.

<b>Reator</b>	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>
<b>TCO</b>	50	18
<b>HY</b>	3,3	2,6
<b>TCO</b>	380	47
<b>PVH</b>	2999,4	853,9
<b>TCO</b>	190	47
<b>%H<sub>2</sub></b>	54,2	48,4
<b>TCO</b>	50	35
<b>Remoção de DQO (%)</b>	33,4	41,2
<b>TCO</b>	50	35
<b>Consumo de carboidrato (%)</b>	83	85

TCO: taxa de carregamento orgânico (KgDQO.m<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup>)

HY: rendimento de hidrogênio (molH<sub>2</sub>.mol<sup>-1</sup>)

PVH: produção volumétrica de hidrogênio (mL.h<sup>-1</sup>.L<sup>-1</sup>)

%H<sub>2</sub>: conteúdo de H<sub>2</sub> no biogás

## CAPÍTULO 6

### CONCLUSÃO

O uso do soro de queijo como fonte de carbono na produção de hidrogênio vem sendo estudado em diferentes configurações de reatores e avaliando diferentes parâmetros como: taxa de carregamento orgânico, TDH, diferentes formulações de meio de crescimento de bactérias e estruturas de inóculos. Este trabalho demonstrou a viabilidade de reatores anaeróbios de leito fluidificado e a capacidade termofílica para a produção de hidrogênio de modo contínuo utilizando o soro de queijo.

O lodo granulado fermentativo-metanogênio proveniente de reator UASB termofílico utilizado para a produção de metano a partir de vinhaça de cana-de-açúcar representou ser uma fonte de inóculo adequada para a obtenção de consórcio termofílico produtor de hidrogênio. A eliminação de micro-organismos consumidores de  $H_2$  foi efetiva frente à aplicação do método de pré-tratamento térmico ao lodo granulado.

O soro de queijo pôde ser utilizado de forma efetiva como fonte de carbono para a produção termofílica contínua de  $H_2$  sob as quatro concentrações afluentes testadas (3000, 5000, 7000 e 10000  $mg_{DQO}.L^{-1}$ ) ao longo da diminuição do tempo de detenção hidráulica, de 8 a 0,5 hora. A menor concentração de soro de queijo de 3000  $mg_{DQO}.L^{-1}$  apresentou o melhores resultado considerando o parâmetro rendimento de hidrogênio. Já a maior concentração de 10000  $mg_{DQO}.L^{-1}$  apresentou o melhor resultado considerando o parâmetros produção volumétrica de hidrogênio. Em relação ao TDH, o maior rendimento foi obtido no TDH de 4 horas e a maior produção volumétrica em 0,5 hora.

Ainda que tenham sido verificados resultados diferenciados de produção de  $H_2$ , todos os reatores termofílicos apresentaram comportamento similar. Por meio da investigação do efeito da carga orgânica aplicada na produção de  $H_2$  a partir do soro de queijo, foi verificada tendência de decréscimo de rendimento de  $H_2$  mediante à elevação da taxa de carregamento orgânico. Em contrapartida, o parâmetro de produção volumétrica de  $H_2$  mostrou-se favorável e com elevações significativas, conforme o aumento da carga orgânica aplicada.

Os carboidratos encontrados no soro de queijo foram convertidos à hidrogênio, ácidos orgânicos e energia para o crescimento da biomassa ativa no reator. Entretanto,

em relação às eficiências de remoção de carboidratos totais durante a operação verificou-se que, embora constatada produção de hidrogênio em todas as fases operacionais, houve consumo incompleto do carboidrato. A temperatura também mostrou-se um fator de suma importância, uma vez que pode afetar o crescimento, a taxa de consumo máximo de substrato e a via metabólica dos micro-organismos.

Observou-se que a via metabólica da produção de hidrogênio foi fortemente influenciada pelo aumento da concentração de substrato e/ou aumento da TCO. Na maior TCO aplicada R<sub>1</sub>, houve aumento de ácido láctico e diminuição de HY, entretanto ocorreu o maior valor de PVH. Já em R<sub>2</sub>, o aumento da TCO aplicada resultou em acúmulo de ácido acético, no qual afetou o rendimento de hidrogênio.

## CAPÍTULO 7

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, A. A.; ALVES, J. I.; PEREIRA, M. A.; KARAKASHEV, D.; ALVES, M. M. ANGELIDAKI, I. Engineered heat treated methanogenic granules: A promising biotechnological approach for extreme thermophilic biohydrogen production. **Bioresource Technology**, v. 101, 9577-9586, 2010.

AKUTSU, Y.; LI, Y.; HARADA, H.; YU, H. Effects of temperature and substrate concentration on biological hydrogen production from starch. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, 2558-2566, 2009a.

AKUTSU, Y.; LEE, D.; CHI, Y.; LI, Y.; HARADA, H.; YU, H. Thermophilic fermentative hydrogen production from starch-wastewater with biogranules. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, 5061-5071, 2009b.

AMORIM, E. L. C. **Efeito da concentração de glicose e da alcalinidade na produção de hidrogênio em reator anaeróbico de leito fluidificado**. 2009. 163 f. Tese (Doutorado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, 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, 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, 1248-1263, 2012.

ANDRADE, A. C. F. F. **Avaliação da produção de hidrogênio por bactéria fototrófica púrpura não-sulfurosa em reator em batelada**. 2007. 104 f. Dissertação

(Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

APHA, AWWA, WEF., 2012. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 22th edition, American Public Health Association, Washington, D.C.

ARGUN, H.; KARGI, F. Bio-hydrogen production by different operational modes of dark and photo-fermentation: an overview. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, 7443-7459, 2011.

AZBAR, N.; DOKGOZ, F. T. C.; KESKIN, T.; KORKMAZ, K. S.; SYED, H. M. Continuous fermentative hydrogen production from cheese whey wastewater under thermophilic anaerobic conditions. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, 7441-7447, 2009a.

AZBAR, N.; DOKGOZ, F. T. C.; KESKIN, T.; ELTEM, R.; KORKMAZ, K. S.; GEZGIN, Y.; AKBAL, Z.; ONCEL, S.; DALAY, M. C.; GONEN, Ç.; TUTUK, F. Comparative evaluation of biohydrogen production from cheese whey wastewater under thermophilic and mesophilic anaerobic conditions. **International Journal of Green Energy**, v. 6, 192-200, 2009b.

BAKONYI, P.; BORZA, B.; ORLOVITS, K.; SIMON, N.; NEMESTÓTHY, K.; BÉLAFI-BAKÓ, K. Fermentative hydrogen production by conventionally and unconventionally heat pretreated seed cultures: A comparative assessment. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, 5589-5596, 2014.

BARROS; A. R.; SILVA, E. L. Hydrogen and ethanol production in anaerobic fluidized bed reactors: Performance evaluation for three support materials under different operating conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 61, 59-65, 2012.

BEAUPREZ, J.J.; MEY, M.D.; SOETAERT, W.K. Microbial succinic acid production: Natural versus metabolic engineered producers. **Process Biochemistry**, v. 45, 1103-1114, 2010.

BISAILLON, A.; TURCOT, J.; HALLENBECK, P. C. The effect of nutrient limitation on hydrogen production by batch cultures of *Escherichia coli*. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 31, 1504-1508, 2006.

CAI, J. L.; WU, Q.; WANG, G. C.; DENG, C. B. Fermentative hydrogen production by a new mesophilic bacterium *Clostridium sp.* 6A-5 isolated from the sludge of a sugar mill. **Renewable Energy**, v. 59, 202-209, 2013.

CAKIR, A.; OZMIHCI, S.; KARGI, F. Comparison of bio-hydrogen production from hydrolyzed wheat starch by mesophilic and thermophilic dark fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, 13214-13218, 2010.

CALLI, B.; SCHOENMAEKERS, K.; VANBROEKHOVEN, K.; DIELS, L. Dark fermentation H<sub>2</sub> production from xylose and lactose – effects of on line pH control. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, 522-530, 2008.

CARRILLO-REYES, J.; CELIS, L. B.; ALATRISTE-MONDRAGÓN, F.; RAZO-FLORES, E. Different start-up strategies to enhance biohydrogen production from cheese whey in UASB reactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, 5591-5601, 2012.

CARRILLO-REYES, J.; CELIS, L. B.; ALATRISTE-MONDRAGÓN, F.; RAZO-FLORES, E. Decreasing methane production in hydrogenogenic UASB reactors fed with cheese whey. **Biomass and bioenergy**, 1-8, 2014.

CARVALHO, F.; PRAZERES, A. R.; RIVAS, J. Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. **Science of the Total Environment**, v. 445, 385-396, 2013.

CASTELLO, E.; SANTOS, C. G.; IGLESIAS, T.; PAOLINO, G.; WENZEL, J.; BORZACCONI, L.; ETCHEBEHERE, C. Feasibility of biohydrogen production from

cheese whey using UASB reactor: links between microbial community and reactor performance. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, 5674-5682, 2009.

CHANG, J. S.; LEE, K. C.; LIN, P.J. Biohydrogen production with fixed-bed bioreactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 27, 1167-1174, 2002.

CHEN, C. C.; LIN, C. Y. CHANG, J. S. Kinetics of hydrogen production with continuous anaerobic cultures utilizing sucrose as the limiting substrate. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.57, 56-64, 2001.

CHEN, C. C.; LIN, C. Y. Using sucrose as a substrate in an anaerobic hydrogen-producing reactor. **Advances in Environmental Research**, v. 7, 695-699, 2003.

CHEN, S. D.; SHEU, D. S.; CHEN, W. M.; LO, Y. C.; HUANG, T. I; LIN, C. Y.; CHANG, J. S. Dark hydrogen fermentation from hydrolyzed starch treated with recombinant amylase originating from *Caldimonastaiwanensis* On1. **Biotechnology Progress**, v. 23, 1312-1320, 2007.

CHERNICHARO, C. A. L. **Princípios do tratamento biológico de águas residuárias**. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental/UFMG. v. 5, 1997.

CHIN, H. L.; CHEN, Z. S.; CHOU, C. P. F. Fedbatch operation using *Clostridium acetobutylicum* suspension culture as biocatalyst for enhancing hydrogen production. **Biotechnology Progress**, v. 19, 383-388, 2003.

CHINELLATO, G.; CAVINATO, C.; BOLZONELLA, D.; HEAVEN, S.; BANKS, C. J. Biohydrogen production from food waste in batch and semi-continuous conditions: Evaluation of a two-phase approach with digestate recirculation for pH control. **International Journal of Hydrogen Energy**, v 38, 4351-4260, 2013.

CHONG, M. L.; RAHIM, R. A.; SHIRAI, Y.; HASSAN, M. A. Biohydrogen production by *Clostridium butyricum* EB6 from palm oil mill effluent. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, 764-771, 2009.

CHONG, P. S.; JAHIM, J. M.; HARUN, S.; LIM, S. S.; ABD MUTALIB, S.; HASSAN, O.; NOR, M. T. M. Enhancement of batch biohydrogen production from prehydrolysate of acid treated oil palm empty fruit bunch. **International Journal of Hydrogen Energy**, 38, 9592-9599, 2013.

COLLET, C.; ADLER, N.; SCHWITZGUEBEL, J. P.; PERINGER, P. Hydrogen production by *Clostridium thermolacticum* during continuous fermentation of lactose. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 29, 1479-1485, 2004.

COLLET, C.; LAURENCE, G.; PERINGER, P.; SCHWITZGUÉBEL, J. P.; SOUCAILLE, P. Metabolism of lactose by *Clostridium thermolacticum* growing in continuous culture. *Archives of microbiology*, v. 185, 331-339, 2006.

DAS, D. Advances in biohydrogen production processes: An approach towards commercialization. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, 7349-7357, 2009.

DAS, D.; VEZIROGLU, T. N. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 26, 13-28, 2001.

DAS, D.; VEZIROGLU, T. N. Advances in Biological Hydrogen Production Processes. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, 6046-6057, 2008.

DAVILA-VAZQUEZ, G.; ALATRISTE-MONTRAGON, F.; LEON-RODRIGUEZ, A.; RAZO FLORES, E. Fermentative hydrogen production in batch experiments using lactose, cheese whey and glucose: influence of initial substrate concentration and pH. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, 4989-4997, 2008.

DAVILA-VAZQUEZ, G.; COTA-NAVARRO C. B.; ROSALES-COLUNGA, L. M.; LEON-RODRIGUEZ, A.; RAZO-FLORES, E. Continuous biohydrogen production using cheese whey: improving the hydrogen production rate. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, 4296-4304, 2009.

DEL NERY, V. **Utilização de lodo anaeróbio imobilizado em gel no estudo de partida de reatores de fluxo ascendente com manta de lodo**. 1987. 215 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento). Escola de Engenharia de São Carlos – Universidade de São Paulo, São Carlos, 1987.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugar and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, 350-356, 1956.

EMBRAPA, 2012. [www.embrapa.br](http://www.embrapa.br). Acesso em dezembro de 2013.

ESCAMILLA-ALVARADO, C.; RIOS-LEAL, E.; PONCE-NOYOLA, M. T.; POGGI-VARALDO, H. M. Gas biofuels from solid substrate hydrogenogenic-methanogenic fermentation of the organic fraction of municipal solid waste. **Process Biochemistry**, v. 47, 1572-1587, 2012.

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

FANG, H. H. P.; YU, H. Q. Acidification of lactose in wastewater. *Journal of Environmental engineering*, v.127, 825-831, 2001.

FERCHICHI, M.; CRABBE E.; GIL G. H.; HINTZ, W.; ALMADIDY, A. Influence of initial pH on hydrogen production from cheese whey. **Journal of Biotechnology**, v. 120, 402-409, 2005.

FRASCARI, D.; CAPPELLETTI, M.; MENDES, J.; ALBERINI, A.; SCIMONELLI, F.; MANFREDA, C.; LONGANESI, L.; ZANNONI, D.; PINELLI, D.;

FEDI, S. A kinetic study of biohydrogen production from glucose, molasses and cheese whey by suspended and attached cells of *Thermotoga neapolitana*. **Bioresource Technology**, v. 147, 553-561, 2013.

GIOANNIS D, MUNTONI A, POLETTINI A, POMI R. A review of dark fermentative hydrogen production from biodegradable municipal waste fractions. **Waste Management**, v. 33, 1345-1361, 2013.

GOMES, C.; BARROS, D.; SILVA, D.; SOUSA, E.; PINHEIRO, M.; SANTOS, M.; REBELO, N. **Vias renováveis de produção de hidrogênio**. 2012. 22 f. Dissertação (Mestrado integrado em Engenharia Química) - Universidade do Porto, Porto, 2012.

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, 1291-1298, 1997.

HAFEZ, H.; NAKHLA, G.; EL NAGGAR, M. H.; ELBESHBISHY, E.; BAGHCHEHSARAEE, B. Effect of organic loading on a novel hydrogen bioreactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, 81-92, 2010.

HAMEED, A.; GONDAL, M. A. Production of hydrogen-rich syngas using p-type NiO catalyst: a laser-based photocatalytic approach. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 233, 35-41, 2005.

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, 843-847, 2012.

HASYIM, R.; IMAI, T.; O-THONG, S.; SULISTYOWATI, L. Biohydrogen production from sago starch in wastewater using an enriched thermophilic mixed culture from hot spring. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, 14162-14171, 2011.

HAWKES F. R.; DINSDALE, R.; HAWKES, D. L.; HUSSY I. Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimization. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 27, 1339-1347, 2002.

HAWKES, F. R.; HUSSY, I.; KYAZZE, G.; DINSDALE, R.; HAWKES, D. L. Continuous dark fermentation hydrogen production by mesophilic microflora: Principles and progress, v. 32, 172-184, 2007.

HICKEY, R. F.; OWENS, R. W. Methane generation from tight-strength industrial waste with anaerobic biological fluidized bed. **Biotechnology and bioengineering**, v. 23, 399-413, 1981.

HIDALGO, M. D.; GARCÍA-ENCINA, P. A. Biofilm development and bed segregation in a methanogenic fluidized bed reactor. **Water Research**, v. 36, 3083-3091, 2002.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE) 2012. <http://www.ibge.gov.br/>. Acesso em março, 2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE) 2013. <http://www.ibge.gov.br/>. Acesso em março, 2013.

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, 11104-11112, 2012.

ISHIKAWA, M.; YAMAMURA, S.; TAKAMURA, Y.; SODE, K.; TAMIYA, E.; TOMIYAMA, M. Development of a compact high-density microbial hydrogen reactor for portable bio-fuel cell system. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 31, 1484-1489, 2006.

JO, J. H.; LEE, D. S.; PARK, D.; CHOE, W. S.; PARK, J. M. Optimization of key process variables for enhanced hydrogen production by *Enterobacter aerogenes* using statistical methods. **Bioresource Technology**, v. 99, 2061-2066, 2008.

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

KARADAG, D.; MAKINEN, A. E.; EFIMOVA, E.; PUHAKKA, E. A. Thermophilic biohydrogen production by an anaerobic heat treated-hot spring culture. **Bioresource Technology**, v. 100, 5790- 5795, 2009.

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, 2260-2266, 2012a.

KARGI, F.; EREN, N. S.; OZMIHCI, S. Bio-hydrogen production from cheese whey powder (CWP) solution: Comparison of thermophilic and mesophilic dark fermentations. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 37, 8338-8342, 2012b.

KESKIN, T.; AKSÖYEK, E.; AZBAR, N. Comparative analysis of thermophilic immobilized biohydrogen production using packed materials of ceramic ring and pumice stone. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, 15160-15167, 2011.

KHAMTIB, S.; REUNGSANG, A. Biohydrogen production from xylose by *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* KKU19 isolated from hot spring sediment. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, p. 12219-12228, 2012.

KIM, S.; HAN, S.; SHIN, H. Effect of Substrate Concentration on Hydrogen Production and 16S rDNA-Based Analysis of the Microbial Community in a Continuous Fermenter. **Process Biochemistry**, v. 41, 199–207, 2006.

KIM, D.; KIM, M. Hydrogenases for biological hydrogen production. **Bioresource Technology**, v.102, 8423-8431, 2011.

KIM, D.; KIM, M. Thermophilic fermentative hydrogen production from various carbon sources by anaerobic mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, 2021-2027, 2012.

KIM, D. H.; WU, J.; JEONG, K. W.; KIM, M. S.; SHIN, H. S. Natural inducement of hydrogen from food waste by temperature control. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 36, 10666-10673, 2011.

KOSKINEN, P. E. P.; BECK, S. R.; ORLYGSSON, J.; PUHAKKA, L. A. Ethanol and hydrogen production by two thermophilic anaerobic bacteria isolated from Icelandic geothermal areas. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 101, 679-690, 2008.

KOTAY, M. K.; DAS, D. Biohydrogen as a renewable energy resource – prospects and potentials. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, 258-263, 2008.

KRAEMER J.; BAGLEY D. Improving the yield from fermentative hydrogen production. **Biotechnology Letter**, v. 29, 685–695, 2007.

KUMAR, N.; DAS, D. Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08. **Process Biochemistry**, v. 35, 589-593, 2000.

KUMAR, N.; DAS, D. Continuous hydrogen production by immobilized *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 using lignocellulosic materials as solid matrices. **Enzyme and microbial technology**, v. 29, 280-287, 2001.

LAY, J. J. Modeling and optimization of anaerobic digested sludge converting starch to hydrogen. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, 269-278, 2000.

LEE, Y. J.; MIYAHARA, T.; NOIKE, T. Effect of pH on microbial hydrogen fermentation. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 77, 694–698, 2002.

LEE, K. S.; LO, Y. S.; LO, Y. C.; LIN, P. J.; CHANG, J. S. H<sub>2</sub> production with anaerobic sludge using activated-carbon supported packed-bed bioreactor. **Biotechnology Letters**, v. 25, 133-138, 2003.

LEITE, J. A. C.; FERNANDES, B. S.; POZZI, E.; BARBOZA, M.; ZAIAT, M. Application of an anaerobic packed-bed bioreactor for the production of hydrogen and organics acids. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, p. 579-586, 2008.

LEVIN, D. B.; PITT, L.; LOVE, M. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 29, 173-185, 2004.

LEVIN, D. B.; ISLAM, R.; CICEK, N.; SPARLING, R. Hydrogen production by *Clostridium thermocellum* 27405 from cellulosic biomass substrates. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 31, 1496-1503, 2006.

LI, S. L.; WHANG, L. M.; CHAO, Y. C.; WANG, Y.H.; WANG, Y. F.; HSIAO, C. J.; TSENG, I. C.; BAI, M. D.; CHENG, S. S. Effects of hydraulic retention time on anaerobic hydrogenation performance and microbial ecology of bioreactors fed with glucose-peptone and starch-peptone. **Internacional Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, 61-70, 2010.

LIN, C. Y.; CHANG, R. C. Hydrogen production during the anaerobic acidogenic conversion of glucose. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 74, 498-500, 1999.

LIN, C. Y.; WU, C. C.; HUNG, C. H. Temperature effects on fermentative hydrogen production from xylose using mixed anaerobic cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, 43-50, 2008.

LIN, C. N.; WU, S. Y.; CHANG, J. S.; CHANG, J. S. Biohydrogen production in a three-phase fluidized bed bioreactor using sewage sludge immobilized by ethylene-vinyl acetate copolymer. **Bioresource Technology**, v. 100, 3298-3301, 2009.

LIN, C. Y.; LAY, C. H.; SEN, B.; CHU, C. Y.; KUMAR, G.; CHEN, C. C. ; CHANG, J. S. Fermentative Hydrogen production from wastewaters: a review and prognosis. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, 15632-15642, 2012.

LIU, B. F.; REN, N. Q. XING, D.; DING, J.; ZHENG, G. X.; GUO, W. Q.; XU, J. E.; XIE, G. J. Hydrogen production by immobilized *R. faecalis* RLD-53 using soluble metabolites from ethanol fermentation bacteria *E. harbinense* B49. **Bioresource Technology**, v. 100, 2719-2723, 2009.

LO, Y. C.; CHEN, W. M.; HUNG, C. H.; CHEN, S. D.; CHANG, J. S. Dark H<sub>2</sub> fermentation from sucrose and xylose using H<sub>2</sub>-producing indigenous bacteria: feasibility and kinetic studies. **Water Research**, v. 42, 827-842, 2008.

LUO, G.; XIE, L.; ZOU, Z.; WANG, W.; ZHOU, Q.; SHIM, H. Anaerobic treatment of cassava stillage for hydrogen and methane production in continuously stirred tank reactor (CSTR) under high organic loading rate (OLR). **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, p. 11733-11737, 2010a.

LUO, G.; XIE, L.; ZOU, Z.; ZHOU, Q.; WANG, J.Y. Fermentative hydrogen production from cassava stillage by mixed anaerobic microflora: Effects of temperature and pH. **Applied Energy**, v. 87, p. 3710-3717, 2010b.

MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA. Acesso <http://www.mme.gov.br/mme>, fevereiro, 2014.

MOHAMMADI, P.; IBRAHIM, S.; ANNUAR, M. S. M.; GHAFARI, S.; VIKINESWARY, S.; ZINATIZADEH, A. A. Influences of environmental and operational factors on dark fermentative hydrogen production: A review. **Clean – Soil, Air, Water**, v. 40, 1297-1305, 2012.

MU, Y.; YU, H. Q.; WANG, G. Evaluation of three methods for enriching H<sub>2</sub> producing cultures from anaerobic sludge. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, 947-953, 2007.

NAKASHIMADA, Y.; RACHMAN, M. A.; KAKIZONO, T.; NISHIO, N. Hydrogen production of *Enterobacter aerogenes* altered by extracellular and intracellular redox states. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 27, 1399-1405, 2002.

NASR, N.; ELBESHISHY, E.; HAFEZ, H.; NAKHLA, G.; NAGGAR, M. H. E. Biohydrogen production from thin stillage using conventional and acclimatized anaerobic digester sludge. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, 12761-12769, 2011.

NATH, K.; DAS, D. Improvement of fermentative hydrogen production: various approaches. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, 520–529, 2004.

NATH, K.; KUMAR, K.; DAS, D. Effect of some environmental parameters on fermentative hydrogen production by *Enterobacter cloacae* DM 11. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 52, 525-532, 2006.

NEVES, L. M. V. **Produção de biohidrogênio por bactérias a partir de resíduos fermentescíveis**. 2009. 127 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química e Bioquímica), Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2009.

NGO, T. A.; NGUYEN, T. H.; BUI, H. T. V. Thermophilic fermentative hydrogen production from xylose by *Thermotoga neapolitana* DSM 4359. *Renewable Energy*, v. 37, 174-179, 2012.

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, 8986-8991, 2011.

NISSILA, M. E.; TÄHTI, H. P.; RINTALA, J. A.; PUHAKKA, J. A. Thermophilic hydrogen production from cellulose with rumen fluid enrichment cultures: Effects of different heat treatments. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, 1482-1490, 2011.

NOIKE, T.; MIZUNO, O. Hydrogen fermentation of organic municipal wastes. **Water Science and Technology**, v. 42, 155-162, 2000.

NOPARAT, P.; PRASERTSON, P.; O-THONG, S. Potential for using enriched cultures and thermotolerant bacterial isolates for production of biohydrogen from oil palm sap and microbial community analysis. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, 16412-16420, 2012.

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, 909–918, 2009.

OBAZU, F. O.; NGOMA, L.; GRAY, V. M. Interrelationships between bioreactor volume, effluent recycle rate, temperature, pH, %H<sub>2</sub>, hydrogen productivity and hydrogen yield with undefined bacterial cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.37, 5579-5590, 2012.

OGINO, H.; MIURA, T.; ISHIMI, K.; SEKI, M.; YOSHIDA, H. Hydrogen production from glucose by anaerobes. *Biotechnology Progress*, v. 21, 1786-1788, 2005.

OH, Y.K.; KIM, H. J.; PARK, S.; KIM, M. S.; RYU, D. D. Y. Metabolic-flux analysis of hydrogen production pathway in *Citrobacter amalonaticus* Y19. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 33, 1471-1482, 2008.

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, 199-203, 2001.

OZMIHCI, S.; KARGI, F. Ethanol production from cheese whey powder solution in a packed column bioreactor at different hydraulic residence times. **Biochemical Engineering Journal**, v. 42, 180-185, 2008.

PANDEY, A.; SINHA, P.; KOTAY, S. M., DAS, D. Isolation and evaluation of a high H<sub>2</sub>-producing lab isolate from cow dung. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, 7483-7488, 2009.

PANESAR, P.; KENNEDY, J.; GANDHI, D.; BUNKO, K. Bioutilisation of whey for lactic acid production e review. **Food Chemistry**, v. 105, 1-14, 2007.

PEINTNER, C.; ZEIDAN, A.A.; SCHNITZHOFFER, W. Bioreactor systems for thermophilic fermentative hydrogen production: evaluation and comparison of appropriate systems. **Journal of Cleaner Production**, v. 18, S15-S22, 2010.

PERNA, V.; CASTELLO, E.; WENZEL, J.; ZAMPOL, C.; LIMA, D. M. F.; BORZACCONI, L.; VARESCHE, M. B.; ZAIAT, M.; ETCHEBEHERE, C. Hydrogen production in na upflow anaerobic packed bed reactor used to treat cheese whey. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, 54-62, 2013.

PRAZERES, A. R.; CARVALHO, F.; RIVAS, J. Cheese whey management: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 110, 48-68, 2012.

RAJESHWARI, K. V.; BALAKRISHNAN, M.; KANSAL, A.; LATA, K.; KISHORE, V. V. N. State-of-the-Art of Anaerobic Digestion Technology for Industrial Wastewater Treatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 4, 135-156, 2000.

REIS, C. M. **Efeito da velocidade ascensional e do tempo de detenção hidráulica na produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidizado.** 2010. 112 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

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, 28-36, 2011.

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

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

RICHARDS, N. S. P. S. Soro Lácteo: Perspectivas Industriais e Proteção ao Meio Ambiente. **Revista Food Ingredients**, v. 38, 20-27, 2002.

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

ROSA, P. R. F. **Produção de probióticos com *Lactobacillus* imobilizados em alginato de cálcio empregando soro de queijo.** 2010. 108 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

ROSA, P. R. F. **Produção de hidrogênio e etanol através da fermentação acidogênica de resíduos agroindustriais em reator anaeróbio de leito fluidificado**. 2014. 165 f. Tese (Doutorado) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2014.

ROSA, P. R. F.; SANTOS, S. C.; SILVA, E. L. Different rations of carbono 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, 1288-1296, 2014.

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

RUGGERI, B.; TOMMASE, T.; SASSI, G. Experimental kinetics and dynamics of hydrogen production on glucose by hydrogen forming bactéria (HFB) culture. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, 753-763, 2009.

SALMINEN, E.; RINTALA, J. Anaerobic digestion of organic solid poultry slaughterhouse waste - a review. **Bioresource Technology**, v. 83, 13-26, 2002.

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

SANTOS, S.C. **Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidificado termofílico com vinhaça como substrato orgânico**. 2014. 163 f. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

SANTOS, S. C.; ROSA, P. R. F.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B. A.; SILVA, E. L. Organic loading rate impact on biohydrogen production and microbial

communities at anaerobic fluidized thermophilic bed reactors treating sugarcane stillage. **Bioresource Technology**, v. 159, 55-63, 2014.

SEARMSIRIMONGKOL, P., RANGSUNVIGIT, P., LEETHOCHAWALIT, M., CHAVADEJ, S. Hydrogen production from alcohol distillery wastewater containing high potassium and sulfate using an anaerobic sequencing batch reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, 12810-12821, 2011.

SEIFERT, K.; WALIGORSKA, M.; LANIECKI, M. Brewery wastewaters in photobiological hydrogen generation in presence of *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.35, 4085-4091, 2010.

SHEN, L.; BAGLEY, D. M.; LISS, S. N. Effect of organic loading rate on fermentative hydrogen production from continuous stirred tank and membrane bioreactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, 3689-3696, 2009.

SHIDA, G. M. **Produção de Hidrogênio e Ácidos Orgânicos por Fermentação Acidogênica em Reator Anaeróbio de Leito Fluidificado**. 2008. 105 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

SHIDA, G. M.; SADER, L. T.; AMORIM, E. L. C.; SAKAMOTO, I. K.; MAINTINGUER, S. I. SAAVEDRA, N. K.; VARESCHE, M. B. A., SILVA, E. L. Performance and composition of bacterial communities in anaerobic fluidized bed reactors for hydrogen production: Effects of organic loading rate and alkalinity. **International Journal of Hydrogen Energy**, 1-10, 2012.

SHIN, H. S.; YOUN, J. H.; KIM, S. H. Hydrogen production from food waste in anaerobic mesophilic and thermophilic acidogenesis. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 29, 1355-1363, 2004.

SHOW, K. Y.; LEE, D. J.; CHANG, J. S. Bioreactor and process design for biohydrogen production. **Bioresource Technology**. v. 102, 8524-8533, 2011.

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, 15616-15631, 2012.

SINGH, L.; SIDDIQUI, M. F.; AHMAD, A.; RAHIM, M. H. A.; SAKINAH, M.; WAHID, Z. A. Application of polyethylene glycol immobilized Clostridium sp. LS2 for continuous hydrogen production from palm oil mill effluent in upflow anaerobic sludge blanked reactor. **Biochemical Engineering Journal**. v. 70, 158-165, 2013.

SINHA, P.; PANDEY, A. An evaluative report and challenges for fermentative biohydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, 7460-7478, 2011.

SIRIWONGRUNGSON, V.; ZENY, R. J.; ANGELIDAKI, I. Homoacetogenesis as the alternative pathway for H<sub>2</sub> sink during thermophilic anaerobic degradation of butyrate under suppressed methanogenesis. **Water Research**, v. 41, 4204-4210, 2007.

SIVAGURUNATHAN, P.; KUMAR, G.; LIN, C. Y. Hydrogen and ethanol fermentation of various carbon sources by immobilized Escheria coli (XL1-Blue). **International Journal of Hydrogen Energy**, 1-8, 2014.

SONNLEITNER, A.; PEINTNER, C.; WUKOVITS, W.; FRIEDL, A.; SCHNITZHOFER, W. Process investigations of extreme thermophilic fermentations for hydrogen production: Effect of bubble induction and reduced pressure. **Bioresource Technology**, v. 118, 170-176, 2012.

SPEECE, R. E. Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters. **Tenn.: Archae Press**, 1996.

SRIKANTH, S.; MOHAN, S. V.; DEVI, M. P.; PERI, D.; SARMA, P. N. Acetate and butyrate as substrates for hydrogen production through photo-fermentation: Process

optimization and combined performance evaluation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, 7513-7522, 2009.

SU, H.; CHENG, J.; ZHOU, J.; SONG, W.; CEN, K. Improving Hydrogen Production from cassava starch by combination of dark and photo fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, 1780-1786, 2009.

SUZUKI, Y. On hydrogen as fuel gas. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 7, 227-230, 1982.

TALABARDON, M.; SCHWITZGUÉBEL, J.; PÉRINGER, P. Anaerobic thermophilic fermentation for acetic acid production from milk permeate. **Journal of Biotechnology**, v. 76, 83-92, 2000.

TANG, G.; HUANG, J.; SUN, Z.; TANG, Q.; YAN, C.; LIU, G. Biohydrogen production from cattle wastewater by enriched anaerobic mixed consortia: Influence of fermentation temperature and pH. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 106, 80-87, 2008.

TANISHO, S.; ISHIWATA, Y. Continuous hydrogen production from molasses by fermentation using urethane foam as a support of flocks. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 20, 541-545, 1995.

TAWFIK, A.; SALEM, A. The effect of organic loading rate on bio-hydrogen production from pre-treated rice straw waste via mesophilic up-flow anaerobic reactor. **Bioresource Technology**, v. 107, 186-190, 2012.

THANWISED, P.; WIROJANAGUD, W.; REUNGSANG, A. Effect of hydraulic retention time on hydrogen production and chemical oxygen demand removal from tapioca wastewater using anaerobic mixed cultures in anaerobic baffled reactor (ABR). **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, p. 15503-15510, 2012.

TURCOT, J.; BISAILLON, A.; HALLENBECK, P. C. Hydrogen production by continuous cultures of *Escherichia coli* under different nutrient regimes. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, 1465-1470, 2008.

UENO, Y. HARUTA, S.; ISHII, M.; IGARASHI, Y. Characterization of a microorganism isolated from the effluent of hydrogen fermentation by microflora. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, 397-400, 2001.

VALDEZ-VAZQUEZ, I.; RIOS-LEAL, E.; ESPARZA-GARCÍA, F.; CECCHI, F.; POGGI-VARALDO, H. M. Semi-continuous solid substrate anaerobic reactors for H<sub>2</sub> production from organic waste: mesophilic versus thermophilic regime. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 30, 1383-1391, 2005.

VAN GINKEL, S. W.; SUNG, S.; LAY, J. J. Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration. **Environmental Science and Technology**, v. 35, 4726-4730, 2001.

VAN GINKEL, S.; LOGAN, B. Inhibition of biohydrogen production by undissociated acetic and butyric acids. **Environmental Science and Technology**, v. 39, 9351-9356, 2005.

VAN GINKEL, S. W.; OH, S.; LOGAN, B. E. Biohydrogen gas production from food processing and domestic wastewaters. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 30, 1535-1542, 2005.

VRIJE, T.; BUDDE, M. A. W.; LIPS, S. J.; BAKKER, R. R.; MARS, A. E.; CLAASSEN, P. A. M. Hydrogen production from carrot pulp by the extreme thermophiles *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* and *Thermotoga neapolitana*. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, 13206-13213, 2010.

WANG, J.; WAN, W. Comparison of different pretreatment methods for enriching hydrogen-production bacteria from digested sludge. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, 2934-2941, 2008a.

WANG, J.; WAN, W. Effect of temperature on fermentative hydrogen production by mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, 5392- 5397, 2008b.

WANG, J.; WAN, W. Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, 799-811, 2009.

WANG, Y. H.; LI, S. L.; CHEN, I.; CHENG, S. Starch hydrolysis characteristics of hydrogen producing sludge in thermophilic hydrogen fermentor fed with kitchen waste. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, 7435- 7440, 2009.

WANG, W.; XIE, L.; LUO, G.; ZHOU, Q.; LU, Q. Optimization of biohydrogen and methane recovery within a cassava ethanol wastewater/waste integrated management system. **Bioresource Technology**, v. 120, 165-172, 2012.

WONG, Y. M.; WU, T. Y.; JUAN, J. C. A review of sustainable hydrogen production using seed sludge via dark fermentation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 34, 471-482, 2014.

WU, J.; LIN, C. Biohydrogen production by mesophilic fermentation of food wastewater. **Water Science Technology**. v. 49, 223–228, 2004.

WU, S. Y.; LIN, C. N.; CHANG, J. S.; CHANG, J. S. Biohydrogen production with anaerobic sludge immobilized by ethylene-vinyl acetate copolymer. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 30, 1375-1381, 2005.

WU, K. J.; CHANG, J. S. Batch and continuous fermentative production of hydrogen with anaerobic sludge entrapped in a composite polymeric matrix. **Process Biochemistry**, v. 42, 279-284, 2007.

XU, L.; REN, N.; WANG, X.; JIA, Y. F. Biohydrogen production by *Ethanoligenens harbinense* B49: nutrient optimization. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, 6962-6967, 2008.

YANG, P.; ZHANG, R.; MCGARVEY, J. A.; BENEMANN, J. R. Biohydrogen production from cheese processing wastewater by anaerobic fermentation using mixed microbial communities. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 32, 4761-4767, 2007.

YOKOI, H.; OHKAWARA, T.; HIROSE, J. HAYASHI, S.; TAKASAKI, Y. Characteristics of hydrogen production by aciduric *Enterobacter aerogenes* strain HO-39. **Journal of fermentation and bioengineering**, v. 80, 571-574, 1995.

YOUN, J.; SHIN, H. Comparative performance between temperaturephased and conventional mesophilic two-phased processes in terms of anaerobically produced bioenergy from food waste. **Waste Management and Research**, v. 23, 32-38, 2005.

YU, H. Q.; FANG, H. H. P. Production of volatile fatty acids and alcohols from dairy wastewater under thermophilic conditions. **ASABE – American Society of Agricultural and biological engineers**, v. 44, 1357-1362, 2001.

YUAN, Z.; YANG, H.; ZHI, X.; SHEN, J. Increased performance of continuous stirred tank reactor with calcium supplementation. **International Journal Hydrogen Energy**, v. 35, 2622-2626, 2009.

ZAHEDI, S.; SALES, D.; ROMERO, L. I.; SOLERA, R. Hydrogen production from the organic fraction of municipal solid waste in anaerobic thermophilic acidogenesis: Influence of organic loading rate and microbial content of the solid waste. **Bioresource Technology**, v. 129, 85-91, 2013.

ZHANG, H.; BRUNS, M. A.; LOGAN, B. E. Biological hydrogen production by *Clostridium acetobutylicum* in an unsaturated flow reactor. **Water Research**, v. 40, 728-734, 2006.

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

ZHAO, C.; THONG, S. O.; KARAKASHEV, D.; ANGELIDAKI, I.; LU, W.; WANG, H. High yield simultaneous hydrogen and ethanol production under extreme-thermophilic (70°C) mixed culture environment. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, 5657-5665, 2009.

ZHOU, J. B.; WANG, K. S.; SHEN, H. T.; WANG, S. B. Dynamic equations of impurity hydrogen during heavy water electrolysis. **Internacional Journal of Hydrogen Energy**, v. 29, 1393-1396, 2004.