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

ANDRESSA PICIONIERI BERNAL

BIOPRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO E METABÓLITOS SOLÚVEIS EM REATORES ANAERÓBIOS DE LEITO GRANULAR EXPANDIDO MESOFILICOS E CULTURA MISTA UTILIZANDO VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR COMO SUBSTRATO ORGÂNICO

VERSÃO CORRIGIDA
São Carlos
2018

ANDRESSA PICIONIERI BERNAL

BIOPRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO E METABÓLITOS SOLÚVEIS EM REATORES ANAERÓBIOS DE LEITO GRANULAR EXPANDIDO MESOFÍLICOS E CULTURA MISTA UTILIZANDO VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR COMO SUBSTRATO ORGÂNICO

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

Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Silva

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos

2018

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

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

B561b

Bernal, Andressa Picionieri
Bioprodução de hidrogênio e metabólitos solúveis em reatores anaeróbios de leito granular expandido mesofílicos e cultura mista utilizando vinhaça de cana-de-açúcar como substrato orgânico. / Andressa Picionieri Bernal; orientador Edson Luiz Silva. São Carlos, 2018.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento e Área de Concentração em Hidráulica e Saneamento -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2018.

1. hidrogênio. 2. metabólitos solúveis. 3. reator EGSB. 4. vinhaça de cana-de-açúcar. 5. temperatura mesofílica. I. Título.

Eduardo Graziosi Silva - CRB - 8/8907

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Engenheira **ANDRESSA PICIONIERI BERNAL.**

Título da dissertação: "Bioprodução de hidrogênio e metabólitos solúveis em reatores anaeróbios de leito granular expandido mesofílicos e cultura mista utilizando vinhaça de cana-de-açúcar como substrato orgânico".

Data da defesa: 22/06/2018.

Comissão Julgadora: **Resultado:**

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

Profa. Dra. **Lorena Oliveira Pires** Aprovada
(Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/UNESP - Araraquara)

Prof. Dr. **Guilherme Peixoto** Aprovada
(Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/UNESP - Araraquara)

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento:
Prof. Dr. **Eduardo Mario Mendiondo**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:
Prof. Associado **Luís Fernando Costa Alberto**

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, João Luís e Maria Margarete,

À minha irmã Larissa,

pelo apoio e motivação de sempre.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a Deus por me proporcionar a oportunidade de crescimento pessoal e profissional. Também por me dar força para percorrer essa etapa tão intensa e cheia de desafios, me proporcionar tanto desenvolvimento e amadurecimento.

Ao meu orientador prof. Dr. Edson Luiz Silva (DEQ/UFSCar), Tininho, primeiramente por me permitir ser sua orientada e compor o grupo de pesquisa do LCA II/DEQ-UFSCar. Pela orientação, atenção e conversas longas, que me fizeram refletir e pensar sob perspectivas diferentes, além dos incentivos a superar minhas limitações. E nunca esquecerei dos mimos comestíveis que o senhor trazia de surpresa e faziam nossos dias mais felizes no laboratório.

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado PROEX.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pelo auxílio financeiro no projeto temático "Aplicação do conceito de biorrefinaria a estações de tratamento biológico de águas residuárias: o controle da poluição ambiental aliado à recuperação de matéria e energia" (Processo 15/06246-7), sob coordenação do prof. Dr Marcelo Zaiat.

Às professoras Dras. Márcia Damianovic (SHS/USP) e Mônica Lopes Aguiar (DEQ/UFSCAR) por avaliarem o projeto de pesquisa, comporem a banca do Exame de Qualificação e sugerirem melhorias ao desempenho da pesquisa.

Ao professor Dr. Eugenio Foresti e novamente aos professores Dra. Márcia Damianovic e Dr. Edson Luiz Silva pelos conhecimentos passados em disciplinas do PPG-SHS, que permitiram melhor entendimento a respeito de reatores anaeróbios e do processo de digestão e fermentação anaeróbia. Aos outros professores Dr. Valdir Schalch, Dr. Cleto Pires, Dr. Davi Cunha e Dr. Eduardo Mario Mendiondo pelos ensinamentos em outras disciplinas na área de engenharia hidráulica e saneamento.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento da Universidade de São Paulo (PPG-SHS/USP), especialmente à coordenadora e profa. Dra. Maria Bernadete Amâncio, Maria Auxiliadora Altieri (Sá), Priscila Toselli (Pri), Rosemeire de Jesus (Rose), Fernanda Machado e André Garcia por sempre me atenderem com educação e auxiliarem minhas dúvidas e ajuda na resolução de problemas. À Sá e à Pri meu agradecimento especial por intermediarem as viagens para coleta de vinhaça, e à Fernanda pelas orientações relativas à contabilidade.

Ao setor de transportes da EESC-USP pela prontidão no atendimento e por disponibilizarem as caminhonetes para coletas de vinhaça. A todos os motoristas que me acompanharam nas coletas de vinhaça na Usina São Martinho em Pradópolis-SP, sempre muito

educados, prestativos e tornavam a viagem sempre mais leve, mesmo quando tínhamos algum imprevisto durante a viagem.

À tesouraria da EESC-USP sob a figura da Nilza Mendes, que me auxiliou na emissão de recibos para declaração à Fapesp.

Ao Grupo São Martinho (Usina São Martinho, Pradópolis-SP) pela parceria com o projeto disponibilizando as coletas de vinhaça, sempre com prontidão na comunicação e auxílio de funcionários nas coletas. Agradeço especialmente ao Cláudio Araújo, analista de qualidade, à Ligia, estagiária do setor de levedura e à Natielle, secretária, cujo contato foi mais direto.

Ao Lucas Ramos, pela paciência e disposição em nos ensinar as metodologias, desde a inoculação dos reatores até as metodologias, cálculos e controle de planilhas, além de repassar a experiência já adquirida com vinhaça e produção de hidrogênio em reatores acidogênicos. Obrigada também pela disponibilidade em ajudar quando necessário. Não posso esquecer, é claro, da parceria com os milhares de litros de vinhaça que usamos nossas pesquisas, você carregou bem mais peso do que eu, literalmente!

À Andreza Simões e Talles da Costa por todos os ensinamentos em 2016 relativos às metodologias, operação dos reatores, pelas conversas e conselhos. Adicionalmente, à Andreza pelo auxílio durante a preparação para a qualificação, e ao Talles pela explicação de alguns conceitos no período de escrita dessa dissertação.

Aos técnicos do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos, principalmente ao Oscar da Silva, Alexandra Gonçalves e Amadeus Gomes de Azevedo. Novamente ao Lucas, prof Dr. Edson Luiz e Oscar pela ajuda com o serviço pesado com a vinhaça, seja no retorno das coletas ou no armazenamento.

À Lívia, Priscila e Schayanna pelo auxílio com as análises no segundo semestre de 2017, pelas conversas e descontrações.

Às minhas grandes companheiras de pesquisa e amigas, Camila Menezes e Isabele Baima, pelo companheirismo diário, paciência e amizade para a vida. Dizem que Deus manda as pessoas certas nas horas certas. Nós fomos nosso apoio nas horas difíceis, risadas nas horas felizes, descontração nos momentos de cansaço e estresse. Eu não tenho como resumir o que vocês foram para mim nesses dois anos em poucas palavras. À Isa, sempre com pensamento positivo e motivação, a animação em pessoa que me colocava para cima, e a Camila, “pé no chão”, símbolo de força, com firmeza nas opiniões, palavras e incentivos. Obrigada por me fazerem acreditar em mim e por serem a minha força nos momentos em que mais precisei. Foi um grande prazer fazer pesquisa com vocês e desenvolver uma relação de amizade para a vida.

Aos amigos que conquistei durante o mestrado, especialmente a Marina, Naíza e Schayanna, que também foram apoio nos momentos difíceis e fizeram parte dos meus momentos mais felizes em São Carlos. Ao Danilo (Bolete), Hiago (Fissa), Murilo (Mineiro) e David pelos momentos de descontração e papos diversos sobre a vida. Aos meus amigos de longa data Antonia, João Paulo, Renan e Tamiris pela compreensão da minha distância nesse período e por lembrarem sempre de mim!

Ao meu orientador do TFG na graduação e parceiro de publicações, prof. MSc. Ivan Felipe dos Santos, por me inserir no contexto da geração de bioenergia a partir da vinhaça de cana-de-açúcar e me incentivar a seguir a carreira acadêmica. Também pela amizade e proximidade criada nesses quase quatro anos de contato.

À minha família, especialmente meus pais João Luís e Maria Margarete, por todo o incentivo, suporte emocional e financeiro quando preciso, pelos mimos e por entenderem e apoiarem muitas das abdicações necessárias nesse período. Vocês sempre me incentivaram a estudar, me desenvolver profissional e pessoalmente, me deram todo o apoio que precisei e são pais presentes. Me apoio nas suas histórias de vida para seguir em frente e tenho vocês como meus maiores exemplos.

À Larissa, por me ajudar em tantas coisas e me ouvir sempre, mesmo com a rotina acadêmica também pesada. Por ser, além de irmã, amiga, que sabe de tudo que se passou na minha vida e no meu íntimo nesses dois anos.

Aos meus filhos caninos Amiguinho, Athena, Billie e Zeus, por me mostrarem que a felicidade está nas coisas mais simples da vida.

Aos meus avós e padrinhos Cleusa e Waldomiro pela compreensão da minha ausência em alguns momentos, pelo carinho e amor de sempre.

À minha psicóloga Thais, por me acompanhar nessa jornada de autoconhecimento, pela postura e profissionalismo e por me ensinar a ser uma pessoa melhor.

A todos que de alguma forma fizeram parte dessa etapa e torceram pelo meu êxito e não foram citados também agradeço.

Meus sinceros e eternos agradecimentos.

“Se enxerguei mais longe foi porque me apoiei sobre os ombros de gigantes”

Isaac Newton

“Bom mesmo é ir à luta com determinação,

Abraçar a vida com paixão,

Perder com classe e vencer com ousadia,

Porque o mundo pertence a quem se atreve

E a vida é muito curta

Para ser insignificante”

Charlie Chaplin

RESUMO

BERNAL, A.P. **Bioprodução de hidrogênio e metabólitos solúveis em reatores anaeróbios de leito granular expandido mesofílicos e cultura mista utilizando vinhaça de cana-de-açúcar como substrato orgânico.** 2018. 151 p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

A produção de hidrogênio e intermediários químicos por processo fermentativo é uma linha de pesquisa atual e que pode representar uma alternativa ao setor sucroenergético de melhoria na eficiência produtiva e energética dos processos. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do tempo de detenção hidráulica (TDH) na produção de hidrogênio e metabólitos solúveis a partir de três reatores anaeróbios de leito granular expandido (EGSB) mesofílicos (30°C) independentes (EGSB-10, EGSB-20 e EGSB-30), operando em diferentes concentrações afluentes (10, 20 e 30 g DQO L^{-1}, respectivamente) e submetidos a tempos de detenção hidráulica de 24, 16, 8, 4, 2 e 1 h. No EGSB-10 o processo fermentativo não foi direcionado à produção de hidrogênio, sendo gerados, no entanto, compostos de interesse comercial (ácidos acético e propiônico) como metabólitos principais. O HAc produzido pela via homoacetogênica foi quantificado entre 29 e 41,3% do HAc total produzido no reator, justificando a ausência de hidrogênio nesse reator. No EGSB-20 a produção de hidrogênio ocorreu somente no TDH de 1 h (480 kg DQO m^{-3} d^{-1}), sendo a PVH igual a 4,36 ± 1,68 L d^{-1} L^{-1} e o HY 0,34 ± 0,05 mmol H_2 g^{-1} DQO. Já o EGSB-30 apresentou produção de hidrogênio nos TDH de 2 e 1 h, sendo a produção volumétrica de hidrogênio (PVH) máxima obtida no TDH de 1 h (8,77 ± 1,46 L d^{-1} L^{-1}) e o maior rendimento de hidrogênio (HY) obtido no TDH de 2 h (0,33 ± 0,08 mmol H_2 g^{-1} DQO). Em ambos os reatores (EGSB-20 e EGSB-30) a produção de hidrogênio foi favorecida pela elevação nas concentrações dos ácidos butírico e lático. A geração de ácido lático foi sugerida como fonte alternativa de carbono nesses reatores em condição de menor disponibilidade de carboidrato aos microrganismos, sendo, no entanto, uma via de baixo rendimento, o que justifica os valores reduzidos de HY. Os resultados obtidos evidenciaram a possibilidade de produção de hidrogênio e metabólitos solúveis por processo fermentativo a partir da vinhaça de cana-de-açúcar em reatores EGSB.

Palavras-chave: hidrogênio, metabólitos solúveis, reator EGSB, vinhaça de cana-de-açúcar, temperatura mesofílica.

ABSTRACT

BERNAL, A.P. **Hydrogen and soluble metabolites bioproduction in mesophilic expanded granular sludge bed reactors and mixed culture using vinasse from sugarcane as organic substrate.** 2018. 151 p. Dissertation (Master's Degree) – Engineering School of São Carlos, University of São Paulo, São Carlos, 2018.

Hydrogen and chemical intermediates production by fermentative process is a current research line and may present an alternative to the sugarcane industry to improve the productivity and energy efficiency of the process. Moreover, this study aimed to evaluate the effect of hydraulic retention time (HRT) over the production of soluble metabolites in three independent mesophilic (30°C) expanded granular sludge bed (EGSB) reactors named EGSB-10, EGSB-20 and EGSB-30. These EGSB reactors were operated at different feed concentrations (10, 20 and 30 g DQO L^{-1}) and hydraulic retention times of 24, 16, 8, 4, 2 e 1 h. In EGSB-10 the fermentation process was not directed towards hydrogen production. However, compounds of commercial interest (acetic and propionic acids) were produced as main metabolites. The acetic acid produced by the homoacetogenic pathway was quantified around 29 and 41.3% of total acetic acid, corroborating with the absence of hydrogen in this reactor. In EGSB-20 hydrogen production occurred only in HRT of 1 h. The hydrogen production rate (HPR) in this reactor was 4.36 ± 1.68 L d^{-1} L^{-1} and hydrogen yield (HY) was 0.34 ± 0.05 mmol H_2 g^{-1} COD. EGSB-30 presented hydrogen production in HRT of 2 and 1 h, with maximum HPR obtained in the HRT of 1 h (8.77 ± 1.46 L d^{-1} L^{-1}). The highest HY was achieved in HRT of 2 h (0.33 ± 0.08 mmol H_2 g^{-1} COD). In both rectors (EGSB-20 and EGSB-30), hydrogen production was favored by the increase of butyric and lactic acid concentrations. Lactic acid generation in the hydrogen production stages suggested the occurrence of an alternative carbon source in systems operated with carbohydrate limitation to the microorganisms. However, lactic acid generation is a metabolic route of low yield. As a consequence, HY was low in the evaluated experimental conditions. The production results evidenced the possibility of hydrogen and soluble metabolites production by fermentative process of sugarcane vinasse in EGSB reactors.

Keywords: hydrogen, soluble metabolites, EGSB reactor, sugarcane vinasse, mesophilic temperature.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 3.1 – Oferta Mundial de Energia por Fonte. Fonte: adaptado de BEN (2017) 32
Figura 3.2 – Produção de álcool e açúcar e subprodutos gerados no processo. Fonte: adaptado de Silva e Silva (2012) 35
Figura 3.3 – Esquema simplificado da digestão anaeróbia e produtos gerados. Fonte: adaptado de Foresti et al. (1999) 41
Figura 3.4 – Esquema geral da diversidade metabólica formada na fermentação anaeróbia, destacando a geração de ácidos e utilização de cultura mista. Fonte: adaptado de Oh et al. (2011); Saady (2013) 46
Figura 4.1 – Representação esquemática geral da estratégia de operação dos reatores EGSB. 75
Figura 4.2 – Especificações de EGSB-10, EGSB-20 e EGSB-30..... 76
Figura 4.3 – Esquema da instalação dos reatores EGSB em circuito aberto 77
Figura 4.4 – Instalação experimental do Reator Anaeróbio de Leito Granular Expandido (EGSB) mesofílico.... 78
Figura 4.5 – Metodologia de pré-tratamento térmico do lodo e dos grânulos constituintes do meio suporte para imobilização dos microrganismos 80
Figura 4.6 – Operação dos reatores EGSB em circuito fechado 81
Figura 4.7 – Adaptação dos reatores EGSB ao inóculo e substrato. 82
Figura 5.1 – Boxplot das conversões de carboidrato no EGSB-10. 92
Figura 5.2 – Boxplot das conversões de carboidrato no EGSB-20. 92
Figura 5.3 – Boxplot das conversões de carboidrato no EGSB-30. 93
Figura 5.4 – Boxplot da remoção de DQO em EGSB-10. 96
Figura 5.5 – Boxplot da remoção de DQO em EGSB-20 97
Figura 5.6 – Boxplot da remoção de DQO em EGSB-30 97
Figura 5.7 – Variação do pH afluente e efluente em função do tempo de detenção hidráulica e da carga orgânica aplicada. a) EGSB-10; b) EGSB-20; c) EGSB-30 100

Figura 5.8 – Distribuição de metabólitos no EGSB-10 nas seis fases de operação.....106
Figura 5.9 – Concentrações de metabólitos solúveis produzidos no EGSB-10 em função do TDH 106
Figura 5.10 – Distribuição de metabólitos no EGSB-20 nas seis fases de operação.....112
Figura 5.11 – Concentrações de metabólitos solúveis produzidos no EGSB-20 em função do TDH 112
Figura 5.12 – Distribuição de metabólitos no EGSB-30 nas seis fases de operação.....118
Figura 5.13 – Concentrações de metabólitos solúveis produzidos no EGSB-30 em função do TDH 118
Figura 5.14 – Relação entre rendimento de hidrogênio (HY) e rendimento na produção de ácido lático (HLaY) ao longo das fases de operação do EGSB-30. 121
Figura 5.15 – Percentual de hidrogênio em função do tempo de detenção hidráulica e aumento da taxa de carregamento orgânico.....126
Figura 5.16 – Rendimento de hidrogênio em função da redução do tempo de detenção hidráulica e aumento da taxa de carregamento orgânico 128
Figura 5.17 – Produção volumétrica de hidrogênio em função da redução do TDH e aumento da taxa de carregamento orgânico.....130

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Composição da vinhaça segundo o mosto a partir da cana-de-açúcar. Fonte: Moraes, Zaiat e Bonomi (2015)..... 38
Tabela 3.2 – Produção mundial e algumas aplicações dos principais ácidos orgânicos voláteis de cadeia curta utilizados no setor industrial..... 57
Tabela 3.3 – Condições utilizadas na literatura a respeito da produção de hidrogênio a partir da vinhaça..... 67
Tabela 3.4 – Resumo da literatura sobre produção de hidrogênio utilizando o reator EGSB.....73
Tabela 4.1 – Especificações de EGSB-10, EGSB-20 e EGSB-30 76
Figura 4.2 – Composição média da vinhaça de cana-de-açúcar utilizada como substrato (Safra 2017)..... 79
Tabela 4.3 – Composição do meio nutricional utilizado nos reatores EGSB..... 79
Tabela 4.4 – Descrição das fases de operação de EGSB-10, EGSB-20, EGSB-30. 83
Tabela 4.5 – Análises realizadas em amostras coletadas nas fases operacionais de EGSB-10, EGSB-20 e EGSB-30.. 86
Tabela 5.1 – Concentrações e conversões médias de carboidrato nos reatores EGSB 90
Tabela 5.2 – Remoção de DQO em EGSB-10, EGSB-20 e EGSB-30. 95
Tabela 5.3 – Valores médios de pH afluente e efluente em função do tempo de detenção hidráulica aplicado aos reatores EGSB operados em diferentes concentrações afluentes.. 99
Tabela 5.4 – Concentrações de SST, SSF e SSV em função dos tempos de detenção hidráulica aplicados em EGSB-10, EGSB-20 e EGSB-30..... 102
Tabela 5.5 –Concentração (g L^{-1}) e fração molar (%) dos metabólitos detectados durante a operação do EGSB-10. 105
Tabela 5.6 – Teste de homoacetogênese para cada fase operacional do EGSB-10..... 108
Tabela 5.7 – Concentração (g L^{-1}) e fração molar (%) dos metabólitos detectados durante a operação do EGSB-20 111
Tabela 5.8 – Concentração (g L^{-1}) e fração molar (%) dos metabólitos detectados durante a operação do EGSB-30 117
Tabela 5.9 – Valores médios de percentual de hidrogênio no biogás, produção volumétrica e rendimento de hidrogênio para os diferentes tempos de detenção hidráulica aplicados..... 124
Tabela 5.10 – Comparação do desempenho de EGSB-20 e EGSB-30 em relação à literatura a partir da vinhaça visando a produção de hidrogênio. 132

Tabela 5.11 – DQO equivalentes utilizadas nos cálculos dos balanços de massa da fração solúvel e global..... 135
Tabela 5.12 –Balanço de massa da fração solúvel em relação à DQO total efluente do EGSB-10 (10000 mg L^{-1}) do EGSB-10 (10000 mg L^{-1}). 138
Tabela 5.13 – Balanço de massa da fração solúvel em relação à DQO total efluente do EGSB-20 (20000 mg L^{-1}). 139
Tabela 5.14 – Balanço de massa da fração solúvel em relação à DQO total efluente do EGSB-30 (30000 mg L^{-1}). 140
Tabela 5.15 – Balanço de massa global do EGSB-10 (10000 mg L^{-1}). 141
Tabela 5.16 – Balanço de massa global do EGSB-20 (20000 mg L^{-1}). 141
Tabela 5.17 – Balanço de massa global do EGSB-30 (30000 mg L^{-1}). 142
Tabela 5.18 – Comparação com Fuess et al. (2016) em relação às divergências obtidas entre a fração discriminada e não discriminada.....143

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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

Acetil-CoA – Acetil-coenzima A

APBR – *Anaerobic Packed-Bed Reactors* (Reator Anaeróbio de Leito Empacotado)

APHA – *American Public Health Association* (Associação Americana de Saúde Pública)

ASBR – *Anaerobic Sequencing Batch Reator* (Reator Anaeróbio em Batelada Sequencial)

ATP – Adenosina Trifosfato

ATR – Açúcar Total Recuperável

BNDES – Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social

C_{afl} – Carboidrato Afluente

C_{efl} – Carboidrato Efluente

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

CGEE – Centro de Gestão e Estudos Estratégicos

CH_4 – gás metano

CO_2 – gás carbônico

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento

CSTR – *Continuous Stirred-Tank Reactor* (Reator Contínuo de Tanque Agitado)

DBO – Demanda Bioquímica de Oxigênio

ΔG – Energia Livre de Gibbs

DQO – Demanda Química de Oxigênio

DQO aplicada – DQO efluente do reator, medida em g L^{-1}.

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

EGSB-10 – Reator de vinhaça acidogênico com concentração afluente de 10 g DQO L^{-1}

EGSB-20 – Reator de vinhaça acidogênico com concentração afluente de 20 g DQO L^{-1}

EGSB-30 – Reator de vinhaça acidogênico com concentração afluente de 30 g DQO L^{-1}

EPE – Empresa de Pesquisa Energética

ETE – Estação de Tratamento de Efluentes

EtOH – Etanol

FHL – formato: hidrogênio liase

GEE – Gases de Efeito Estufa

H_2 – Gás hidrogênio

H^+ - Íon hidrogênio

HAc – Ácido Acético

HBu – Ácido Butírico

HCa – Ácido Capróico

HIsoBu – Ácido Isobutírico

HIsoVa – Ácido Isovalérico

HLa – Ácido Lático

HPr – Ácido Propiônico

HSu – Ácido Succínico

HVa – Ácido Valérico

HydA - Fd-dependente hidrogenase

HY – *hydrogen yield* (rendimento de hidrogênio) (mmol H_2 g^{-1} DQOapl; mol H_2 mol^{-1} hexose)

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IEL/NC – Instituto Euvaldo Lodi – Núcleo Central

NAOH – Hidróxido de Sódio

NFOR – NAD(P)H ferredoxina oxidoredutase

N-HBu – N-butirato

N_2 – gás nitrogênio

OD – Oxigênio Dissolvido

PDO – 1,3-Propanodiol

pH – potencial hidrogeniônico

pH_{aflu} – pH afluente aplicado ao reator

pH_{eflu} – pH efluente aplicado ao reator

PBD – Polietileno de Baixa Densidade

PET – Polietileno Tereftalato

PFL - piruvato:formato liase

PFOR – piruvato: ferredoxina oxiredutase (PFOR)

PVA – Poliacetato de Vinila

PVH – Produção Volumétrica de Hidrogênio (L H_2 d^{-1} L^{-1})

RALF – Reator Anaeróbio de Leito Fluidificado

SSF – Sólidos Suspensos Fixos (mg L^{-1})

SST – Sólidos Suspensos Totais (mg L^{-1})

SSV – Sólidos Suspensos Voláteis (mg L^{-1})

ST – Sólidos Totais (mg L^{-1})

TCO – Taxa de Carregamento Orgânico aplicada em DQO (kg DQO m^{-3} d^{-1})

TDH – Tempo de Detenção Hidráulica

UASB – *Upflow Anaerobic Sludge Blanked Reactor* (Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO **29**

2. OBJETIVOS **31**

2.1. OBJETIVO GERAL 31

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 31

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA **32**

3.1. SETOR SUCROENERGÉTICO NO BRASIL: HISTÓRICO E INDÚSTRIA 33

3.2. VINHAÇA: CARACTERÍSTICAS GERAIS E DISPOSIÇÃO FINAL 36

3.3. DIGESTÃO ANAERÓBIA, PRODUÇÃO ENERGÉTICA E DE COMPOSTOS ORGÂNICOS 40

3.3.1. Aspectos Gerais da Digestão Anaeróbia **40**

3.3.2. Hidrogênio **41**

3.3.3. Produção biológica de hidrogênio por fermentação escura **43**

3.3.3.1. Rotas Fermentativas para produção de hidrogênio e metabólitos solúveis **444**

3.3.4. Efeito de parâmetros operacionais na produção fermentativa de hidrogênio **49**

3.3.4.1. Inóculo **50**

3.3.4.2. Potencial Hidrogeniônico (pH) **51**

3.3.4.3. Temperatura **53**

3.3.4.4 Tempo de detenção hidráulica (TDH) e concentração de substrato **55**

3.3.5. Aplicações biotecnológicas de ácidos orgânicos voláteis de cadeia curta derivados de processo fermentativo **56**

3.3.5.1. Ácido Acético **58**

3.3.5.2. Ácido Propiônico **58**

3.3.5.3. Ácido Butírico **59**

3.3.5.4. Ácido Lático **59**

3.4. BIOPRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO A PARTIR DA VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR 60

3.5. REATOR ANAERÓBIO DE LEITO GRANULAR EXPANDIDO (EGSB) 69

3.6. CONSIDERAÇÕES GERAIS 74

4.1. ESTRATÉGIA DE OPERAÇÃO 75

4.3. ÁGUA RESIDUÁRIA E MEIO NUTRICIONAL 78

4.4. INÓCULO E MEIO SUPORTE 79

4.6. OPERAÇÃO DOS REATORES EM MODO CONTÍNUO..... 82
4.7. MÉTODOS ANALÍTICOS..... 84
4.7.1. Análises físico-químicas..... 84
4.7.2. Determinação de carboidrato 84
4.7.3. Determinação da produção e composição do biogás 85
4.7.4. Análise de Metabólitos Solúveis..... 85
4.7.5. Frequência das análises 86
5.1. CONSUMO DE CARBOIDRATO 90
5.3. INFLUÊNCIA DO pH..... 98
5.5.1. Reator EGSB de vinhaça com concentração afluente de vinhaça de 10 g DQO L^{-1} (EGSB-10)..... 104
5.5.2. Reator EGSB de vinhaça com concentração afluente de vinhaça de 20 g DQO L^{-1} (EGSB-20)..... 109
5.5.3. Reator EGSB de vinhaça com concentração afluente de vinhaça de 30 g DQO L^{-1} (EGSB-30)..... 115
5.6. PERFORMANCE DOS REATORES EGSB NA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO..... 123
5.6.1. Composição do biogás..... 123
5.6.2. Rendimento de Hidrogênio (HY)..... 127
5.6.3. Produção Volumétrica de Hidrogênio (PVH) 130
7. SUGESTÕES..... 145
REFERÊNCIAS..... 146

1. INTRODUÇÃO

A crescente demanda energética levou a humanidade a explorar os recursos naturais disponíveis de forma intensiva, acarretando consequências ambientais negativas para o ambiente. A nível global, a problemática das alterações climáticas implica na necessidade de diversificação da matriz de geração de energia com fontes mais limpas e renováveis.

Nesse contexto, a demanda por biocombustíveis encontra-se em ascensão no mundo. No Brasil, desde a década de 1970, a partir do incentivo do Proálcool, a cana-de-açúcar estabeleceu-se como uma das fontes mais importantes do país para a geração de energia através da biomassa. Apesar de tratar-se de uma fonte de energia limpa, o setor sucroalcooleiro gera impactos ambientais significativos, na medida em que produz emissões de gases de efeito estufa (GEE) durante a fase agrícola, industrial e na disposição dos resíduos. A vinhaça, principal resíduo da produção do etanol devido à sua grande geração por litro de álcool produzido (10 a 15 litros por litro de álcool, podendo chegar a até 20 litros) e ao seu alto potencial poluidor (CORTEZ et al., 1992; VAN HAANDEL, 2003), contribui com a emissão de GEE durante seu armazenamento, transporte e aplicação no solo através da fertirrigação, processo mais utilizado para disposição final no Brasil. Outros impactos dessa prática podem ser destacados, como a deterioração das características físico-químicas do solo e de corpos d´água superficiais e subterrâneos após sucessivas ou inadequadas aplicações considerando a composição da vinhaça, rica em matéria orgânica, nutrientes e sais (sulfato, cloretos e nitratos) (OLIVEIRA et al., 2013; FUESS; GARCIA, 2014).

Visando a adequação ambiental e a otimização de energia no contexto de biorrefinaria, outras alternativas para a destinação da vinhaça devem ser desenvolvidas. Além do processo convencional da digestão anaeróbia com produção de metano, a fermentação acidogênica também se revela como alternativa promissora, pois permite a recuperação energética na forma de hidrogênio concomitante à geração de compostos de interesse comercial, além de contribuir para a sustentabilidade na geração de energia e promover destinação alternativa à vinhaça de cana-de-açúcar. O gás hidrogênio é um *commodity* industrial importante, que possui a maior conversão energética por massa unitária quando comparado a outros combustíveis (142 kJ g^{-1}, equivalente a 2,75 vezes a da gasolina); reciclabilidade e natureza não poluidora (KIM; KIM, 2011; PATTRA et al., 2011; SINHA; PANDEY, 2011; WANG; LI; REN, 2013). No entanto, a maioria das matérias–primas provém de origem fóssil, além dos processos que o originam não serem viáveis do ponto de vista ambiental. Logo, dada a necessidade de transição da matriz

energética mundial para alternativas limpas e sustentáveis, é necessário o desenvolvimento de novas tecnologias e processos.

O processo fermentativo visando a produção de hidrogênio revela-se como um método alternativo e promissor, visto que pode ser executado em temperatura e pressão ambientes, necessita de menor energia e contribui para a sustentabilidade na geração de energia. Além disso, há a geração de produtos metabólicos economicamente interessantes (ácidos orgânicos e álcoois) (MOHAN; BABU; SARMA, 2007; KHOTARI, 2012; SHOW et al., 2012). Para que o hidrogênio seja produzido, deve haver controle de alguns parâmetros nos reatores, bem como pré-tratamento do inóculo, a fim de evitar a ocorrência da metanogênese. (SHOW et al., 2012).

Alguns estudos foram desenvolvidos utilizando a vinhaça como substrato para a geração de hidrogênio e metabólitos solúveis em reatores em batelada (LAZARO et al., 2014) e diferentes configurações de reatores anaeróbios em modo contínuo, sendo os principais o Reator Anaeróbio de Leito Fluidificado (RALF) (SANTOS et al. 2014a, 2014b, 2014c; REIS et al., 2015; FERREIRA, 2016; REGO, 2016, RAMOS, 2016) e o Reator Anaeróbio de Leito Empacotado (*Anaerobic Packed Bed Reactor* - APBR) (FERRAZ JUNIOR et al., 2015a, 2015b; FUESS et al., 2016). Considerando a crescente geração da vinhaça de cana-de-açúcar em decorrência do aumento da produção de etanol no Brasil, além da importância do hidrogênio como combustível na futura matriz energética brasileira, é notório que outras tecnologias visando a produção fermentativa desse gás devem ser exploradas a fim de se obter maiores rendimentos no processo.

O Reator Anaeróbio de Leito Granular Expandido (EGSB) é uma alternativa promissora, pois consiste em uma modificação do Reator UASB (NICOLELLA et al.; 2000), utilizando o sistema de células imobilizadas e permitindo maior interação entre substrato e biomassa a partir da expansão do leito e aumento da mistura hidráulica. Além disso, promove a expulsão contínua dos sólidos suspensos do reator e necessita de menor área de operação (LETTINGA et al., 1993; 1997). No entanto, essa configuração de reator ainda não foi utilizada para produção de hidrogênio a partir da vinhaça.

Nesse contexto, o presente estudo apresenta o seu diferencial no processo contínuo de produção fermentativa de hidrogênio e metabólitos solúveis sob condição mesofílica (30℃) e cultura mista em três reatores operados na configuração EGSB e alimentados com vinhaça de cana-de-açúcar. Esse estudo visou investigar a influência do TDH em 24, 16, 8, 4, 2 e 1 h e de concentrações afluentes estabelecidas de 10 g DQO L^{-1} (EGSB-10), 20 g DQO L^{-1} (EGSB-20) e 30 g DQO L^{-1} (EGSB-30) na geração de hidrogênio e produtos metabólitos solúveis.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo principal deste trabalho foi investigar a produção de hidrogênio e metabólitos solúveis em reatores anaeróbios de leito granular expandido (EGSB) independentes, sob temperatura mesofílica (30°C), cultura mista e vinhaça de cana-de-açúcar como substrato orgânico.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos foram:

i. Avaliar a influência do tempo de detenção hidráulica (TDH), nas faixas de 24, 16, 8, 4, 2 e 1 h, sobre a produção biológica de hidrogênio e metabólitos solúveis em três reatores EGSB mesofílicos independentes com concentrações afluentes de substrato fixas de 10, 20 e 30 g DQO L^{-1};

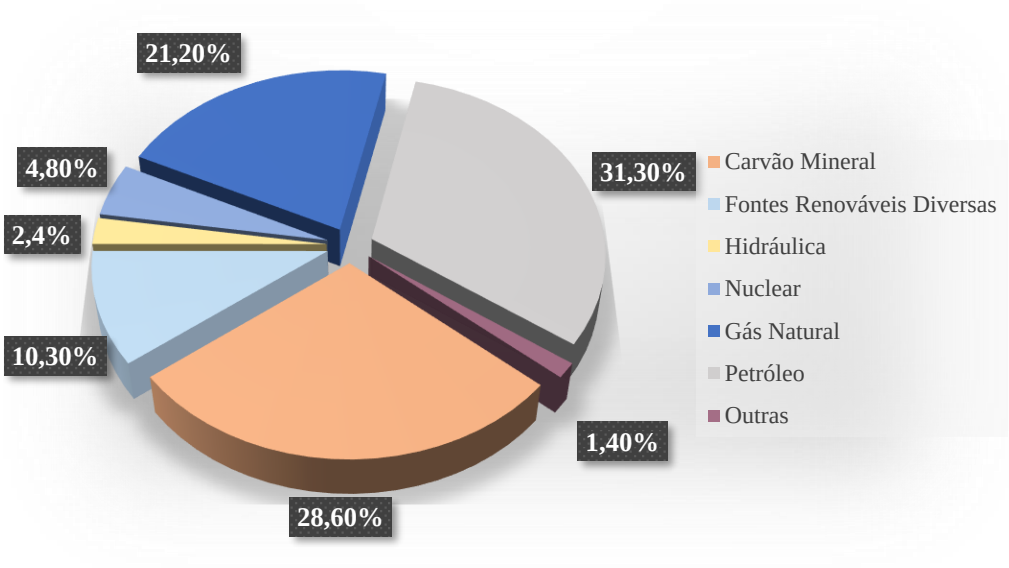
ii. Avaliar qualitativa e quantitativamente a distribuição de metabólitos solúveis produzidos em função da redução do TDH, de modo a definir a influência dos metabólitos predominantes no processo fermentativo.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

O consumo de combustíveis fósseis cresce exponencialmente com as melhorias na qualidade de vida, industrialização de países emergentes e aumento da população mundial. Antes da Revolução Industrial, ocorrida no final do século XVIII, o crescimento econômico e volume de produção de bens e serviços era bastante modesto; no entanto, o consumo desenfreado de combustíveis fósseis como ocorre atualmente no mundo não só está levando ao esgotamento das reservas, mas também a impactos significativos no meio ambiente, resultando em maiores riscos para a saúde e de mudanças climáticas globais (PANWAR; KAUSHIK; KOTHARI, 2011).

Nessa perspectiva, os debates sobre promoção de uma economia sustentável tornam-se cada vez mais frequentes, ao mesmo tempo em que a ciência avança e há o desenvolvimento de novas tecnologias menos poluentes. O Brasil é um dos poucos países que possuem matriz de energia elétrica majoritariamente limpa, com mais de 80% da capacidade instalada proveniente de fontes renováveis (EPE, 2017). Em geral, os combustíveis fósseis contribuem com massiva parcela na geração de energia em escala global, conforme Figura 3.1.

Figura 3.1 - Oferta mundial de energia por fonte.



Fonte: Adaptado de EPE (2017).

Dentre as possibilidades de fontes energéticas alternativas, a bioenergia é uma das mais promissoras, pois está disponível a partir de materiais derivados de fontes biológicas. Os biocombustíveis são uma opção para reduzir os danos das emissões de gases de efeito estufa, aumentando a diversificação e segurança de abastecimento de energia, além de gerar oportunidades de emprego e desenvolvimento agroindustrial (SCARTLAT; DALLEMAND, 2011).

3.1. SETOR SUCROENERGÉTICO NO BRASIL: HISTÓRICO E INDÚSTRIA

Segundo BNDES e CGEE (2008), a cana-de-açúcar é cultivada no Brasil desde 1532. Foi introduzida no país por Martim Afonso de Souza, primeiro colonizador português, com a intenção de implantar engenhos de açúcar tal como os existentes nas Ilhas de Açores. A espécie teve boa adaptação ao solo brasileiro, sendo cultivada ao longo da costa brasileira e promovendo o ciclo da economia canavieira por quase dois séculos no país. Em meados do século XVII houve a expulsão dos holandeses do Nordeste e a expansão da agroindústria açucareira nas Antilhas, reduzindo a importância do Brasil no cenário mundial. No entanto, essa atividade permaneceu na economia brasileira, ganhando destaque novamente na década de 1920, com o início da produção de álcool no país.

Em 1931 houve a criação do Instituto do Açúcar e do Álcool (IAA) e, nesse mesmo ano, a fim de desestimular a dependência brasileira de combustíveis derivados de petróleo, o governo do então presidente Getúlio Vargas determinou a mistura de 5%, no mínimo, de bioetanol anidro à gasolina, sendo papel do IAA estabelecer preços, percentual de mistura e cotas de produção. Esse teor de álcool misturado à gasolina foi modificado ao longo dos anos, sendo, atualmente, 25% para a gasolina *premium* e 27% para a gasolina comum, segundo a Portaria nº 75, de 05 de março de 2015, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. A indústria do etanol no Brasil consolidou-se, no entanto, a partir do Programa Nacional do Etanol (PROÁLCOOL), instituído em 1975, e contribuiu muito para a redução da dependência do petróleo como fonte energética durante a crise do petróleo nos países do Oriente Médio, a qual afetou toda a economia mundial (CHRISTOFOLETTI, 2013).

Apesar do bioetanol ser produzido com base em qualquer biomassa que contenha quantidades significativas de amido ou açúcares, como grãos (trigo, milho), cana-de-açúcar, óleos de sementes (canola, soja, etc) e óleo de palma, no Brasil a cana-de-açúcar predomina devido a alguns fatores, como históricos, condições ambientais e clima propício. Segundo o

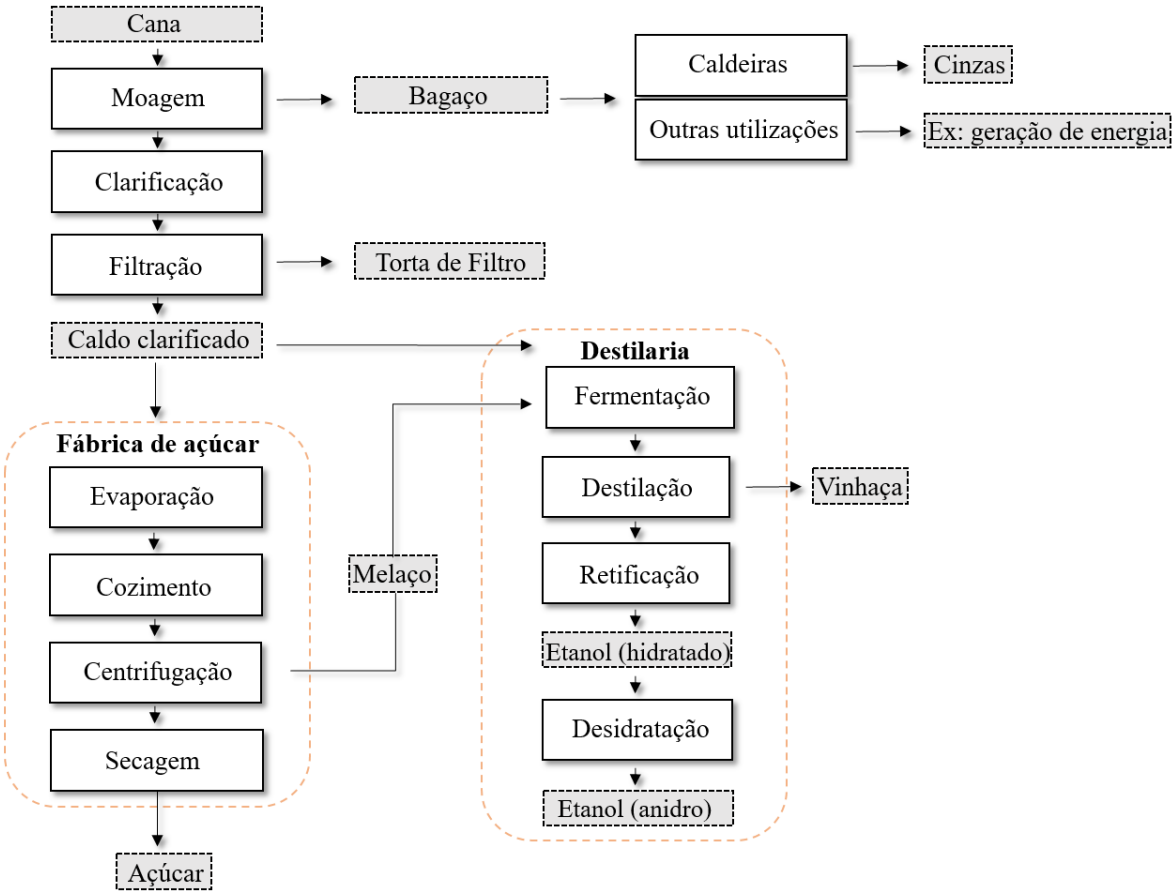
IBGE (2017), a cana de açúcar é o terceiro cultivo mais relevante em área colhida no Brasil, somente perdendo para o milho e a soja. Dados do CONAB estimados em dezembro de 2017 apontam que a área de cana-de-açúcar colhida na safra 2017/2018 foi 8738,6 hectares (redução de 3,4% em relação à safra 2016/2017), a produção de 635,6 milhões de toneladas (redução de 3,3% em relação à safra anterior) e a produtividade 72.734 kg ha^{-1} (0,2% de aumento); sendo esse aumento atribuído à recuperação de lavouras no Norte-Nordeste (8,1%) (EPE, 2017).

Mesmo com o aumento nas exportações de açúcar em 2017, as unidades de produção destinaram, a partir de Setembro, entre 29,4 e 30,1% da cana moída para o etanol, uma vez que o preço do açúcar entrou em queda. Essa mudança, aliada à alta dos preços da gasolina no país, a qual promoveu aumento de 14,8% de consumo de etanol hidratado, aumentou as estimativas de produção de etanol para esse ano, passando de 26,1 para 27,1 bilhões de litros, sendo favorecida também pela melhora do ATR médio devido ao inverno mais seco. No entanto, a produção foi 2,6% mais baixa que na safra anterior.

Como expresso pelo CONAB em dezembro de 2017, São Paulo, responsável por 54% da cana-de-açúcar processada, teve seu calendário de moagem concentrado entre Abril e Novembro (EPE, 2017). As condições climáticas, caracterizadas pelo clima seco no terceiro trimestre do ano favoreceram a operacionalização da colheita no campo. Assim, a moagem foi constante nesses meses, fazendo com que as unidades acelerassem o processamento, temendo oscilação climática e histórico de chuvas a partir de outubro. Em virtude disso, a maioria das unidades produtivas encerraram suas atividades em novembro.

A cadeia produtiva do etanol e açúcar a partir da cana-de-açúcar é composta por várias etapas. A Figura 3.2 ilustra, simplificadamente, uma típica usina do tipo Anexa (açúcar e etanol), com destaque para os processos e resíduos gerados.

Figura 3.2 - Produção de álcool e açúcar e subprodutos gerados no processo.



Fonte: Adaptado de Silva e Silva (2012).

Inicialmente a cana-de-açúcar é recebida na usina, lavada e moída. Em seguida, o suco extraído (moagem ou difusão) é enviado à clarificação, onde as impurezas são removidas e o pH ajustado, a fim de fornecer material adequado para as próximas etapas. Toda a energia (vapor e eletricidade) necessária ao processo é produzida pela própria usina, utilizando bagaço como combustível. Em muitas usinas, a energia excedente é destinada à cogeração. O residual da clarificação é filtrado para melhorar a recuperação de açúcares e retorna ao processo. O que não é recuperado é denominado torta de filtro e usado como adubo (BNDES; CGEE, 2008).

Para a produção de açúcar, o caldo é concentrado em evaporadores e cozedores para a cristalização da sacarose. Em seguida é feita a centrifugação e secagem, dando origem ao açúcar. Nesse processo, nem todos os açúcares são cristalizados, sendo gerado o mel final ou

melaço, podendo ser utilizado como matéria-prima para a produção do bioetanol (BNDES; CGEE, 2008).

Na produção de etanol ocorre o processo de fermentação, onde os açúcares do caldo da cana direto ou das misturas de caldo e melaço são fermentados em etanol e outros co-produtos (álcoois, ácidos orgânicos, glicerol, etc), gerando, simultaneamente, gás carbônico. Esse processo ocorre em faixa de 30-34℃ e produz vinho com baixo teor de etanol (10℃GL) devido à inibição do fermento relacionada ao substrato, produto e temperatura. O vinho fermentado é centrifugado e mandado em seguida às colunas de destilação e retificação, produzindo etanol hidratado. Como resíduo da destilação tem-se a vinhaça. Para ser usado misturado à gasolina, o álcool é desidratado, tornando-se álcool anidro (DIAS et al., 2015).

Atualmente, o setor sucroenergético não engloba somente a produção de álcool e açúcar, pois explora possibilidades de diversificação, que são revertidas como melhoria de qualidade de vida, atrelada a aspectos ambientais, bem como a redução de custos de produção pelo reaproveitamento de co-produtos (bagaço), resíduos (melaço, vinhaça), etc. As possibilidades incluem produtos biotecnológicos (inseticidas, biofungicidas, praguicidas), químicos (plásticos, vinhaça concentrada, indústria de papel e celulose), fármacos veterinários (probióticos), alimentos (levedura de vinhaça, licores e cremes, cogumelos comestíveis) e estruturais (cimento, aglomerados de bagaço) (IEL/NC; SEBRAE, 2005).

Quando consideradas as questões ambientais, deve-se atentar ao caráter renovável do etanol e açúcar, potencial para redução de gases de efeito estufa (GEE), bem como os resíduos gerados na cadeia produtiva. Segundo Moraes, Zaiat e Bonomi (2015), dentro uma perspectiva ambiental, a substituição dos combustíveis fósseis pelo etanol deveria reduzir as emissões de GEE. No entanto, o processo de produção do etanol e açúcar gera grandes volumes de águas residuárias, especialmente a vinhaça, podendo constituir sérios prejuízos ambientais dependendo da destinação final desse resíduo.

3.2. VINHAÇA: CARACTERÍSTICAS GERAIS E DISPOSIÇÃO FINAL

A vinhaça é o principal resíduo líquido produzido em destilarias de aguardente e de álcool autônomas ou anexas às usinas de açúcar quando é feita a separação do etanol do mosto fermentado. Usualmente é um composto ácido (ph entre 3,5 e 5), marrom escuro, com uma alta DQO (em torno de 50-150 g L^{-1}) e um odor desagradável aos humanos (ALMANÇA, 1994; WALISZEWSKI et al, 1997; ESPAÑA-GAMBOA et al., 2011; CHRISTOFOLETTI, 2013).

Segundo Cortez et al. (1992), são gerados entre 10 e 15 litros de vinhaça para cada litro de álcool produzido. Ludovice (1996) afirma que a mesma relação fica em torno de 13 m^3 de vinhaça por m^3 de álcool. Já Van Haandel (2003) relatou uma produção máxima de 20 m^3 de vinhaça por m^3 de álcool.

A vinhaça recebe, de acordo com Almança (1994), três diferentes denominações segundo o mosto que lhe deu origem: a vinhaça de mosto de caldo, vinhaça de mosto de melaço e vinhaça de mosto misto. O nome "mosto" se refere aos líquidos passíveis de fermentação, sendo que o mosto de caldo provém da cana-de-açúcar moída; o mosto de melaço, da separação do açúcar cristalizado e do mel final que o acompanha; já o mosto misto é a mistura dos dois mostos anteriores. Em plantas anexas, as quais produzem açúcar e etanol, a vinhaça deriva de mosto misto. Já em usinas autônomas, que somente produzem etanol, a vinhaça é originada a partir do caldo de cana.

Em linhas gerais, a vinhaça é composta por 93% de água e 7% de sólidos, sendo 75% desses correspondentes à matéria orgânica (LUDOVICE, 1996). A fração sólida corresponde principalmente aos compostos orgânicos e elementos minerais, sendo que em torno de 20% é o potássio (íon K^+), nutriente determinante para a definição da dose a ser aplicada nos solos (MARQUES, 2006). Já os principais compostos orgânicos presentes na vinhaça consistem em ácidos orgânicos (principalmente lactato e acetato), além de álcoois (glicerol e etanol) e pequena quantidade de carboidratos (MORAES; ZAIAT; BONOMI, 2015).

A vinhaça derivada do melaço normalmente possui maiores valores de DQO e DBO, devido à concentração de açúcares no melaço a partir da cristalização e evaporação do caldo, aumentando a quantidade de matéria orgânica não fermentável que permanece na vinhaça após fermentação. A literatura relata maiores concentrações de potássio, bem como de cálcio, magnésio e fósforo devido à adição desses nutrientes no processamento do açúcar. Além da variação na composição de acordo com o mosto, há ainda que se considerar a safra, além de variações no processo industrial e diferentes matérias-primas (variedades da cana-de-açúcar e níveis de fertilidade) (WILKIE, 2000; MORAES; ZAIAT; BONOMI, 2015). A tabela 3.1 apresenta uma compilação feita por Moraes, Zaiat e Bonomi (2015) de estudos que realizaram a caracterização da vinhaça, apresentando os principais parâmetros de acordo com a matéria-prima.

Tabela 3.1 - Composição da vinhaça segundo o mosto a partir da cana-de-açúcar.

Parâmetros	**Matéria-prima**			
	Caldo de Cana	**Melaço**	**Mistura**	**Unidade**
pH	3,7 - 4,6	4,2 - 4,5	3,9 - 4,6	-
DQO	15 - 33	52 - 84,9	31,5 - 45	(g L^{-1})
DBO	6 -17	25 - 39	11,3 - 20	(g L^{-1})
Nitrogênio	0,2 - 0,7	0,5 - 1,6	0,07 - 0,7	(g L^{-1})
Fósforo	0,004 - 0,25	0,04 - 0,19	0,004 - 0,2	(g L^{-1})
Potássio	0,6 - 2,0	2,5 - 6,5	1,2 - 3,8	(g L^{-1})
Sulfato	0,2 - 1,4	1,2 - 3,5	0,15 - 1,3	(g L^{-1})
Cálcio	0,1 - 1,1	0,3 - 3,6	0,46 - 3,3	(g L^{-1})
Magnésio	0,1 - 0,3	0,3 - 0,9	0,29 - 0,4	(g L^{-1})
Sólidos Totais	21,1 - 24	82	53 - 158	(g L^{-1})
Sólidos Voláteis	15,6 - 20	60	13	(g L^{-1})
Fenóis	-	-	1,1	(mg L^{-1})
Acúcares reduzidos	7,9	9,5	1,0 - 8,3	(g L^{-1})

Fonte: Moraes, Zaiat e Bonomi (2015).

A vinhaça possui um grande potencial de degradação ambiental, especialmente no que diz respeito aos corpos d’água. Quando é despejada em rios, o oxigênio dissolvido pode ser totalmente consumido, tornando a água putrescível (GLORIA, 1975 apud. LAIME, 2011). Também pode haver, na vinhaça, a presença de metais pesados e poluentes orgânicos xenobióticos como fenol, cloreto de metileno, clorofórmio e pentaclorofenol. Os compostos fenólicos (ácido tânico e húmico) podem contribuir com a coloração da vinhaça e possuem propriedades antioxidantes, sendo tóxicos a muitos microrganismos, tais como os presentes em processos biológicos de tratamento de águas residuárias. O seu despejo em cursos d’água provoca mau cheiro e contribui para o agravamento de endemias como a malária, amebíase e esquistossomose (WILKIE; RIESEDEL; OWENS, 2000; ALMEIDA, 1952 apud AQUINO, 2012).

Até meados de 1970, apesar de conhecida a ação poluente da vinhaça, o seu lançamento em mananciais de superfície e “áreas de sacrifício” (áreas próximas às usinas onde a vinhaça era depositada sobre o solo), era uma prática recorrente. Inúmeros problemas ecológicos, sociais, políticos e econômicos decorrentes do despejo de vinhaça em leitos d’água foram

registrados em literaturas que tratam da disputa entre usineiros e população até a década de 70, quando ocorreu a proibição da disposição da vinhaça em rios, lagos e outros cursos d'água brasileiros, embora na década de 1930 a prática já fosse vetada por dispositivos legais (GRANATO, 2003). A partir de 1970 a principal destinação para a vinhaça passou a ser a fertirrigação.

Embora alguns benefícios a curto prazo da fertirrigação devam ser considerados, como as reduções na utilização de água fresca e adubos minerais, além do aprimoramento da atividade microbiana, a aplicação direta de vinhaça no solo pode representar um problema, visto que o baixo pH e as concentrações elevadas de sais, sulfato e matéria orgânica podem comprometer a estrutura do solo e arredores de corpos d'água, além de reduzir a produtividade das culturas (FUESS; GARCIA, 2014).

A disposição, tratamento e reuso da vinhaça melhoraram nas três últimas décadas, porém as políticas e regulamentos que fornecem diretrizes ainda são ineficientes e desatualizados. Os critérios para armazenamento, transporte e aplicação de vinhaça no solo somente foram regulamentados em 2006 no estado de São Paulo pela norma estadual P4.231 da CETESB, a qual prescreve a aplicação de vinhaça no solo de acordo com o teor de potássio, desprezando o excesso de matéria orgânica no solo, bem como a diferença na composição da vinhaça segundo o processo, que pode levar a diferentes intensidades de impactos ambientais, como emissão de gases poluentes contaminação do solo por metais pesados, sulfato, sais, além da contaminação de água subterrânea (MORAES; ZAIAT; BONOMI., 2015).

Visando otimizar o potencial de geração de energia e sustentabilidade na produção de etanol, os resíduos gerados podem ser considerados matéria-prima para outros processos. No que diz respeito ao tratamento biológico de águas residuárias, os avanços científicos e tecnológicos alcançados nos últimos anos proporcionaram desenvolvimento de pesquisas voltadas à recuperação de energia e produtos a partir dos resíduos (MORAES; ZAIAT; BONOMI, 2015).

3.3. DIGESTÃO ANAERÓBIA, PRODUÇÃO ENERGÉTICA E DE COMPOSTOS ORGÂNICOS

3.3.1. Aspectos Gerais da Digestão Anaeróbia

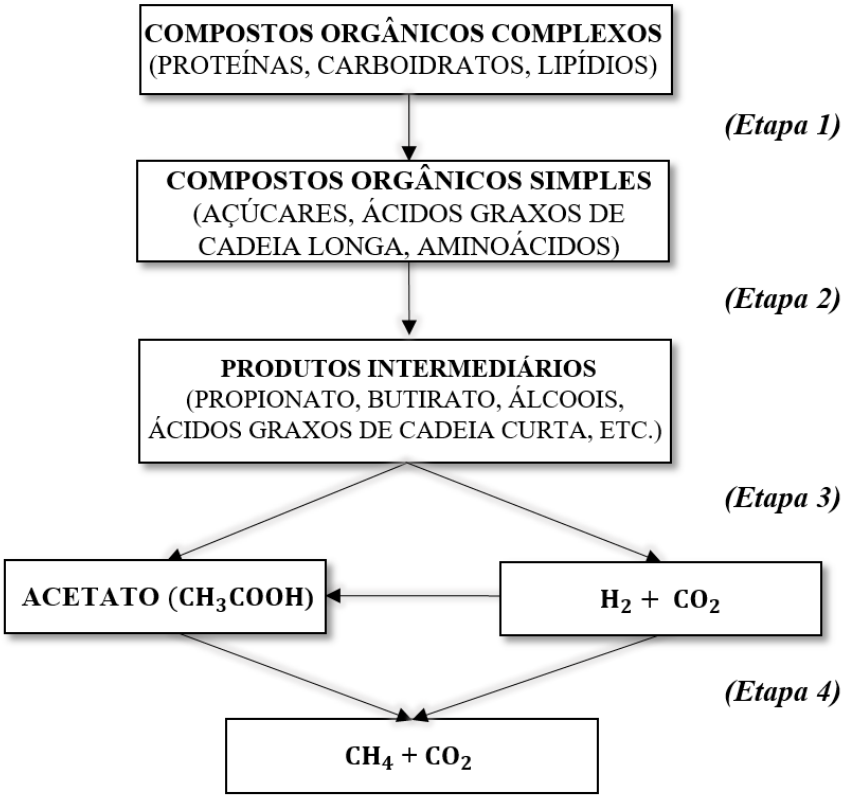
A digestão anaeróbia é um processo biológico em que um consórcio microbiano coopera a fim de promover a degradação, na ausência de oxigênio molecular, de compostos orgânicos complexos (carboidratos, proteínas e lipídios) em produtos mais simples, como metano (CH_4) e gás carbônico (CO_2), além de menores frações de hidrogênio (H_2), nitrogênio (N_2) e sulfeto de hidrogênio (H_2S). Os microrganismos que realizam a digestão são altamente especializados e atuam em reações bioquímicas intermediárias e bastante específicas.

Quatro etapas ocorrem sinergicamente no processo de digestão anaeróbia (Figura 3.3): a primeira é a hidrólise, no qual a matéria orgânica particulada é convertida por bactérias acidogênicas fermentativas em compostos solúveis e de menor peso molecular. Na segunda etapa, acidogênese, os compostos gerados na hidrólise são absorvidos nas células dessas mesmas bactérias, que promovem a sua transformação em produtos intermediários, que são os ácidos de cadeia longa (propiônico, butírico e acético), álcoois (etanol), dióxido de carbono e hidrogênio, além de produzirem novas células bacterianas. A conversão para ácido acético ocorre preferencialmente, pois fornece maior quantidade de energia, além de prover substrato ao grupo posterior (arqueias metanogênicas acetoclásticas) necessário à produção de metano. As outras reações (que produzem ácido butírico e propiônico) ocorrem devido à acumulação de hidrogênio, portanto as bactérias consomem o hidrogênio de sobrecarga. (MOSEY, 1983; CHERNICHARO, 1997). Tanto a hidrólise como a acidogênese são realizadas pelas bactérias hidrolíticas e fermentativas (acidogênicas), com consumo ou produção de hidrogênio.

Na acetogênese (etapa 3), as bactérias acetogênicas transformam os produtos da acidogênese em acetato, hidrogênio e dióxido de carbono, porém o hidrogênio pode ser também convertido a acetato pelas bactérias consumidoras de hidrogênio em um processo denominado homoacetogênese (CAMPOS; PEREIRA, 1999; SÁ et al., 2013). Nesse processo, as bactérias homoacetogênicas são bactérias acetogênicas que alteram seu metabolismo sob condições de estresse ou após esgotamento do substrato orgânico reduzido, passando a consumir hidrogênio e gás carbônico. Assim, possuem, tal como as acetogênicas, grande habilidade de tolerar condições ambientais diversas, mas desenvolvem-se mais rapidamente e não dependem da atividade de metanogênicas, pois não são inibidas por altas pressões parciais de hidrogênio

(SAADY, 2013). Na quarta etapa (metanogênese), o ácido acético e o hidrogênio são convertidos em metano por arqueias metanogênicas através de duas vias: hidrogenotrófica (aproximadamente 30% da produção) e/ou acetoclástica (aproximadamente 70% da produção) (CAMPOS; PEREIRA, 1999).

Figura 3.3 – Esquema simplificado da digestão anaeróbia e produtos gerados.



Fonte: Adaptado de Foresti et al. (1999).

3.3.2. Hidrogênio

O hidrogênio é um biocombustível que desperta grande interesse atualmente, pois possui vantagens em relação aos biocombustíveis (bioetanol, biodiesel e metano) e combustíveis fósseis (gasolina, óleo diesel, etc.) comercializados. É uma fonte de energia mais limpa, que somente libera água e, na presença de ar atmosférico, óxidos de nitrogênio durante a combustão, sendo mais vantajoso em termos de redução de GEE e chuva ácida. Além disso, possui boa conversão de energia por unidade de massa quando comparado a outros combustíveis (286 $kJ.mol^{-1}$). É um *commodity* industrial importante, amplamente utilizado em processos para síntese de amônia, álcoois e aldeídos (FANG; LIU, 2002; KAPDAN; KARGI,

2006; KIM & KIM, 2011; PATTRA et al., 2011; SINHA; PANDEY, 2011; WANG et al., 2013a; SARMA, 2015). Por esses motivos, o hidrogênio é aceito como ambientalmente adequado, fonte de energia renovável, podendo ser usado para combustão direta em motores de combustão interna, combustível em uma célula de hidrogênio e até para uso doméstico (DAS; VEZIROGLU, KOTAY; DAS, 2008; HALLENBECK; GOSH, 2009; ACAR; DINCER, 2014).

Apesar das vantagens, o hidrogênio não é encontrado na natureza, e necessita de métodos de produção, muitas vezes bastante caros (KAPDAN, 2006). Há muitos processos para a sua produção a partir de fontes convencionais e alternativas, como gás natural, nuclear, biomassa, energia solar e eólica. Os processos podem ser, de modo geral, classificados em dois: físico-químicos (por meio da eletrólise, gaseificação de carvão e reforma à vapor de hidrocarbonetos, normalmente gás natural) e biológicos (biofotólise da água com cianobactérias e algas, fotofermentação por bactérias fotossintéticas, produção anaeróbia (fermentação escura) a partir de resíduos orgânicos ou culturas energéticas e sistemas híbridos (usando bactérias fotossintéticas e fermentativas)) (WANG et al., 2013a; VIJAYARAGHAVAN, 2005).

Segundo Hallenbeck (2009), a eletrólise, apesar de ser produzida por tecnologias renováveis, possui pelo menos dois inconvenientes: boa parte da energia capturada é perdida na eletrólise, sendo que as tecnologias atuais possuem no máximo 65% de eficiência; há um gasto muito alto de energia elétrica, a qual deve ser de boa qualidade, para produzir hidrogênio de qualidade questionável. Já a reforma à vapor de hidrocarbonetos e gaseificação do carvão, de acordo com Kim e Kim (2011), são responsáveis por 90% do hidrogênio produzido, porém trata-se de processos com origem fóssil e pressão e temperatura altas.

Considerando os processos biológicos, apesar da produção de hidrogênio por microrganismos fotossintéticos ser extensivamente estudada, as evoluções alcançadas em processos fermentativos são mais vantajosas do que as do processo fotoquímico; isso se deve à independência da luz solar, além da possibilidade de utilização como substrato de águas residuárias muitas vezes de composição complexa e alta resistência à degradação. Através desse processo, a fermentação de águas residuárias para produção de hidrogênio, com posterior tratamento, pode atender simultaneamente aos propósitos de geração de energia limpa e disposição ambientalmente adequada de águas residuárias (VIJAYARAGHAVAN et al., 2005; MOHAN; BABU; SARMA, 2007; WANG et al., 2013b).

3.3.3. Produção biológica de hidrogênio por fermentação escura

A digestão anaeróbia, constituída por uma série de reações bioquímicas complexas efetuadas por microrganismos bastante especializados e que atuam em relação sintrófica, normalmente é empregada com objetivo de tratar o efluente e produzir gás metano. Quando o interesse se concentra no biocombustível hidrogênio, uma vez que a sua produção ocorre em fase intermediária da digestão anaeróbia e tem-se o posterior consumo de hidrogênio e produção de metano, o processo deve ser interrompido antes da metanogênese. Esse processo é denominado fermentação escura e possui as vantagens de baixo custo de produção, operação simples, baixo consumo de energia, utilização de diversos substratos orgânicos, remoção parcial da carga poluente, além de possibilitar a produção de solventes orgânicos e commodities químicos concomitante ao hidrogênio. Além disso, os biorreatores requeridos para as fermentações escuras são simples e de reduzido custo de produção devido à pouca necessidade de manutenção e menor área requerida de operação (HAWKES et al., 2007; MATHEWS; WANG, 2009; WANG; WAN, 2009; BASTIDAS-OYANEDEL et al., 2012; FUESS et al., 2016).

No entanto, em condições mais apropriadas, apenas 30-40% da energia química do substrato é convertido em hidrogênio, sendo o restante transformado em outros metabólitos, requerendo processos adicionais de manejo para maior recuperação energética. Por isso, aprimorar as condições operacionais pode resultar em maior produção volumétrica e rendimento de hidrogênio (MOHAN; BABU; SARMA, 2007; KHOTARI et al., 2012; VENKATESWAR et al., 2014; SARMA et al., 2015).

Na última década foram desenvolvidos diversos trabalhos avaliando a produção fermentativa de hidrogênio a partir de vários substratos, como a glicose (BARROS; SILVA, 2011; AMORIM; SADER; SILVA, 2012;), sacarose (GUO et al., 2010; MOTA et al., 2018), amido (CHEN et al., 2009; CAKIR et al., 2010; WANG et al., 2016; VI et al., 2017), resíduo de destilaria de etanol a partir de mandioca (INTANOO et al., 2012; WANG et al., 2013a), resíduos sólidos (RAMOS et al., 2012; NOBLECOURT et al., 2018), águas residuárias de soro de queijo (KARGI et al., 2012; RAMOS, 2016; OTTAVIANO et al., 2017), melaço de açúcar (REN et al., 2010; WANG et al., 2013b), caldo-de-cana (PATTRA et al., 2011). A utilização de diferentes substratos e configurações torna-se essencial ao melhor entendimento do processo fermentativo e à obtenção de maior rendimento e produção volumétrica de hidrogênio.

3.3.3.1. Rotas Fermentativas para produção de hidrogênio e metabólitos solúveis

Embora a produção de hidrogênio pela fermentação escura seja promissora, muitos estudos identificaram obstáculos como o consumo de hidrogênio por homoacetogênicas e baixas produções de hidrogênio devido a rotas metabólicas ineficientes que limitam a viabilidade em macroescala da produção desse gás (MATHEWS & WANG, 2009).

Por estequiometria, 1 mol de glicose completamente oxidada pode gerar 12 mol de hidrogênio. No entanto, o rendimento máximo na fermentação escura é 4 mol H_2 mol^{-1} glicose na produção de HAc, ou seja, apenas 33% do valor estequimétrico máximo. Isso se deve ao fato do hidrogênio ser produzido durante a conversão de carbono em vários álcoois e ácidos orgânicos. (LEVIN et al., 2004). O acúmulo de álcoois e ácidos além de determinado nível inibe o crescimento de células, fazendo com que a produção de H_2 decresça. Além disso, mesmo que 4 mol H_2 mol^{-1} glicose sejam produzidos, as reações de consumo de hidrogênio determinarão o rendimento final de hidrogênio. (OH et al., 2011; SAADY, 2013).

No processo da fermentação escura, inicialmente as moléculas de glicose são degradadas a piruvato, H^+ e nicotinamida adenina dinucleotídio (NADH) na etapa denominada glicólise. O piruvato, principal produto intermediário do processo de fermentação escura, é oxidado em Acetil-CoA por duas vias: a rota do piruvato:formato liase (PFL) e da ferredoxina oxiredutase (PFOR), dependendo da cultura bacteriana empregada. Nas duas rotas, o Acetil-CoA atua na formação de produtos finais, como acetato e etanol.

A primeira, que normalmente ocorre em *Scherichia coli* e *Enterobacteriaceae*, utiliza a rota metabólica da enzima piruvato:formato liase (PFL), em que a degradação do piruvato leva à geração de Acetil-CoA e formato (Equação 3.1). Em condições ácidas, a enzima formato:hidrogênio liase (FHL) é ativada e o ácido fórmico é convertido em hidrogênio para manter o pH da fermentação e diminuir a concentração de formato na célula (Equação 3.2) (MATHEWS; WANG, 2009; BUNHDOO; MOHEE, 2016).

$$\text{Piruvato} + \text{CoA} \rightarrow \text{Acetil-CoA} + \text{Formato} \qquad (3.1)$$

$$\text{Formato } (HCOO^-) + H^+ \rightarrow H_2 + CO_2 \qquad (3.2)$$

A segunda forma de produção de hidrogênio é típica de espécies *Clostridium* e envolve as enzimas piruvato: ferredoxina oxiredutase (PFOR) e Fd-dependente hidrogenase (HydA). PFOR catalisa a oxidação do piruvato para formar Acetil-CoA e CO_2, sendo os elétrons dessa reação transferidos primeiro para um aceptor de elétrons de grande potencial negativo (Fd_{ox} = E'_o -420 mV). Os elétrons em Fd_{rd} são, então, transferidos para prótons, catalizados pela enzima hidrogenase (HydA). Por fim, os prótons são reduzidos para formar hidrogênio através da mesma enzima. O processo todo resulta em produção máxima de 2 mols de hidrogênio por mol de glicose metabolizada (OH et al.; 2011; SINHA; PANDEY, 2011; BUNDHOO; MOHEE, 2016).

$$\text{Piruvato} + \text{CoA} + 2\ Fd_{ox} \rightarrow \text{Acetil-CoA} + CO_2 + 2\ Fd_{rd} \tag{3.3}$$

$$2\ Fd_{rd} + 2\ H^+ \rightarrow 2\ Fd_{ox} + H_2 \tag{3.4}$$

Há ainda a possibilidade da reoxidação do NADH residual produzido na glicólise (Equação 3.5) para produzir hidrogênio e é típica de algumas bactérias termofílicas e espécies *Clostridium*. Essa reação é catalizada por duas enzimas principais: NAD(P)H: ferredoxina oxidoredutase (NFOR) e HydA. A Fd_{ox} é reduzida por NFOR, formada no metabolismo do carbono (Equação 3.6). Os elétrons em Fd_{rd} são transferidos para prótons para formar hidrogênio pela HydA (Equação 3.7). Em altas concentrações de hidrogênio e consequente elevada pressão parcial (60-100 Pa) a atividade das enzimas NFOR é inibida; logo, para que haja contínua atividade das enzimas NFOR, é necessário que o gás hidrogênio seja continuamente retirado do meio (SINHA, PANDEY, 2011).

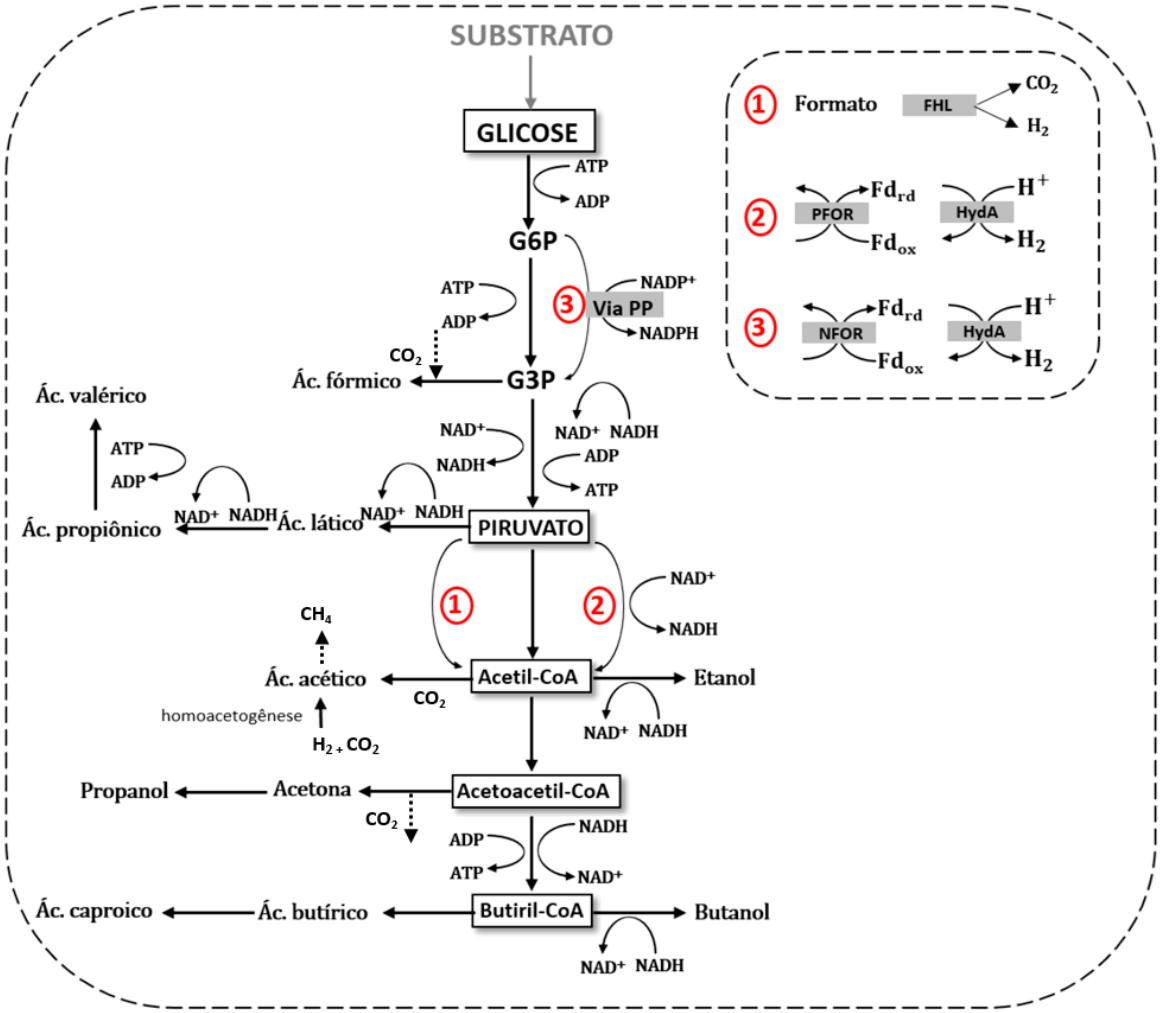
$$\text{Glicose} + 2\ NAD^+ \rightarrow 2\ \text{Piruvato} + 2\ \text{NADH} \tag{3.5}$$

$$2\ \text{NADH} + 4\ Fd_{ox} \rightarrow 2\ NAD^+ + 4\ Fd_{rd} \tag{3.6}$$

$$4\ Fd_{rd} + 4\ H^+ \rightarrow 4\ Fd_{ox} + 2\ H_2 \tag{3.7}$$

A representação esquemática dos mecanismos que desencadeiam a formação de hidrogênio no processo fermentativo, bem como a produção de metabólitos é apresentada na Figura 3.4.

Figura 3.4 - Esquema geral da diversidade metabólica presente na fermentação, destacando a geração de ácidos e utilização de cultura mista.



Fonte: Adaptado de Oh et al. (2011), Saady (2013).

A máxima produção teórica de hidrogênio depende dos produtos formados (metabólitos como ácidos e álcoois). A maior formação teórica de hidrogênio ocorre quando os microrganismos consumidores de hidrogênio são eliminados e o Acetil-CoA é metabolizado somente em acetato (Equação 3.8) ou acetona (Equação 3.9) como produto final da fermentação, gerando 4 mol H_2 mol^{-1} hexose. Nessa reação são gerados equivalentes redutores e o microrganismo sintetiza ATP. No entanto, em condições reais de operação do reator, a maior parte do NADH é oxidado em reações que geram outros produtos, como o butirato, para evitar o acúmulo de equivalentes redutores inibitórios. Quando o butirato (Equação 3.10) é o produto final da fermentação, a produção máxima de hidrogênio será de 2 mol H_2 mol^{-1} hexose. A menor

produção de hidrogênio com o ácido butírico é associada à formação de propionato e produtos reduzidos, como álcoois e ácido lático. Além disso, parte do carboidrato é convertido à formação de células bacterianas, reduzindo a quantidade de hidrogênio formada (HAWKES et al., 2007; MATHEWS; WANG, 2009; SINHA; PANDEY, 2011; SAADY, 2013).

$$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COOH + 2CO_2 + 4H_2 \quad (3.8)$$

$$C_6H_{12}O_6 + H_2O \rightarrow CH_3COCH_3 + 3CO_2 + 4H_2 \quad (3.9)$$

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CH_2CH_2COOH + 2CO_2 + 2H_2 \quad (3.10)$$

Quando os produtos finais são álcoois, menor produção de hidrogênio é obtida, pois esses compostos contém átomos adicionais de hidrogênio que não podem ser convertidos em hidrogênio gasoso. No processo de produção de etanol há consumo de NADH; no entanto, segundo Ren et al. (2006), uma fermentação que produz acetato e etanol a partir de carboidrato na mesma proporção (aproximadamente 1:1) é favorável à produção de hidrogênio (Equação 3.11).

$$C_6H_{12}O_6 + H_2O \rightarrow CH_3COOH + CH_3CH_2OH + 2CO_2 + 2H_2 \quad (3.11)$$

Outra correlação obtida para o etanol é a fermentação desse composto presente no substrato em ácidos propiônico e acético como rota alternativa para produção de energia, como mostra a equação 3.12 (FUESS et al., 2018).

$$3CH_3CH_2OH + CO_2 \rightarrow 2CH_3CH_2COOH + CH_3COOH + H_2O \quad (3.12)$$

Um dos maiores desafios da fermentação escura é o acúmulo de produtos finais da fermentação que inibem a produção de hidrogênio. Embora níveis baixos de produtos finais sejam favoráveis, altas concentrações podem inibir o processo, resultando em valores reduzidos de hidrogênio (BUNDHOO; MOHEE, 2016). No entanto, existem outros supressores no processo de fermentação escura que afetam negativamente a produção de hidrogênio. O

hidrogênio pode ser consumido de duas formas: por equivalentes reduzidos ($NADH_2$, potencial H_2) ou como hidrogênio molecular. A formação de ácidos orgânicos voláteis, por exemplo, consome $NADH_2$ como doador de elétrons (LEE, SALERNO; RITTMANN, 2008; SAADY, 2013).

A formação de ácido propiônico (Equação 3.13) promove o consumo direto de hidrogênio ou utiliza o NADH, sendo inibitório à formação de hidrogênio. Outra forma de inibição ocorre pela supressão do processo de fermentação escura devido à grande produção de propionato, o qual é conhecido por possuir efeito inibitório na produção de hidrogênio. Alguns produtores do gênero *Clostridium (Clostridium propionicum* e *Clostridium homopropionicum*) também produzem propionato a partir da degradação do lactato em reação secundária (Equação 3.14), consumindo NADH no processo e impactando negativamente a produção de hidrogênio (ZHANG et al., 2007; AGLER et al., 2011; BUNDHOO; MOHEE, 2016). Ambas as reações são termodinamicamente favoráveis.

$$C_6H_{12}O_6 + 2H_2 \rightarrow 2CH_3CH_2COOH + 2H_2O \quad (3.13)$$

$$CH_3CHOHCOOH + H_2 \rightarrow CH_3CH_2COOH + H_2O \quad (3.14)$$

O ácido lático tem sua formação direta do piruvato e também é reportado na literatura como inibitório, competindo pelo substrato ou liberando toxinas que causam danos às bactérias produtoras de hidrogênio, resultando em inibição ou supressão da produção de hidrogênio. Sua formação se dá de três formas, como único produto (equação 3.15), juntamente à formação de etanol (equação 3.16) e concomitante à formação de ácido acético (Equação 3.17) (FUESS et al., 2016).

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CHOHCOOH \quad (3.15)$$

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CHOHCOOH + CH_3CH_2OH + CO_2 \quad (3.16)$$

$$2C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CHOHCOOH + 3CH_3COOH + CO_2 \quad (3.17)$$

Apesar de na maior parte da literatura o ácido lático ser prejudicial à produção de hidrogênio, esse também pode ser fermentado a ácido propiônico e acético (Equação 3.18).

Outra alternativa é a conversão de ácidos lático e acético em gás carbônico e hidrogênio (Equação 3.19). Segundo Fuess et al. (2018), a fermentação do ácido lático compreende uma rota alternativa e termodinamicamente favorável ($\Delta G<0$) utilizada pelas bactérias para obter energia em condições de pouca disponibilidade de carboidrato. Essas alternativas substituem a conversão direta dos carboidratos, provendo maior energia para o metabolismo.

$$3CH_3CHOHCOOH \rightarrow 2CH_3CH_2COOH + CH_3COOH + CO_2 + H_2O \quad (3.18)$$

$$CH_3COOH + 2CH_3CH_2COOH \rightarrow H_2 + 3/2CH_3(CH_2)_2COOH + CO_2 + H_2O \quad (3.19)$$

Outros processos inibitórios à fermentação escura são a formação de gás metano (caso não haja inibição eficiente da metanogênese) e de acetato, pela homoacetogênese (Equação 3.20) promovendo o consumo de hidrogênio (CONRAD; WETTER, 1990). A formação de ácidos valérico a partir do propionato (Equação 3.21) e caproico a partir do butirato (Equação 3.22) também consome hidrogênio e são favoráveis termodinamicamente. Hidrogênio pode também ser consumido na conversão de etanol para ácido acético, termodinamicamente favorável em altas pressões parciais de hidrogênio (SAADY, 2013).

$$2CO_2 + 4H_2 \rightarrow CH_3COOH + 2H_2O \quad (3.20)$$

$$CH_3CH_2COO^- + 2CO_2 + 6H_2 \rightarrow CH_3(CH_2)_3COO^- + 4H_2O \quad (3.21)$$

$$CH3(CH_2)_2COO^- + 2CO_2 + 6H_2 \rightarrow CH_3(CH_2)_4COO^- + 4H_2O \quad (3.22)$$

3.3.4. Efeito de parâmetros operacionais na produção fermentativa de hidrogênio

A produção fermentativa de hidrogênio é um processo bastante complexo e influenciado por vários fatores. A literatura relata as perdas de performance em sistemas acidogênicos associadas usualmente a condições operacionais inadequadas, como o acúmulo excessivo de biomassa nos reatores, condições inadequadas de pH, além da aplicação de sub ou sobrecargas

orgânicas. Ao evitar essas condições, é possível obter produção contínua de hidrogênio aplicando estratégias operacionais adequadas aos reatores (FUESS et al., 2016).

Segundo Lazaro et al. (2014), não existe consenso sobre as condições experimentais ótimas na produção de hidrogênio, em termos de temperatura e concentração de substrato; porém o inóculo inicial e a natureza do substrato promovem a seleção de organismos com diferentes capacidades de produzir hidrogênio.

3.3.4.1. Inóculo

O potencial de vários inóculos é explorado para produzir hidrogênio utilizando diferentes substratos, sendo que os valores teóricos de produção a partir da fermentação escura dependem, em boa parte, dos organismos que são usados (MATHEWS; WANG, 2009; OH et al., 2011). Os microrganismos capazes de produzir hidrogênio existem em vários habitats naturais, como no solo, águas residuárias, lodo, adubos, etc., sendo esses materiais passíveis de serem usados como fonte potencial de inóculo para a produção fermentativa de hidrogênio (SINHA; PANDLEY, 2011).

Em muitos estudos são utilizadas culturas puras de microrganismos; no entanto, o uso de cultura mista em larga escala para a produção de hidrogênio é mais prático e economicamente viável do que cultura pura, além das culturas mistas serem capazes de tolerar a complexidade e variabilidade do substrato devido à diversidade metabólica dos membros da comunidade (AGLER et al., 2011). Por outro lado, há a desvantagem da coexistência de microrganismos produtores e consumidores de hidrogênio podendo, dessa forma, reduzir a produção de hidrogênio (BUNDHOO; MOHEE, 2016).

A fim de incrementar a produção de hidrogênio, comumente utiliza-se metodologias de pré-tratamento do inóculo. O pré-tratamento deve ser capaz de selecionar os microrganismos produtores de hidrogênio e inibir a atividade dos consumidores, já que cada bactéria reage de um modo diferente ao estresse aplicado. Segundo Wong, Wu e Juan (2014), normalmente inóculos que não passam por pré-tratamento produzem menos hidrogênio.

Quando as culturas mistas são submetidas a pré-tratamento sob condições de estresse, as bactérias produtoras de hidrogênio possuem maiores chances de sobreviver do que as não produtoras. Assim, para otimizar a supressão dos microrganismos consumidores de hidrogênio, é importante que seja aplicada uma metologia eficaz de pré-tratamento (WANG; WAN, 2008b).

São vários os métodos de pré-tratamento do inóculo, como choque térmico, aeração ácido-base, congelamento e descongelamento, clorofórmio, dentre outros, sendo que ainda existem controvérsias a respeito de qual seria o mais eficaz na inibição dos microrganismos consumidores de hidrogênio e preservação das bactérias produtoras de hidrogênio (CHEONG; HANSEN, 2006).

Os pré-tratamentos baseados em aquecimento e/ou choque térmico tem sido largamente utilizados pois são considerados simples, proporcionam bons resultados e têm grande potencial para aplicação comercial. No entanto, ainda é um desafio obter a melhor combinação entre temperatura e duração do aquecimento, devido à variedade de microrganismos presentes no lodo. Dependendo da fonte de inóculo, bactérias homoacetogênicas podem sobreviver a calor intensivo, enquanto algumas produtoras de hidrogênio podem ser destruídas (WONG, WU, JUAN, 2014).

Estudos realizados em batelada por Wang e Wan (2008b) compararam diferentes métodos de pré-tratamento, sendo ácido, base, choque térmico, aeração e clorofórmio na produção de hidrogênio a partir de glicose em testes em batelada a 35℃ e pH efluente entre 3,4 e 4,1. Os autores obtiveram a maior produção volumétrica (0,12 L h^{-1}) e rendimento de hidrogênio (0,22 L g^{-1} hexose), eficiência de conversão do substrato (97,2%) e concentração de biomassa (2739 mg L^{-1}) com o pré-tratamento de choque térmico.

Kim et al. (2006b) demonstraram a eficácia do pré-tratamento térmico em lodo proveniente de digestor anaeróbio de uma ETE, aquecendo-o por 10 minutos a 90℃ a fim de inibir a atividade de consumidores de hidrogênio e selecionar as bactérias formadoras de esporos, como *Clostridium spp.* A partir do lodo pré-tratado, os autores operaram reator CSTR a 35℃, alterando a concentração afluente de sacarose entre 10 e 60 g DQO L^{-1}. Os valores máximos obtidos de hidrogênio foram 1,22 mol H_2 mol^{-1} hexose e 7,65 L H_2 d^{-1} L^{-1} com 30 g DQO L^{-1}. No entanto, algumas bactérias produtoras de acetato e lactato ainda resistiram ao pré-tratamento, sendo frisado pelos autores que as condições operacionais, como concentração de substrato, são necessárias para suprimir a atividade dessas bactérias.

3.3.4.2. Potencial Hidrogeniônico (pH)

O pH é um fator importante que influencia as atividades das bactérias produtoras de hidrogênio, pois afeta as atividades das hidrogenases, a estrutura da comunidade microbiana, bem como as rotas metabólicas. A maioria dos estudos tem como foco a influência do pH inicial

na produção de hidrogênio, sem controle do pH efluente. No entanto, sistemas que sofrem variação do pH são vulneráveis a perdas de performance devido a fatores que dependem diretamente desse parâmetro, como a atividade de hidrogenases, rotas metabólicas e fenômenos de floculação e aderência de células (FUESS et al, 2016).

A literatura relata que um pH neutro pode favorecer o crescimento metanogênico e a formação de propionato, consumindo hidrogênio. Por outro lado, pHs inferiores a 4 ocasionam modificações nas rotas metabólicas, produzindo compostos mais reduzidos, como acetona, álcoois e ácido lático, que podem penetrar na membrana celular e interferir nas atividades metabólicas. O pH ideal não é consensual, ficando estabelecido, em geral, entre 4,5 e 6,5 para a produção de hidrogênio. Nessa mesma faixa pode haver, no entanto, a presença de microrganismos consumidores de hidrogênio, como homoacetogênicas e metanogênicas hidrogenotróficas (ELBESHBISHY et al, 2017; MOTA et al., 2018).

Dareioti, Vavouraki e Kornaros (2014) estudaram o impacto do pH na produção de hidrogênio e produtos finais a partir de uma mistura de água residuária de moinho de oliva, soro de queijo e esterco líquido de vaca (relação 55:40:5 v/v/v) realizando testes em batelada em condição mesofílica (37℃) variando o pH entre 4,5 e 7,5. A maior produção de hidrogênio foi observada em pH 6,0 (HY = 0,64 mol H_2 mol^{-1} glicose), resultado que os autores explicaram pela produção de ácido butírico e degradação de ácido lático. Em pH 6,5 ocorreu a maior produção de ácidos orgânicos voláteis (13,42 g L^{-1}), porém a alta concentração foi atribuída ao ácido propiônico, enquanto as concentrações de ácido acético e butírico mantiveram-se praticamente as mesmas (1,1 e 8,6 g L^{-1}, respectivamente).

Mota et al. (2018) operaram em duas fases da pesquisa diferentes reatores alimentados com sacarose a 30℃, sem controle do pH e sem tratamento do lodo. Na primeira fase, um reator de leito fixo estruturado (FB), um UASB granular (UG) e um UASB floculento (UF-1), os quais foram submetidos ao TDH de 3,3 h e TCO de 33,1 g DQO L^{-1} d^{-1}, produzindo, respectivamente, PVH igual a 2,28 ± 1,66, 1,08 ± 0,89 e 1,30 ± 0,77 L H_2 L^{-1} d^{-1} e HY de 0,75 ± 0,4, 0,4 ± 0,3 e 0,6 ± 0,35 mol H_2 mol^{-1} hexose em pH efluente médio igual a 2,8. Apesar de não apresentar os maiores resultados de PVH e HY, o UF-1 não apresentou tendência de declínio como ocorreu no FB. Na segunda fase da pesquisa, visando produção contínua de hidrogênio, um UASB floculento (UF-2) foi aplicado o TDH de 4,6 h, resultando em carga orgânica de 25 g DQO L^{-1} d^{-1}. Nessas condições, o PVH e o HY passaram a 4,32 ± 1,06 L H_2 L^{-1} d^{-1} e 0,85 ± 0,17 mol H_2 mol^{-1} hexose, respectivamente. Além disso, houve menor produção de lactato e mais acetato, e alta concentração de etanol. Assim, o reator apresentou produção estável em pH médio igual a

2,7, com 70% da microbiota composta por *Ethanoligenens* e *Clostridium*. Esses resultados, segundo os autores, contradizem a literatura atual, que reporta alta inibição de produção de hidrogênio em pH menor que 4.

3.3.4.3. Temperatura

A temperatura é um dos parâmetros operacionais mais importantes na produção de hidrogênio, pois afeta a atividade das bactérias envolvidas no processo, influenciando a atividade de enzimas essenciais (hidrogenases) e, consequentemente, altera a comunidade microbiana e as rotas metabólicas que influenciarão a produção volumétrica e rendimento de hidrogênio (WANG; WAN, 2008; ELBESHBISHY, 2017).

As reações fermentativas podem ocorrer em faixas mesofílica (25-40℃), termofílica (40-65℃) e, termofílica extrema (65-80℃) ou hipertermofílica (>80℃). Na maior parte dos estudos a produção de hidrogênio é favorecida em faixa mesofílica. No entanto, temperaturas extremamente altas podem inibir produtores de hidrogênio através da inativação de enzimas essenciais para o crescimento celular, bem como desnaturação de proteínas celulares (SINHA; PANDEY, 2011; ELBESHBISHY, 2017)

Como a temperatura pode definir os subprodutos gerados, é importante a sua otimização a fim de direcionar as vias metabólicas para a produção de acetato e butirato, evitando a produção de metabólitos que consumam hidrogênio na sua produção. Embora haja vários estudos apontando os efeitos da temperatura na produção fermentativa de hidrogênio por culturas mistas, os resultados diferem consideravelmente em termos da temperatura ótima para produção fermentativa de hidrogênio (WANG; WAN, 2008).

A temperatura termofílica pode ser mais apropriada em termos de eliminação de patógenos ou acoplada a processos associados com processos que geram calor excedente. Além disso, o hidrogênio é menos solúvel em elevadas temperaturas, desprendendo-se com maior facilidade da massa líquida. No entanto, devido à energia despendida, a operação termofílica torna-se menos provável de ser técnica e economicamente favorecida (HAWKES et al., 2007). Além disso, a maior parte dos estudos existentes foram efetuados em temperatura mesofílica devido à maior parte das bactérias produtoras de hidrogênio estarem presentes em lodo mesofílico, como *Clostridium* spp., *Enterobacter* spp. e *Bacillus* spp. Essas espécies estão presentes em uma grande faixa de temperatura, porém são fisiologicamente ativas para produzir hidrogênio apenas em um intervalo estrito de temperatura.

Alguns estudos desenvolvidos especificamente avaliando o efeito da temperatura na produção de hidrogênio a partir de diferentes substratos e inóculos constataram melhores resultados em faixa mesofílica, com produção de metabólitos favoráveis ao processo. Lee, Lin e Chang (2006) estudaram os efeitos da temperatura na produção de hidrogênio usando sacarose como substrato e cultura mista e concluíram que, em termos gerais, a produção volumétrica (PVH) e o rendimento (HY) de hidrogênio aumentam na faixa dos 30 a 40℃, enquanto tendem a ser reduzidos com o aumento da temperatura de 40 a 45℃. A temperatura de 40℃ mostrou-se mais eficiente na produção de hidrogênio, especialmente no TDH de 0,5 h, sendo o PVH e HY iguais a 7,66 L h^{-1} L^{-1} e 3,88 mol H_2 mol^{-1} sacarose, respectivamente. A biomassa apresentou tendência a decrescer conforme a temperatura foi aumentada, o que sugere que a formação granular de lodo pode ser inibida em altas temperaturas. No entanto, o aumento de temperatura proporcionou melhor PVH, significando que a atividade celular pode ser aumentada à medida que a temperatura aumentou. Já o HY e o percentual de hidrogênio não variaram consideravelmente, independente das mudanças de temperatura e TDH. Os ácidos orgânicos principais produzidos foram ácido butírico (46 ±3 %) e acético (28 ± 2%).

Wang e Wan (2008) investigaram por meio de testes em batelada o efeito da temperatura variando de 20 a 55℃ na produção fermentativa de hidrogênio por cultura mista utilizando glicose na concentração de 1 g L^{-1}. O inóculo utilizado foi lodo coletado de um digestor anaeróbio primário de uma estação de tratamento de esgoto doméstico em Pequim, China, e passou por pré-tratamento térmico antes de sua utilização. Durante os testes foi observado que o HY aumentou até os 40℃, chegando ao rendimento máximo nessa temperatura de 275 mL H_2 g^{-1} glicose. A principal rota de produção de hidrogênio foi aceto-alcoólica, sendo que o ácido acético e etanol corresponderam a 86% da concentração de metabólitos. Os resultados mostraram que o potencial de produção de hidrogênio aumentou com o aumento da temperatura entre 20 e 40℃, porém decresceu entre 40 e 55℃. Isso indicou a mudança de rota metabólica induzida pelas modificações na comunidade microbiana a cada temperatura testada.

Shi et al (2013), utilizando três reatores de batelada sequencial operados nas temperaturas de 35℃, 50℃ e 65℃, avaliaram o efeito da temperatura na produção de hidrogênio com a macroalga *Laminaria japonica* como fonte de carbono. O inóculo foi lodo retirado de um digestor anaeróbio mesofílico que passou por pré-tratamento térmico. O rendimento máximo de hidrogênio (61,3 mL H_2 g^{-1} ST) foi obtido em faixa mesofílica (35℃), com TCO de 3,4 g DQO L^{-1} d^{-1}. Acetato e butirato foram os principais metabólitos. Nas temperaturas de 50 e 65℃ foram obtidos rendimentos de 49,7 e 48,1 mL H_2 g^{-1} ST,

respectivamente. Com a elevação de temperatura, a fração de acetato foi reduzida e a de butirato elevada, chegando a 93,1% em 65℃. Por meio de avaliação da comunidade microbiana, os autores observaram que, com o aumento da temperatura de 35 para 65℃, a diversidade da comunidade foi reduzida. Na faixa mesofílica as principais populações bacterianas identificadas foram *Clostridium sp*., *Ruminococcus sp*., *Eubacterim sp.* e *Bacteroides sp.* Ao avaliar o efeito da temperatura na hidrólise, observou-se maior atividade da enzima celulase no reator mesofílico, que obteve rendimento máximo.

Qiu et al. (2016) investigaram a fermentação escura para produção de hidrogênio a partir de xilose em condições mesofílica (35℃) e termofílica (55℃) em vários níveis iniciais de pH (5,0 a 10,0) e concentrações de substrato (2,5 a 12,5 g L^{-1}). O inóculo usado foi uma mistura proveniente de lodo de reator anaeróbio da planta de tratamento municipal de esgoto de Tianjin, China, e esterco de vaca digerido de uma fazenda local. Foi demonstrado que o rendimento máximo de hidrogênio (1,24 mol H_2 mol^{-1} xilose) foi obtido com uma concentração de substrato de 7,5 g L^{-1}, pH igual a 7,0 e temperatura de 35℃, sendo butirato, acetato e etanol os principais produtos. O aumento da concentração de substrato resultou em acúmulo de ácidos orgânicos voláteis, especialmente propionato, e diminuição no pH em condição mesofílica. No entanto, a 55℃ o rendimento de hidrogênio foi elevado juntamente ao aumento da concentração do substrato, com butirato e etanol como principais metabólitos. Embora rendimento menor tenha sido obtido na condição termofílica (1,14 mol H_2 mol^{-1} xilose), o sistema apresentou maior estabilidade, possibilitando o aumento da concentração de xilose até 12,5 g L^{-1} sem acúmulo de ácidos orgânicos voláteis. A comunidade microbiana em ambas as temperaturas foi dominada por *Clostridium*, apresentando menor diversidade na condição mesofílica.

3.3.4.4 Tempo de detenção hidráulica (TDH) e concentração de substrato

A concentração afluente de substrato e o TDH são importantes parâmetros na produção fermentativa de hidrogênio e metabólitos solúveis; no entanto, os efeitos da redução do TDH e aumento da concentração de substrato diferem com o sistema utilizado.

Em relação à concentração afluente de substrato, poucos estudos na literatura utilizaram águas residuárias reais. O limiar de inibição não é bem definido, devido a diferenças na configuração do reator, inóculos, dentre outros fatores. Uma concentração mínima de substrato é importante para ativar a germinação e prevenir a re-esporulação de bactérias esporulantes. O aumento da concentração de substrato, dentro de uma faixa apropriada, aumenta a produção de

hidrogênio na fermentação escura. Por isso, os estudos focados na bioprodução de hidrogênio em sistemas acidogênicos costumam basear-se na aplicação de altas taxas de carregamento orgânico (TCO) como estratégia para prevenção de perda de performance. Por outro lado, concentrações muito elevadas de substrato podem ser desfavoráveis à produção de hidrogênio, uma vez que a sobrecarga pode causar inibição da atividade dos microrganismos produtores de hidrogênio de várias maneiras, como a acumulação de ácidos orgânicos voláteis, pH intracelular muito baixo e elevada pressão parcial de hidrogênio. Logo, a otimização da concentração afluente torna-se importante para evitar a inibição por substrato (FUESS et al, 2016; ELBESHBISHY, 2017; OTTAVIANO et al., 2017).

Alguns estudos realizados avaliando a produção de hidrogênio em sistemas fermentativos basearam-se na variação da concentração de substrato e/ou no TDH. Ottaviano et al. (2017) operaram dois reatores anaeróbios de leito fluidificado (RALF1 e RALF2) em faixa termofílica (55℃) utilizando como substrato soro de queijo e inóculo de UASB termofílico utilizado para tratamento de vinhaça de cana-de-açúcar. No RALF1, foi mantida concentração fixa de 4,9 ± 0,2 g lactose L^{-1} e variado o TDH entre 8 e 0,5 h. Já no RALF2 foi mantido o TDH fixo de 6 h e variada a concentração afluente entre 2,8 ± 0,1 e 14,6 ± 0,3 g lactose L^{-1}. No RALF1 o maior PVH obtido foi 98,4 ± 0,48 L H_2 d^{-1} L^{-1} no TDH de 0,5 h e o máximo HY alcançado foi 3,67 ± 0,59 mol H_2 mol^{-1} lactose no TDH de 4 h. Já no RALF2 o PVH máximo foi 16,56 ± 0,96 L H_2 d^{-1} L^{-1} em concentração de 6,8 ± 0,3 g lactose L^{-1}. Nos dois reatores, os produtos metabólicos principais foram ácido acético e butírico, com abundância de bactérias do gênero *Thermoanaerobacterium* spp.

Pugazhendhi et al. (2017) utilizando reator de leito fixo (FBR) mesofílico (37℃) e inóculo de reator UASB para tratamento de águas residuárias de cervejaria, avaliaram o efeito do TDH entre 12 e 1,5 h com concentração fixa de 15 g L^{-1} glicose, sendo o pico de produção de hidrogênio alcançado em 1,5 h, com HY de 2,3 mol H_2 mol^{-1} hexose e PVH de 78 L H_2 d^{-1} L^{-1}. Os principais produtos metabólicos obtidos foram acetato e butirato, com predominância de *Clostridium butyricum* em todos os TDH testados.

3.3.5. Aplicações biotecnológicas de ácidos orgânicos voláteis de cadeia curta derivados de processo fermentativo

Atualmente, mais de 80 milhões de toneladas de ácidos aplicados na indústria e avaliados em torno de 2 trilhões de dólares são manufaturados por ano a partir de matéria-prima

derivada do petróleo (WANG et al., 2015). Do ponto de vista econômico, a produção desses químicos é atualmente mais atrativa, devido ao menor custo de produção. No entanto, com os problemas ambientais ocasionados a partir do uso desses petroquímicos não renováveis, a produção fermentativa de ácidos orgânicos voláteis têm atraído atenção da indústria e de pesquisadores (ABDEL-RAHMAN; TASHIRO; SONOMOTO, 2013). Esses metabólitos, produzidos a partir de resíduos no processo fermentativo, são substratos valiosos para uma variedade de aplicações como a produção de plásticos biodegradáveis, geração de energia e remoção biológica de nutrientes (HUANG et al., 2011; LIU et al., 2013; LEE et al., 2014).

Na tabela 3.2 estão dispostos alguns metabólitos considerados atualmente *commodities* químicos, passíveis de serem produzidos por meio de processo fermentativo e que são substratos para a produção de compostos mais complexos e de grande importância industrial. Maior detalhamento será dado nos subitens 3.3.5.1 a 3.3.5.4.

Tabela 3.2 – Produção mundial e algumas aplicações dos principais ácidos orgânicos voláteis de cadeia curta utilizados no setor industrial.

Ácido	**Mercado anual**	**Forma química**	**Utilização**
Acético	12,1 x 10^9 kg/ano (2014)	Acetato de vinil; éster; anidrido acético; vinagre; solvente; sais.	Polímeros (PVA); Tintas; revestimentos; intermediários têxteis; alimentos; polímeros (PET); corantes e pigmentos têxteis.
Butírico	1,2 x 10^8 kg/ano (2014)	Butirato de acetato de celulose; butirato de cálcio; ésteres.	Plásticos; processos de curtimento de couro; produção de medicamentos (sabor)
Propiônico	3,9 x 10^8 kg/ano (2013)	Sais; propionato de acetato de celulose; ésteres.	Antifungicidas na indústria alimentícia; produção de medicamentos (sabor).
Lático	7,1 x 108 kg/ano (2013)	Polímeros, oxi-químicos; ésteres; produtos especiais.	Polímeros biodegradáveis; propileno, glycol, acrilatos, óxido de propileno (polímeros, filmes plásticos; revestimentos); plastificantes, embalagens para processamento de alimentos; poli-L-lactatos (reguladores de crescimento vegetal)

Fonte: Adaptado de Kim et al. (2018).

3.3.5.1. Ácido Acético

Um importante ácido orgânico volátil de cadeia curta é o ácido acético, cuja demanda em 2014 foi de aproximadamente 12 milhões de toneladas. Apenas 10% dessa quantidade é produzida por *Acetobacter* em fermentação aeróbia do vinagre (WANG et al., 2015; KIM et al., 2018). Atualmente mais de 60% da produção mundial de ácido acético emprega métodos de carbonilação do metanol, seguido por oxidação de etileno ou acetaldeído, oxidação de nafta e fermentação de carboidratos (YONEDA et al., 2001). Esse ácido é utilizado principalmente como matéria-prima para síntese de monômero de acetato de vinila e anidrido acético, além de solvente para a produção de ácido tereftálico purificado, e seus principais usos na indústria são relacionados à produção de polímeros (PVA e PET), corantes e pigmentos têxteis, intermediários têxteis e na produção de alimentos (KIM et al., 2018).

Em relação à produção via fermentativa, alguns microrganismos homoacetogênicos, como *Clostridium formicoaceticum e Clostridium thermoaceticum* podem gerar ácido acético como único produto fermentativo, além de consumirem o gás carbônico e o hidrogênio disponíveis. Nesse sentido, a fermentação homoacetogênica é de grande interesse, visto que quase todo o carbono contido no substrato pode ser recuperado na produção de acetato, sem liberar gás carbônico ou outro bioproduto, o que pode reduzir as emissões de gases de efeito estufa, na medida em que esse processo utiliza o gás carbônico produzido, além de facilitar o processamento posterior para recuperação e purificação do produto (WANG et al., 2015).

3.3.5.2. Ácido Propiônico

O ácido propiônico é um importante precursor químico, cujo mercado em 2013 foi de 39 mil toneladas. Tem como aplicações o uso em alimentos humanos e para animais, produtos farmacêuticos, plásticos de acetato-propionato de celulose, perfumes, ésteres de alquil-propionato, aromas artificiais e herbicidas. Quase sua totalidade é produzida a partir de rotas petroquímicas; apenas a parte desse ácido utilizada na indústria alimentar é gerada por rota fermentativa e utilizado na indústria de laticínios para queijo suíço e produção de vitamina B12. Nesse caso, o propionato não é utilizado puro, mas sim em uma mistura com o ácido acético concomitantemente produzido. Já quando é utilizado como precursor ou intermediário químico, deve passar por processo de separação e purificação, sendo as tecnologias existentes ainda de custo elevado para serem viáveis em escala industrial.

Os microrganismos mais conhecidos na produção de ácido propiônico via fermentativa são do gênero *Propionibacterium* (*P. acidipropionici*, *P. freudenreichii*, *P. shermanii*), sendo essas anaeróbias ou anaeróbias facultativas (KIM et al., 2016).

3.3.5.3. Ácido Butírico

O ácido butírico é amplamente utilizado nas indústrias química, farmacêutica, suplemento alimentar animal, perfumes, com um mercado global em 2014 de aproximadamente 1,2 x 10^5 toneladas (WANG et al., 2016; KIM et al., 2018). Sua principal aplicação é como precursor químico na fabricação de plásticos de acetato butirato celulose, utilizados na produção de fibras têxteis, e há interesse na sua utilização como precursor na produção de biobutanol como combustível líquido avançado em fermentação por *Clostridia* solvetogênicas de acetona-butanol-etanol (ZHANG et al., 2009; WU et al., 2010; WANG et al., 2015; LUO et al., 2015; 2017).

O ácido butírico em geral pode ser produzido por fermentação a partir de espécies *Clostridium*, como C. *Tyrobutyricum*, *C. Butyricum*, *C. Populeti* e *C. Thermobutyricum*, além de cepas pertencentes a outros gêneros, como *Butyrivibrio*, *Butyribacterium*, *Sarcina*, *Eubacterium*, *Fusobacterium* e *Megasphaera* (ZHANG et al., 2009; KIM et al., 2016; LUO et al., 2018).

3.3.5.4. Ácido Lático

O ácido lático atingiu a produção mundial de 1,22 x 10^6 toneladas em 2016, representando um mercado avaliado em USD2,08 bilhões. Considerando seu crescimento anual de 16,2%, pode chegar a 1,960 x 10^6 toneladas em 2025, movimentando US$9,8 bilhões mundialmente (GRAND VIEW RESEARCH, 2018). Esse ácido possui aplicações industriais generalizadas, especialmente na produção de alimentos (como aditivo, acidulante, aromatizante e emulsificante), produtos químicos diversos, cosméticos, fármacos (pomadas, soluções anti acne, umectantes e drogas de liberação controlada). Além disso, possui grande potencial para produção de polímeros de ácido polilático (PLA) biodegradáveis e biocompatíveis, sendo interessante à área médica (regeneração tecidual, suturas cirúrgicas, fixação de fraturas, implantes, etc). Os PLA, por sua vez, podem ser usados em uma ampla variedade de aplicações, desde embalagens até fibras e espumas. No entanto, quando comparado aos plásticos

petroquímicos, a produção de PLA ainda é uma tecnologia relativamente incipiente em escala industrial. Isso se deve ao elevado custo de produção do ácido lático.

Dessa forma, a produção fermentativa desse ácido revela-se promissora, visto que é possível utilizar substratos renováveis baratos, baixas temperaturas de operação, baixo consumo de energia, além da produção de isômeros puros (L-lático ou D-lático) quando o microrganismo apropriado é selecionado no processo. Atualmente, em torno de 90% de todo o ácido lático produzido mundialmente provém da rota fermentativa (ABDEL-RAHMAN et al., 2011; 2013; OLIVEIRA et al., 2018).

A eficiência dos processos de fermentação do ácido lático depende principalmente do produtor de ácido lático, substrato e das condições operacionais. Os métodos de fermentação utilizando elevadas densidades celulares via imobilização ou reciclagem de células demonstraram alcançar elevadas produtividades de ácido lático. Também são sistemas mais compactos em relação ao tamanho e permitem fermentação mais estável em longo período (OZTURK, 1994). Além disso, os sistemas de membranas integradas à fermentação são também tecnologias promissoras para a produção de ácido lático em larga escala (ABDEL-RAHMAN, 2013).

3.4. BIOPRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO A PARTIR DA VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR

Como demonstrado anteriormente, a viabilidade de produção de hidrogênio a partir de resíduos orgânicos tem sido amplamente estudada. A vinhaça, embora seja de composição heterogênea, possui conteúdo residual de carboidratos, além de sais e nutrientes, sendo passível de utilização para produção energética concomitante à fertirrigação. No entanto, a literatura científica ainda se revela incipiente na produção de hidrogênio a partir de vinhaças, especialmente com reatores contínuos. Entre os estudos, destacam-se os trabalhos a partir de vinhaça de mandioca (Luo et al. 2010; Wang et al., 2013a), vinhaças de tequila (Buitrón & Carvajal, 2010), de milho (Fernandes et al., 2010). Em relação à vinhaça de cana-de-açúcar, destacam-se os trabalhos de Searmsirimongkol et al. (2011), Ferraz Junior et al. (2014; 2015a; 2015b), Santos et al. (2014a, 2014b, 2014c), Lazaro et al. (2014), Reis et al. (2015), Ramos (2016), Ferreira (2016), Rego (2016) e Fuess et al. (2016).

Em estudo realizado por Searmsirimongkol et al. (2011) foi avaliada a influência de elevado teor de potássio e sulfato na produção de hidrogênio utilizando como substrato vinhaça

proveniente de destilaria de etanol produzido a partir da fermentação do melaço de cana-de-açúcar em reator em batelada sequencial (ASBR) mesofílico (37℃), com pH controlado de 5,5. O inóculo utilizado foi obtido a partir de lodo anaeróbio do tratamento da mesma água residuária e passou por pré-tratamento térmico. As elevadas concentrações de potássio e sulfato observadas na vinhaça bruta (DQO de 150 g L^{-1}) de 8,8 e 7,0 g L^{-1}, respectivamente, apontaram a necessidade de diluir o afluente a fim de determinar o maior nível de tolerância das bactérias produtoras de hidrogênio ao efeito tóxico desses componentes. Assim, concentração afluente foi diluída em 20, 40 e 60 gDQO L^{-1} e o reator operado em TDH entre 32 e 13 h. Embora a máxima concentração de hidrogênio (33,7%) e máxima conversão de DQO (32%) tenham sido obtidas em concentração de 60 gDQO L^{-1} e TDH de 13 h, a maior produção de hidrogênio ocorreu em concentração afluente de 40 gDQO L^{-1}, TDH de 16 h, sendo PVH de 3,31 L H_2 L^{-1} d^{-1} e HY igual a 172 mL H_2 g $DQO_{removida}$. Nessas condições, a rota fermentativa predominante foi a butírica, com os ácidos produzidos na seguinte ordem (g L^{-1}): butírico (9,1); valérico (4,15); acético (2,05) e propiônico (1,7).

Ferraz Junior et al. (2014) operaram quatro reatores anaeróbios de leito empacotado (APBR) em paralelo e condição termofílica (55℃), utilizando diferentes TDH (24, 16, 12 e 8 h) e consequentemente diferentes cargas or gânicas (36,2, 54,3, 72,4 e 108,6 kgDQO m^{-3} d^{-1}, respectivamente). O inóculo usado foi obtido em processo de biomassa auto-fermentada, e o meio suporte, polietileno de baixa densidade (PBD). O pH afluente foi mantido em 6,5. A maior porcentagem de hidrogênio produzida foi no reator operado no TDH de 8 h (108,6 kgDQO m^{-3} d^{-1}), no entanto, no reator operando no TDH de 12 h foram observados mais elevados HY (0,3 mmol H_2 $gDQO^{-1}$ adicionada ou 0,7 mol H_2 mol^{-1} hexose) e PVH (0,53 L H_2 d^{-1} L^{-1}), sendo a distribuição de metabólitos produzidos nesse TDH (g L^{-1}): ácido acético (1,7); ácido butírico (1,5); etanol (0,3); ácido propiônico (1,1); ácido valérico (0,6) e ácido caproico (0,5).

Lazaro et al. (2014) estudaram a produção de hidrogênio em condição mesofilica (37℃) e termofílica (55℃) em testes em batelada utilizando frascos de 2 L com diferentes concentrações de vinhaça (2, 5, 7 e 12 g DQO L^{-1}). O inóculo utilizado na pesquisa foi proveniente de tratamento em reator UASB de águas residuárias de abatedouro de aves. Nos testes em temperatura de 37℃, o aumento da concentração da vinhaça não alterou significativamente o HY, passando de 1,72 para 2,23 mmol H_2 g^{-1}DQO (em 7 g DQO L^{-1}). Já em temperatura de 55℃, o aumento da concentração causou redução no HY de 2,31 para 0,44 mmol H_2 $gDQO^{-1}$. Em relação aos metabólitos produzidos, tanto na condição mesofílica como na termofílica houve produção de ácido acético, ácido butírico e etanol em todas as concentrações de vinhaça testadas, com destaque para o aumento na produção de etanol na

concentração de 12 g DQO L^{-1}. Na temperatura mesofílica o ácido propiônico foi detectado somente nas concentrações de 2, 5 e 7 g DQO L^{-1}, enquanto na termofílica o acetato foi detectado apenas em 7 g DQO L^{-1}. As concentrações de ácidos foram maiores nos testes mesofílicos, sendo esse resultado explicado pelo maior consumo de carboidrato nessa temperatura (79,4 a 86,7%) relativo aos testes termofílicos (42,9% a 61,3%). Os resultados obtidos, segundo os autores, refletem a influência da temperatura nas diferentes composições das comunidades microbianas, havendo predominância de microrganismos do gênero *Clostridium* em 37℃, enquanto em 55℃ predominou o gênero *Thermoanaerobacter*.

Com o objetivo de avaliar a adaptação da comunidade microbiana à vinhaça de cana-de-açúcar com auxílio de glicose, Santos et al (2014a) promoveram a co-digestão em diferentes proporções desses substratos em RALF termofílico (55℃), mantendo a concentração afluente em 5 g DQO L^{-1}. Os autores aplicaram frações decrescentes de glicose, ao mesmo passo que aumentaram a fração de vinhaça, variando o TDH entre 8 e 1 h. Em seguida, para avaliar a capacidade de produção de hidrogênio somente a partir de vinhaça, a glicose foi completamente removida do afluente, sendo o RALF operado nos TDH de 2 e 1 h. O maior HY foi observado no TDH de 4 h (5,73 mmol H_2 g^{-1} DQO aplicada), sendo posteriormente reduzido em TDH mais baixos. No entanto, o PVH seguiu tendência diferente, com valor máximo de 18,72 L H_2 d^{-1} L^{-1}. Os principais metabólitos detectados foram os ácidos succínico, lático e butírico. A utilização de vinhaça bruta favoreceu a produção dos ácidos butírico, isobutírico e acético, promovendo redução do ácido succínico, sugerindo rota favorável à produção de hidrogênio. Na comunidade microbiana predominaram os gêneros *Thermoanaerobacterium* e *Clostridium*.

Santos et al. (2014b) avaliaram o efeito do TDH na produção de hidrogênio em dois reatores (RALF1 e RALF2) termofílicos com concentrações de 10 e 30 g DQO L^{-1}, respectivamente, de vinhaça de cana-de-açúcar. Os reatores foram preenchidos com cinasita como meio suporte de adesão da biomassa e inoculados com lodo de reator UASB termofílico proveniente do tratamento de vinhaça de cana-de-açúcar. O pH foi ajustado em torno de 4,5 e o TDH, variado entre 6 e 1 h (TCO entre 40 e 240 kg DQO m^{-3} d^{-1}) para RALF1 e 8 e 1 h (TCO entre 90 e 720 kg DQO m^{-3} d^{-1}) para RALF2. O RALF1 apresentou o maior valor de HY (2,86 mmol g^{-1} DQO aplicada), no TDH de 6 h (40 kg DQO m^{-3} d^{-1}). Já no RALF2 o valor de HY foi menor do que do RALF1 (0,79 mmol g^{-1} DQO aplicada), em TDH de 6 h (120 kg DQO m^{-3} d^{-1}). A PVH também foi mais elevada para o RALF1, sendo atingido o valor máximo de 47,04 L H_2 d^{-1} L^{-1} em TDH de 1 h (240 kg DQO m^{-3} d^{-1}), enquanto no RALF2 foi obtida a PVH máxima de 19,44 L H_2 d^{-1} L^{-1} no TDH de 2 h (360 kg DQO m^{-3} d^{-1}. Os principais metabólitos

produzidos ao longo da operação foram ácido acético, butírico, succínico e propiônico. Os autores constataram que a elevada concentração de ácidos orgânicos voláteis dentre os metabólitos produzidos interferiu na produção de hidrogênio, visto que o HY não seguiu a mesma tendência da PVH.

Santos et al. (2014c) avaliaram a produção de hidrogênio a partir da variação da taxa de carregamento orgânico (TCO) e redução do tempo de detenção hidraulica (TDH), utilizando dois RALF (R1 e R2) operados em condição termofílica, sendo o R1 com 15 g DQO L^{-1} e o R2 com 20 g DQO L^{-1}. Os reatores foram inoculados com lodo proveniente de um UASB e preenchidos com argila expandida (cinasita), e o TDH de ambos variou entre 6 e 1 h (com TCO entre 60 e 360 60 e 480 kg DQO m^{-3} d^{-1} para R1 e R2 respectivamente). Com a redução do TDH, houve redução do percentual de hidrogênio no biogás, sendo os valores máximos 48,9% (R1) e 57,5% (R2) no TDH de 6 h. A PVH foi elevada de 10,80 para 35,76 L H_2 d^{-1} L^{-1} em R1 e de 12,96 para 28,80 L H_2 d^{-1} L^{-1} em R2. Já o HY variou entre 2,23 e 1,62 mmol H_2 g^{-1} DQO adicionada para o R1 e 1,85 e 1,51 mmol H_2 g^{-1} DQO adicionada. Os resultados decrescentes para esse parâmetro sugerem que em ambos os reatores a produção de hidrogênio acima de 80 kg DQO m^{-3} d^{-1} ocorreu sob condição de sobrecarga. Observou-se, dentre os produtos metabólicos produzidos, principalmente ácidos butírico e isobutírico, além dos ácidos lático e propiônico.

Ferraz Junior et al. (2015a) operaram reatores anaeróbios de leito empacotado (APBR) em paralelo (25℃), testando quatro materiais suporte: argila expandida (EC), carvão (Ch), cerâmica porosa (PC) e polietileno de baixa densidade (LDP). O inóculo utilizado foi biomassa auto-fermentada e TDH de operação foi mantido constante em 24 h (TCO de 36,2 kg DQO m^{-3} d^{-1}), sendo os maiores percentuais de hidrogênio, HY e PVH médios obtidos para o LDP (11,3%, 0,6 mol H_2 mol^{-1}carboidratos totais e 0,084 L H_2 d^{-1} L^{-1}), com predominância de organismos do gênero *Clostridium* e *Pectinatus*.

Utilizando APBR, Ferraz Junior et al. (2015b) estudaram a produção de hidrogênio a partir da vinhaça bruta (36,2 g DQO L^{-1}) em faixa termofílica (55 °C) com TDH fixo de 10,2 h (TCO de 84,2 kg DQO m^{-3} d^{-1}). O meio suporte usado foi polietileno de baixa densidade e a inoculação foi feita com biomassa auto fermentada desenvolvida a partir da mesma vinhaça. O pH afluente foi mantido em 6,5, enquanto o pH do reator foi estabilizado em 5,5. Os autores relatam o percentual de hidrogênio obtido sendo 38,7%, a PVH 0,76 L d^{-1} L^{-1} e o HY máximo igual a 0,8 mol H_2 mol^{-1} hexose. Os metabólitos produzidos foram principalmente (g L^{-1}) ácido butírico (2,3 g L^{-1} = 36,7%) e acético (2,8 = 44%), seguidos por propiônico (0,7 g L^{-1} = 11,18%), valérico (0,21 g L^{-1} = 3,35%), capróico (0,17 g L^{-1} = 2,71%).

Reis et al. (2015), objetivando avaliar as vantagens do uso de co-substrato para adaptar o sistema à vinhaça, além de verificar o efeito do TDH na produção de hidrogênio, operaram dois RALF (22 °C) alimentados inicialmente com glicose, sendo introduzida vinhaça gradativamente na alimentação até que fosse estabelecida como única fonte de carbono. Após essa adaptação, os sistemas foram submetidos a diferentes TDH (6, 4, 2 e 1h), com pH dos reatores mantido entre 4 e 5 ao longo da operação. Utilizando cinasita como material suporte para imobilização da biomassa, os sistemas foram operados em concentrações afluentes de 5 (R5) e 10 g DQO L^{-1} (R10). Ambos os reatores foram inoculados com lodo de UASB mesofílico utilizado para tratamento de águas residuárias de abate suíno e pré-tratado termicamente. Os máximos do estudo foram obtidos para o R5, sendo o PVH igual a 13,68 L d^{-1} L^{-1} no TDH de 1 h, em que a vinhaça foi a única fonte de carbono, enquanto o HY foi 3,07 mmol H_2 g DQO^{-1}, aplicada no TDH de 6 h, em que a relação vinhaça:glicose foi 1:3. Metano foi detectado a partir do TDH de 4 h, cuja alimentação afluente continha somente vinhaça, demonstrando que os reatores foram afetados pela introdução do novo substrato

Ferreira (2016) avaliou a produção de hidrogênio em RALF termofílico (55 °C) utilizando vinhaça de cana-de-açúcar pré-tratada físico-quimicamente na concentração de 5 g DQO L^{-1} e variando o TDH entre 8 e 1 h (TCO de 15 a 120 kg DQO m^{-3} d^{-1}). O meio suporte utilizado foi cinasita, enquanto o inóculo foi obtido a partir de UASB termofílico para tratamento de vinhaça. A composição do biogás se restringiu a hidrogênio e gás carbônico, chegando ao percentual máximo de 46,7% no TDH de 1 h. Os maiores PVH e HY também foram obtidos no TDH de 1 h, sendo 12,96 L H_2 d^{-1} L^{-1} e 0,33 mol H_2 mol^{-1} hexose, respectivamente. Nesse TDH a fermentação foi mista, com metabólitos sendo (g L^{-1}) ácido butírico (0,296), ácido propiônico (0,226), ácido acético (0,176), ácido málico (0,291), etanol (0,133), ácido cítrico (0,126).

Fuess et al. (2016) operaram APBR por 240 dias em condição termofílica (55 °C) a partir de vinhaça de cana-de-açúcar pura (28,3 g DQO L^{-1}), sendo a TCO mantida em 84,2 kg DQO m^{-3} d^{-1} (TDH de 7,5 h) e o pH efluente controlado entre 5,1 e 5,2 por meio da adição de hidróxido de sódio (NaOH) no afluente. A vinhaça foi filtrada afim de remover níveis excessivos de sólidos suspensos e evitar entupimentos no reator. O inóculo utilizado foi biomassa auto-fermentada, enquanto o material suporte para adesão microbiana foi polietileno. O percentual médio de hidrogênio no biogás durante toda a operação foi de 19,6 ± 10,5 %, enquanto o valor médio de HY foi 1,5 ± 1,1 mol H_2 mol^{-1} carboidratos (0,49 ± 0,33 mmol H_2 g^{-1} DQO adicionada). Já a PVH média foi 0,79 ± 0,59 L H_2 d^{-1} L^{-1}. Não houve estabilidade na

produção de hidrogênio durante todo o período operacional, sendo adotadas diferentes estratégias operacionais de recuperação do desempenho do reator, como a aplicação de carga orgânica de choque, com elevação por curto período para 110 kg DQO m^{-3} d^{-1} a fim de promover choque de carga e elevar a atividade dos microrganismos produtores de hidrogênio. Além disso, foram efetuadas descargas periódicas de biomassa excessiva e choque no pH com bombeamento de vinhaça sem pH ajustado (pH 4,4), a fim de gerar um distúrbio no sistema acidogênico e reproduzir condições similares às observadas no final da inoculação. Os principais metabólitos produzidos foram os ácidos butírico (1,36 g L^{-1}) e acético (1,38 g L^{-1}), exceto entre os dias 130 e 160, em que ocorreu aumento na concentração de ácido propiônico, coincidindo com o declínio da atividade hidrogenogênica.

Ramos (2016) operando RALF com concentração afluente de 10 g DQO L^{-1} avaliou a influência da temperatura em faixa termofílica e do TDH na produção fermentativa de hidrogênio. Na temperatura de entre 55 °C o TDH foi variado entre 8 e 0,5 h (30 a 480 kg DQO m^{-3} d^{-1}), enquanto nas temperaturas de 65 °C e 75 °C foi fixado em 4 h (60 kg DQO m^{-3} d^{-1}). O inóculo utilizado foi proveniente de UASB termofílico para tratamento de vinhaça, e o meio suporte foi argila expandida. O autor obteve percentuais estáveis de hidrogênio no biogás na temperatura de 55 °C, com valor máximo alcançado (61,9%) em 0,5 h. Com o aumento da temperatura para 65 °C os valores mantiveram-se constantes (em torno de 46%); no entanto, com a elevação da temperatura, a fração molar de hidrogênio foi reduzida para 23,2%. Já em relação ao PVH, a 55 °C a redução do TDH ocasionou o seu aumento, sendo o valor máximo 17,04 L H_2 d^{-1} L^{-1} em 0,5 h. Já o HY nessa temperatura teve seu valor máximo do estudo, no TDH de 4 h (1,64 mmol H_2 g^{-1} DQO aplicada). Com a redução do TDH além desse valor, na temperatura de 55 °C, foi observada redução no rendimento de hidrogênio, resultado que os autores atribuíram ao aumento da taxa de carregamento orgânica, visto que, acima de 60 kg DQO m^{-3} d^{-1}, ocorreu sobrecarga do sistema. Na temperatura de 65 °C o HY ainda se mostrou elevado, sendo 1,29 mmol H_2 g^{-1} DQO. Os principais metabólitos obtidos na operação foram os ácidos butírico (12,2 a 37,0%), isobutírico (7,6 a 32,0%) e o álcool metanol (10,8 a 35,7%).

Rego (2016) operando RALF mesofílico (30 °C) com TDH variando entre 8 e 1 h (16 a 112 kg DQO m^{-3} d^{-1}) detectou o máximo de hidrogênio de 13% no TDH de 2 h, passando a 9% no TDH de 1 h. O inóculo utilizado foi lodo mesofílico de UASB utilizado para tratamento de efluentes de uma avícola, enquanto o meio suporte foi cinasita. Embora tenha sido detectado hidrogênio na composição, não houve produção volumétrica desse gás. O autor atribuiu esse resultado aos metabólitos produzidos, pois no TDH de 2 h as concentrações elevadas de ácido acético provavelmente ocorreram em decorrência do processo de homoacetogênese,

consumindo hidrogênio. Já no TDH de 1 h a presença de ácido propiônico em grandes concentrações pode ter inibido a produção de hidrogênio.

A Tabela 3.3 resume as condições testadas pelos trabalhos relacionados à produção de hidrogênio a partir da vinhaça. Destacam-se os trabalhos realizados por membros do Laboratório de Controle Ambiental II (LCA II) do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos, os quais: Santos et al (2014a, 2014b, 2014c), Reis et al. (2015), Ferreira (2016), Rego (2016) e Ramos (2016).

Tabela 3.3 – Condições utilizadas na literatura a respeito da produção de hidrogênio a partir da vinhaça.

Reator	**Inóculo**	**T (°C)**	**Cafl (g DQO L^{-1})**	**TDH (h)**	**TCO (kg DQO m^{-3} d^{-1})**	**Referência**
ASBR	Lodo da mesma água residuária	37	20 - 60	32 - 13	15 - 112,5	Searmsirimongkol et al. (2011)
APBR	Biomassa auto-fermentada	55	36,2	24 - 8	36,2 - 108,6	Ferraz Junior et al. (2014)
Batelada	Lodo de UASB mesofílico (abatedouro de aves)	37 55	2, 5, 7, 12	-	-	Lazaro et al. (2014)
RALF	Lodo de UASB termofílico (tratamento de vinhaça)	55	5	8 - 1	26,6 - 225,3	Santos et al. (2014a)
RALF	Lodo de UASB termofílico (tratamento de vinhaça)	55	10 30	8 - 1 6 - 1	40 - 240 90 - 720	Santos et al. (2014b)
RALF	Lodo de UASB termofílico (tratamento de vinhaça)	56	15 20	6 - 1 6 - 1	60 - 360 60 - 480	Santos et al. (2014c)
APBR	Biomassa auto-fermentada	25	36,2	24	36,2	Ferraz Junior et al. (2015a)

ASBR: *Anaerobic Sequencing Batch Reator* (Reator Anaeróbio em Batelada Sequencial), APBR: *Anaerobic Packed Bed Reactor* (Reator Anaeróbio de Leito Empacotado), RALF: Reator Anaeróbio de Leito Fluidificado.

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

Tabela 3.3 – Condições utilizadas na literatura a respeito da produção de hidrogênio a partir da vinhaça (Continuação).

Reator	**Inóculo**	**T (°C)**	**Cafl (g DQO L^{-1})**	**TDH (h)**	**TCO (kg DQO m^{-3} d^{-1})**	**Referência**
APBR	Biomassa auto-fermentada	55	36,2	10,2	84,2	Ferraz Junior et al. (2015b)
RALF	Lodo de UASB mesofílico (abatedouro de aves)	22	5 10	6 - 1 6 - 1	-	Reis et al. (2015)
RALF	Lodo de UASB termofílico (tratamento de vinhaça)	55	5	8 -1	15 - 120	Ferreira (2016)
APBR	Biomassa auto-fermentada	55	28,3	7,5	84,2	Fuess et al. (2016)
RALF	Lodo de UASB mesofílico (abatedouro de aves)	30	5	8 -1	16 - 112	Rego (2016)
RALF	Lodo de UASB termofílico (tratamento de vinhaça)	55	10	8 - 0,5	30 - 480	Ramos (2016)

ASBR: *Anaerobic Sequencing Batch Reator* (Reator Anaeróbio em Batelada Sequencial), APBR: *Anaerobic Packed Bed Reactor* (Reator Anaeróbio de Leito Empacotado), RALF: Reator Anaeróbio de Leito Fluidificado.

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

3.5. REATOR ANAERÓBIO DE LEITO GRANULAR EXPANDIDO (EGSB)

Dados os trabalhos expostos no âmbito da geração de hidrogênio a partir da vinhaça e considerando a sua crescente geração em decorrência do aumento da produção de etanol no Brasil, além da importância do hidrogênio como combustível na futura matriz energética brasileira, é necessário que as tecnologias para produção biológica desse gás sejam aperfeiçoadas, possibilitando ampliação para escala real.

Muitos estudos recentes abordando a produção de hidrogênio são focados no desenvolvimento de diferentes tipos de reatores, examinando os parâmetros ótimos para as diferentes configurações. A configuração do reator influencia fortemente no processo de fermentação, especialmente na retenção de biomassa (REN et al., 2011). Os sistemas utilizados podem ser divididos segundo o crescimento celular em sistemas suspensos e imobilizados. Os sistemas suspensos promovem maior transferência de massa entre os microrganismos e o substrato; no entanto, existe a dificuldade de manter a produção de hidrogênio em baixos TDH, visto que nessa condição ocorre grande saída de biomassa do reator. Dessa forma, os sistemas mais utilizados na produção fermentativa de hidrogênio têm sido com imobilização de células (LIN; WU; CHANG, 2006).

Segundo Lin, Wu e Chang (2006), a imobilização de células permite maior quantidade de biomassa com produtores de hidrogênio, além de proporcionar produção de hidrogênio em altas cargas orgânicas aplicadas ou TDH baixo sem as células sofrerem lavagem do reator. No entanto, esse sistema normalmente possui o desafio de manter estabilidade mecânica e biológica em operação de longa duração.

O Reator Anaeróbio de Leito Granular Expandido (EGSB) utiliza o sistema de células imobilizadas e foi desenvolvido principalmente para aumentar a interação entre substrato e biomassa a partir da expansão do leito e aumento da mistura hidráulica. É capaz de tratar águas residuárias de alta resistência (LIM; KIM, 2014; SHELDON; ERDOGAN, 2016), sendo uma modificação do UASB desenvolvido para evitar o acúmulo de sólidos da água residuária afluente. Esse promove a recirculação do meio, contribuindo com maior transferência de massa entre os grânulos e a água residuária; além disso, maior força cisalhante é exercida sobre os grânulos devido à fluidificação, retirando as camadas externas de lodo e as expulsando do reator (LETTINGA et al., 1993, 1997; NICOLELLA et al., 2000).

O lodo granular é mantido expandido devido à elevada taxa de recirculação hidráulica aplicada ao sistema e elevada razão altura/diâmetro, a qual intensifica a mistura no reator,

promovendo melhor contato entre os grânulos e o substrato. Tem-se as velocidades superficiais do líquido recirculado variando entre 5 e 10 m h^{-1}, enquanto em reatores UASB as velocidades superficiais do líquido são inferiores à faixa 0,5-1,5 m h^{-1} (KATO, 1994; CHERNICHARO, 1997; SEGUEZZO et al., 1998; DINSDALE, et al., 2000; LIU et al., 2011; LIM; KIM, 2014).

Além disso, o reator EGSB possui alta eficiência de operação, mesmo com cargas orgânicas elevadas em comparação a reatores UASB, pois o lodo é muito ativo, o que significa maior produção de biogás; no entanto, não remove sólidos suspensos e material coloidal (SEGHEZZO et al., 1998; DINSDALE et al., 2000). Alguns trabalhos reportam, ainda, que o reator EGSB é um sistema viável para tratamento de águas residuárias de grande resistência em temperaturas baixas. (LIM; KIM, 2013).

Há poucos trabalhos na literatura sobre produção de hidrogênio em reatores EGSB. Abreu, Danko e Alves (2007) avaliaram o efeito da temperatura na produção de hidrogênio usando três reatores EGSB: R1 (37℃), R2 (55℃) e R3 (70℃). Os três reatores foram alimentados com glicose e L-arabinose na mesma proporção, em concentração de 5 g DQO L^{-1} e TDH de 13 h. O inóculo utilizado para o R1 foi lodo granular da estação de tratamento de águas residuárias de cervejaria, autoclavado por 45 minutos. Em seguida o lodo do R1 foi utilizado como inóculo para o R2 e o R3. Nos três reatores não foi possível manter produção contínua de hidrogênio, com expressivas variações ao longo de todo o período operacional. A maior produção volumétrica de hidrogênio no R1 ocorreu por somente 6 dias de operação (0,38 L d^{-1} L^{-1}), sendo, nesse período, n-butirato o principal metabólito produzido (0,98 g L^{-1}). A partir do dia 48, houve decaimento drástico de hidrogênio chegando a zero, ocorrência que os autores atribuíram à produção de homoacetogênese, já que não foi detectado metano na composição do biogás e a concentração de acetato aumentou bastante, chegando a 1,88 g L^{-1}.

Guo et al. (2008a) utilizaram um reator granular de leito expandido (EGSB) com carvão ativado como meio suporte para produzir hidrogênio a partir do melaço. A fonte de inóculo do reator foi uma mistura de lodo de efluentes domésticos e lodo de um reator acidogênico para tratamento de efluentes farmacêuticos. Durante a operação não houve controle do pH no reator e a temperatura foi mantida em faixa mesofílica (35 ºC). A TCO, concentração afluente e o TDH variaram durante a operação de 8 a 192 kg DQO m^{-3} d^{-1}, 2 a 10 g DQO L^{-1} e 6 a 1 h, respectivamente. Em TDH de 2 h (TCO de 120 kg DQO m^{-3} d^{-1}) foi verificada a maior produção volumétrica de hidrogênio (17,04 L d^{-1} L^{-1}); nesse mesmo TDH foram também verificados o maior rendimento e produção específica de hidrogênio, sendo 1,73 mol H_2 mol^{-1} hexose e 3,16 mmol H_2 g^{-1} SSV h^{-1}, respectivamente. A composição de hidrogênio no biogás gerado foi

constituída por 30 a 53%. Os principais metabólitos detectados na fase líquida foram acetato e etanol.

Guo et al. (2008b) operaram reator EGSB mesofílico (30 ºC) para tratamento de água residuária proveniente de amido e produção simultânea de hidrogênio. Carvão ativado granular foi utilizado como meio suporte, o pH do reator foi mantido entre 4,92 e 3,68, o TDH variado entre 24 e 4 h e a concentração afluente entre 4 e 18 g DQO L^{-1} ou 2 à 16 g.L^{-1} de amido. O percentual de hidrogênio no biogás variou entre 35 e 65% e não foi detectado metano. A máxima obtida PVH foi 1,64 L d^{-1} L^{-1} no TDH de 4 h, TCO de 1g amido L^{-1} d^{-1} e pH igual a 4,42, enquanto o HY máximo foi 0,11 L g^{-1} DQO para o TDH de 8 h, TCO de 0,5 g amido L^{-1} d^{-1} e pH de 3,95. Segundo os autores, a concentração de substrato proporcionou efeito positivo na produção de hidrogênio, enquanto o TDH exerceu efeito negativo. Os principais produtos da fermentação foram etanol, acetato e butirato, e a acidificação no reator foi maior para a concentração de 0,5g amido L^{-1} d^{-1} no TDH de 8 horas, em que o pH ficou em 3,95 e em que houve maiores produções de etanol (18,42 mmol L^{-1}) e acetato (13,48 mmol L^{-1}).

Afim de comparar duas estratégias de *start-up* testando o efeito da otimização de comunidades mistas com adesão e adaptação em grânulos metanogênicos tratados termodinamicamente para produção de hidrogênio, Abreu et al. (2010) operaram dois reatores EGSB (70℃) inoculados com grânulos metanogênicos que passaram por pré-tratamento térmico, porém um desses foi enriquecido com uma cultura com alta capacidade de produção de hidrogênio cultivada em laboratório. O meio sintético utilizado continha glicose e arabinose na mesma proporção e com DQO de 5 g L^{-1}, e o TDH foi variado entre 27 e 6 h. O reator inoculado com cultura produtora de hidrogênio obteve produção volumétrica máxima de 2,7 L H_2 d^{-1} L^{-1} no TDH de 6 h, enquanto o rendimento máximo foi de 0,18 L H_2 g^{-1} substrato. Não foi detectado metano no biogás e os principais metabólitos foram acetato, butirato e lactato (sendo o último prevalecente em TDHs inferiores). Nesse reator foi identificada a presença de bactérias dos gêneros *Clostridium* e *Klebsiella*, os quais possuem potencial para produzir hidrogênio. Já o reator que apenas passou por tratamento térmico não produziu hidrogênio constantemente, tendo apenas dois picos (0,8 e 1,5 L H_2 L^{-1} d^{-1}).

Guo et al. (2013) estudaram o efeito da adição de L-cisteína na produção de hidrogênio em três reatores EGSB (35℃) alimentados com glicose (10 g L^{-1}), sendo o primeiro suplementado com 0,5g L^{-1} de L-Cis (E1), o segundo com 1g L^{-1} (E2) e o terceiro sem adição do aminoácido para controle (Ec). O inóculo utilizado foi obtido em uma estação local de tratamento de esgoto (Harbin, China) e pré-aerado antes da inoculação. Foi verificada a

produção de hidrogênio em diferentes TDH, variando de 6 a 2 h. A suplementação estimulou a produção de hidrogênio, sendo a PVH máxima no E1 igual a 2,09 L d^{-1} L^{-1}, 23,7% maior do que a máxima PVH do Ec. Já o maior HY obtido foi 1,93 mol H_2 mol^{-1} glicose, 20,6% maior do que o valor máximo no Ec. Os três reatores avaliados apresentaram etanol e acetato como metabólitos principais em fase líquida, com concentrações menores de propionato e butirato.

Gallardo et al. (2014) avaliaram a produção de 1,3-propanodiol em EGSB mesofílico (37℃) a partir do glicerol, aplicando diferentes TDH (24 a 3 h). Foram operados três reatores em paralelo, sendo o R1 composto por grânulos sem tratamento, R2 contendo os grânulos submetidos ao tratamento térmico e o R3 contendo os grânulos fragmentados. O inóculo utilizado foi constituído por grânulos retirados de um reator UASB para tratamento de águas residuárias de cervejaria e pré-tratado termicamente. O rendimento máximo de 1,3-propanodiol, assim como a maior produtividade, foram alcançadas no R1 sob os TDH de 12 e 3 h, respectivamente. Em análise do biogás produzido, foi mensurado hidrogênio somente no R1 (13%) e R2 (39%), ambos em TDH de 24 h. Isso ocorreu devido à produção de hidrogênio e 1,3-PDO ocorrerem por rotas metabólicas que competem por reduzidos equivalentes.

A partir dos trabalhos expostos e sintetizados na tabela 3.4, os quais utilizaram reatores EGSB em faixas de temperatura mesofílica e termofílica para a produção de hidrogênio e metabólitos solúveis, pode-se constatar que esse tipo de reator apresenta grande potencial de aplicação em larga escala. No entanto, ainda são necessárias mais pesquisas a fim de definir as condições mais apropriadas de operação visando o menor custo atrelado ao processo.

Tabela 3.4 – Resumo da literatura sobre produção de hidrogênio utilizando o reator EGSB.

Substrato	**Inóculo**	**T (°C)**	**Cafl (g DQO L^{-1})**	**TDH (h)**	**TCO (kg DQO $m^{-3}d^{-1}$)**	**Máximo HY**	**Maior PVH (L H_2 d^{-1} L^{-1})**	**Metabólitos principais**	**Autoria (Ano)**
Melaço de cana-de-açúcar	Lodo de efluentes domésticos + efluentes farmacêuticos	35	2 - 10	6 - 1	1 - 192	1,73 (1)	17,04	HAc; EtOH	Guo et al. (2008a)
Glicose e L-arabinose (1:1)	Lodo de ETE (cervejaria) Lodo do R1	R1 (37) R2 (55) R3 (70)	5	13	10	-	0,38	N-HBu	Abreu, Danko e Alves (2007)
Amido de milho	Lodo de CSTR (melaço de cana-de-açúcar)	30	4 - 18	24 - 4	0,125 - 1,0	0,88 (1)	1,64	EtOH; HAc; HBu	Guo et al. (2008b)
Glicose e arabinose (1:1)	Lodo de CSTR (resíduos sólidos)	70	5	27 - 6		0,18(2)	2,7	HAc; HBu; HLa	Abreu et al. (2010)
Glicose + L-cisteína	Lodo de ETE (esgoto doméstico)	35	10	6 -2	-	1,93(1)	2,09	EtOH; HAc	Guo et al. (2013)
Glicerol	Lodo de UASB (cervejaria)	37	25 g L^{-1}	24 - 3	-	-	-	PDO	Gallardo et al. (2014)

HAc: ácido acético; EtOH: etanol; N-HBu: N-butirato; HBu: ácido butírico; HLa: ácido lático; PDO: 1,3 – propanodiol.
(1) mol H_2 mol^{-1} hexose; (2) L H_2 g^{-1} hexose

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

3.6. CONSIDERAÇÕES GERAIS

No cenário brasileiro atual, a cana-de-açúcar destaca-se como um dos principais produtos agrícolas. A produção de etanol tende a elevar-se cada vez mais, consequentemente gerando maior produção de vinhaça como resíduo final. A fertirrigação, atualmente principal aplicação da vinhaça, é potencial causadora de impactos ao solo e aos corpos d'água a longo prazo.

Assim, sob outra perspectiva, esse resíduo pode ser considerado matéria-prima para a fermentação escura, visto que esse processo proporciona disposição ambientalmente adequada, especialmente quando sucedido por etapa metanogênica, promovendo a recuperação de energia, além de gerar subprodutos de elevado valor comercial, o que vai de encontro a uma nova plataforma atrelada ao conceito de biorrefinaria. Outras vantagens da fermentação escura são relacionadas à substituição de combustíveis fósseis, uso de pressão e temperatura ambientes, além baixos custos de operação e manutenção. Entretanto, para que esse processo seja uma realidade em larga escala, o desenvolvimento e operação de reatores acidogênicos contínuos para produção fermentativa de hidrogênio e metabólitos solúveis necessita de maior atenção, visto que existem poucas pesquisas que atestaram as melhores condições de operação.

O EGSB é uma configuração inovadora de reator de alta taxa, que promove melhor contato entre o substrato e a comunidade microbiana, além de apresentar alta efiência de conversão mesmo em elevadas taxas de carregamento orgânico e permitir operação em faixa mesofílica. Assim, foram realizados alguns trabalhos visando a produção de hidrogênio e metabólitos solúveis no EGSB a partir do melaço de cana-de-açúcar (GUO et al., 2008a); glicose (ABREU, DANKO E ALVES, 2007; ABREU et al., 2010; GUO et al., 2013); glicerol (GALLARDO et al., 2014) e amido de milho (GUO et al., 2008b).

Considerando a ausência de pesquisas utilizando a vinhaça de cana-de-açúcar como substrato orgânico em reatores EGSB, pretende-se investigar a influência do TDH na produção contínua de metabólitos solúveis e hidrogênio a partir desse resíduo em reatores EGSB mesofílicos independentes com diferentes concentrações afluentes (10, 20 e 30 g DQO L^{-1}). Espera-se contribuir com a ampliação dos conhecimentos de rotas metabólicas envolvidas no processo de produção de hidrogênio e de produtos com valor econômico agregado.

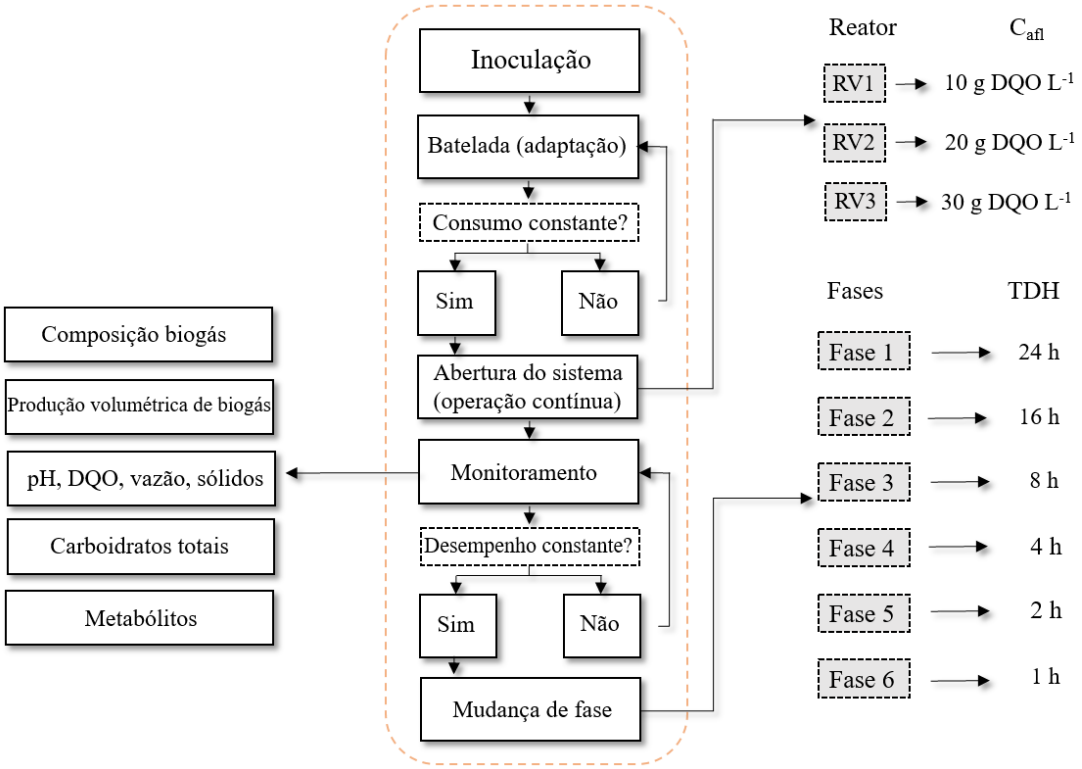
4. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão apresentados o inóculo empregado na produção biológica de hidrogênio, a metodologia de pré-tratamento térmico do lodo e grânulos, a configuração do sistema utilizado para o desenvolvimento da parte experimental, além dos procedimentos de partida, condições operacionais dos reatores anaeróbios de leito granular expandido (EGSB) mesofílicos e estratégia de operação em sistema aberto. Além disso, será apresentada a caracterização da água residuária, detalhamento e frequência das análises físico-químicas, além dos cálculos dos principais parâmetros para avaliação da produção biológica de hidrogênio.

4.1. ESTRATÉGIA DE OPERAÇÃO

A figura 4.1 sintetiza a estratégia de operação dos reatores EGSB acidogênicos desde a inoculação e adaptação da biomassa até a operação contínua (circuito aberto), com ênfase nos procedimentos de monitoramento e análise nas condições avaliadas (TDH e concentração afluente (Cafl)).

Figura 4.1 – Representação esquemática geral da estratégia de operação dos reatores EGSB.

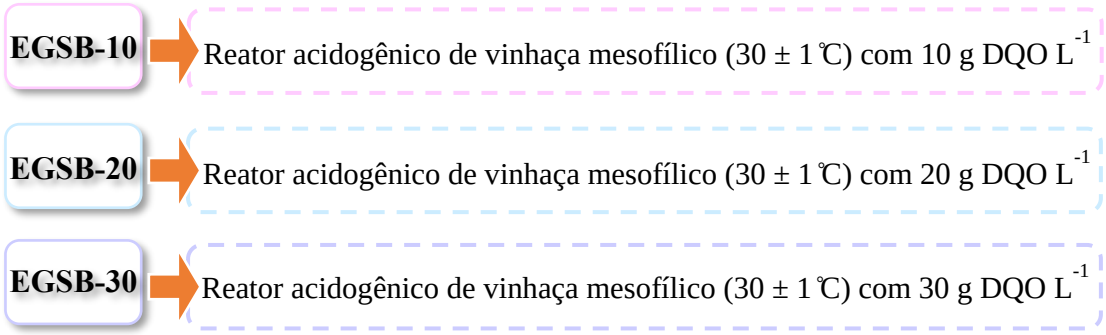


Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

4.2. REATOR ANAERÓBIO DE LEITO GRANULAR EXPANDIDO

Com o intuito de produzir energia e metabólitos intermediários através do processo de fermentação anaeróbia, o presente estudo foi embasado na operação de três reatores EGSB mesofílicos (30 ± 1 ℃) construídos em acrílico transparente, com configurações idênticas, sendo suas nomenclaturas e medidas dispostas na tabela 4.1. Para melhor compreensão, os reatores serão identificados por EGSB-10, EGSB-20 E EGSB-30, conforme a figura 4.2.

Figura 4.2 – Siglas de identificação utilizadas nos reatores EGSB.



Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

Tabela 4.1 - Especificações de EGSB-10, EGSB-20 e EGSB-30.

Nomenclatura	Diâmetro Interno (cm)	Altura (cm)	Volume Total (L)
EGSB-10	43,35	148	2,1844
EGSB-20	36,00	152	1,5472
EGSB-30	43,35	148	2,1844

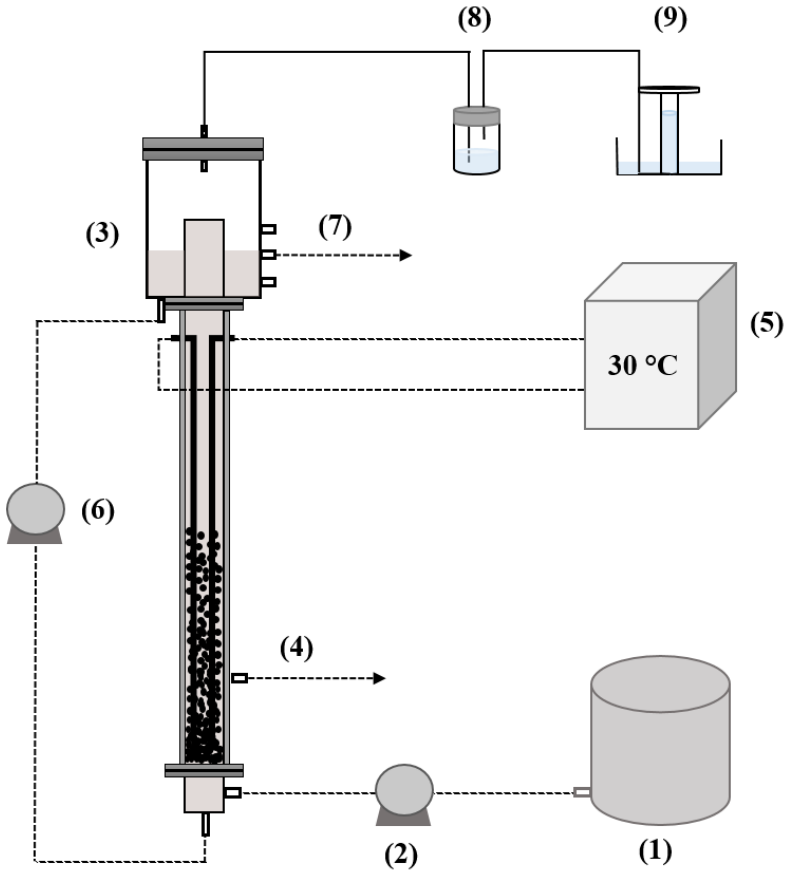
Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

O controle de temperatura foi efetuado por meio de banho ultratermostatizado, com operação em faixa mesofílica (30 ± 1 ℃), que promoveu a troca de calor com a circulação da água pela camisa externa dos reatores, por onde circulava a água proveniente do banho, além de serpentina em formato de “U” no interior do reator.

O modelo de instalação dos EGSB mesofílicos em modo contínuo (circuito aberto) utilizados no presente estudo é ilustrado na figura 4.3, em que é possível identificar: (1) barrilete de água residuária afluente, preparado diariamente; (2) bomba dosadora de afluente; (3) reator anaeróbio de leito granular expandido (EGSB); (4) amostradores; (5) banho ultratermostatizado; (6) bomba de recirculação; (7) saída de efluente; (8) solução salina; (9);

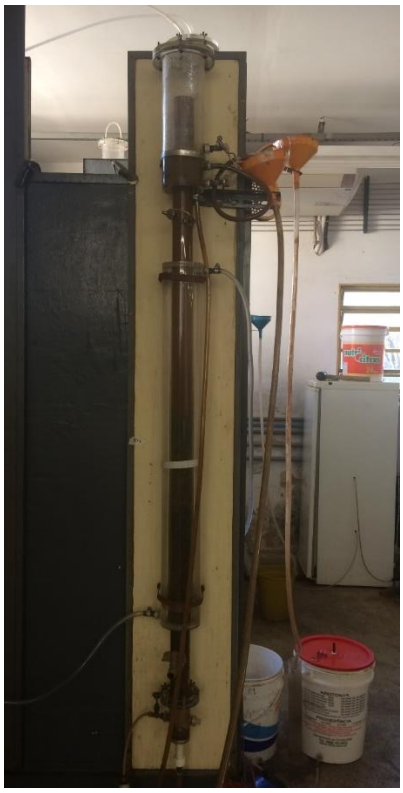
medidor de gás (proveta invertida). Já a Figura 4.4 exibe a instalação experimental do EGSB-30, representando os três reatores com configurações iguais.

Figura 4.3 - Esquema da instalação dos reatores EGSB em circuito aberto.



Fonte: Elaborado pela Autora (2018)

Figura 4.4 – Instalação experimental do Reator Anaeróbio de Leito Granular Expandido (EGSB) mesofílico.



Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

4.3. ÁGUA RESIDUÁRIA E MEIO NUTRICIONAL

Os reatores EGSB acidogênicos foram alimentados com vinhaça de cana-de-açúcar como substrato, em diferentes concentrações. A vinhaça foi fornecida pelo Grupo São Martinho, usina localizada em Pradópolis (SP), que realiza a colheita e processamento da cana-de-açúcar e produção de álcool e açúcar. Ao longo do experimento, as características da vinhaça foram avaliadas (Tabela 4.2), considerando os aspectos físico-químicos: carboidratos totais, DQO total, sólidos suspensos totais (SST), sólidos suspensos voláteis (SSV) e sólidos suspensos fixos (SSF), além da composição de metabólitos já existentes na água residuária. Em complemento, foi utilizado o meio Del Nery (1987) nas relações (mg L^{-1}) apresentadas na Tabela 4.3.

Tabela 4.2 - Composição média da vinhaça de cana-de-açúcar utilizada como substrato (Safra 2017)

Componente	**Concentração (mg L^{-1})**
Carboidrato total (sacarose)	7684 ± 1006
DQO	32003 ± 1330
Sólidos Suspensos	3256 ± 274
Sólidos Suspensos Voláteis	2657 ± 130
Sólidos Suspensos Fixos	565 ± 133
Etanol	4593 ± 1378
Ácido Succínico	5584 ± 1284
Ácido Lático	7791 ± 390
Ácido Acético	6564 ± 722
Ácido Propiônico	4661 ± 1305

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

Tabela 4.3 - Composição do meio nutricional utilizado nos reatores EGSB.

Composto	**Concentração (mg L^{-1})**
KH_2PO_4	85,00
K_2HPO_4	21,70
$Na_2HPO_4.7H_2O$	33,40
$NiSO_4$	1,00
$FeSO_4.7H_2O$	5,00
$(NH_2)_2CO$	125,00
$CaCl_2$	47,00
$CoCl_2$	0,08
$FeCl_3.6H_2O$	0,50
SeO_2	0,07

Fonte: Del Nery (1987)

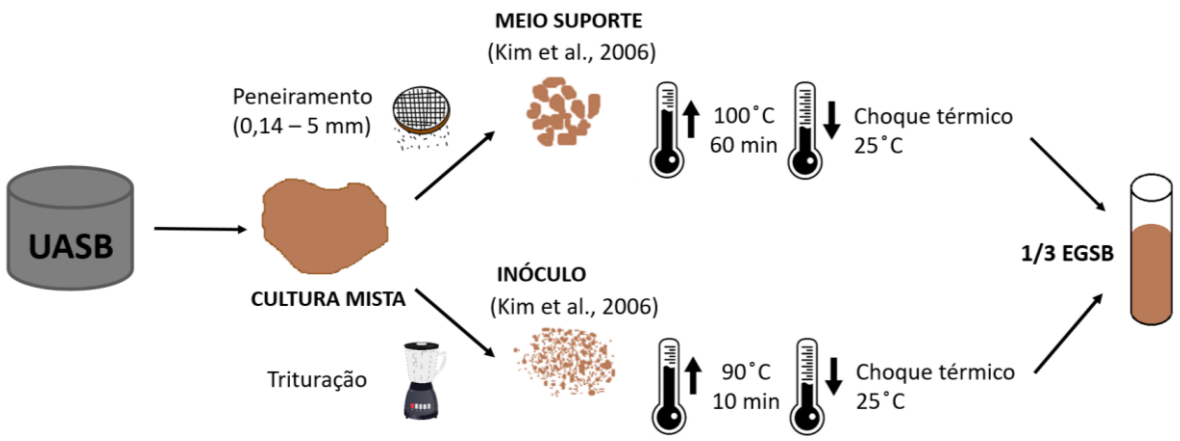
4.4. INÓCULO E MEIO SUPORTE

A fonte de inóculo utilizada na partida operacional dos reatores EGSB foi proveniente de lodo granular metanogênico de reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB) mesofílico (30℃), com cultura mista utilizado na avícola Dacar, localizada em Tietê-SP, para tratamento de águas residuárias provenientes do abatimento de aves. Segundo Delforno (2014), esse lodo possui alta riqueza microbiana, permitindo resposta metabólica e diversas condições afluentes. Logo, a composição microbiana desse lodo atende a objetivos

distintos,sendo utilizado em uma série de estudos em reatores mesofílicos, como tratamento de efluentes de laticínios (CICHELLO; RIBEIRO; TOMMASO, 2012), produção de hidrogênio e metabólitos a partir do glicerol (BÓSIO, 2014; PARANHOS, 2016; SIMÕES, 2017), vinhaça (LAZARO et al., 2014; REGO, 2016), caldo de cana, melaço de cana, sacarose (REGO, 2016) e soro de queijo (RAMOS, 2016).

O lodo a ser inoculado passou por pré-tratamento térmico, conforme a metodologia de Kim et al. (2006), a fim de eliminar as células metanogênicas e inibir o processo de metanogênese, favorecendo a permanência de células acidogênicas por meio da formação de endósporos. Após o pré-tratamento, 10% do volume total do reator foi preenchido com o lodo. O meio suporte utilizado nos reatores EGSB para imobilização da biomassa foi constituído pelos próprios grânulos de um reator UASB metanogênico mesofílico da Avícola Dacar. Inicialmente foi separada uma parte do lodo, lavada em água corrente e, em seguida, foi aplicado um pré-tratamento térmico aos grânulos antes de sua inserção no reator, de forma a eliminar os microrganismos metanogênicos. A metodologia aplicada ao lodo foi adaptada aos grânulos, sendo esses aquecidos por 100℃ por uma hora e em seguida resfriados até temperatura de 25℃ com banho de gelo. Os procedimentos aplicados ao inóculo e ao lodo são melhor ilustrados na Figura 4.5.

Figura 4.5 – Metodologia de pré-tratamento térmico do lodo e dos grânulos constituintes do meio suporte para imobilização dos microrganismos.

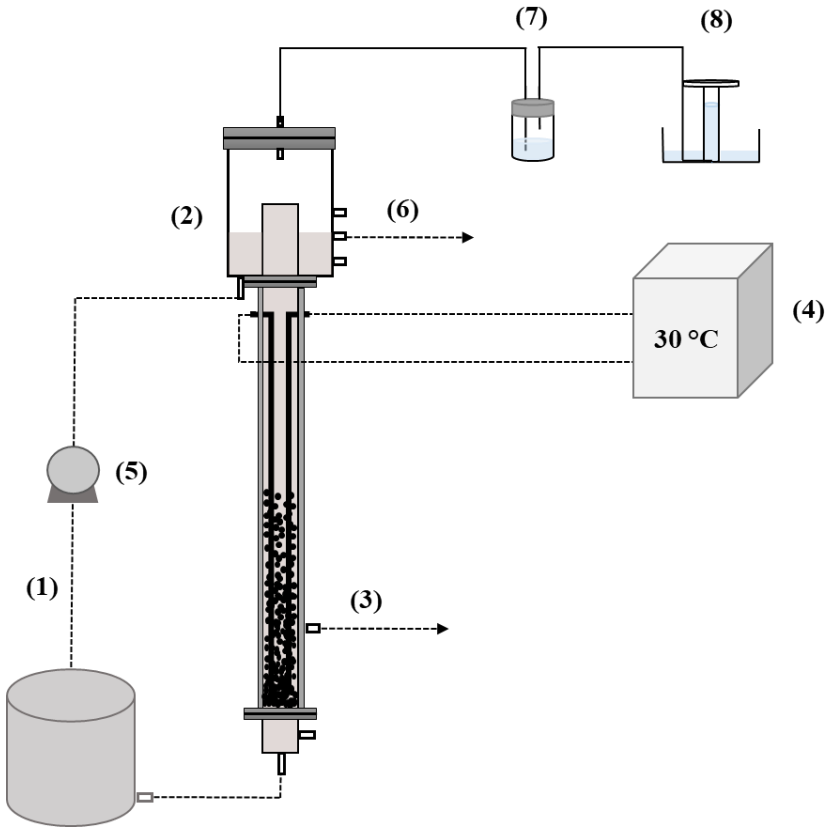


Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

4.5. FASE DE ADAPTAÇÃO DO INÓCULO

O procedimento operacional dos reatores EGSB acidogênicos teve início na etapa de inoculação e adaptação, em que o sistema foi operado em circuito fechado (Figura 4.6), com a seguinte configuração: (1) barrilete de água residuária afluente, preparado diariamente; (2) reator anaeróbio de leito granular expandido (EGSB); (3) amostradores; (4) banho ultratermostatizado; (5) bomba de recirculação; (6) saída de efluente (fechada); (7) solução salina; (8) medidor de gás (proveta invertida).

Figura 4.6 - Operação dos reatores EGSB em circuito fechado.



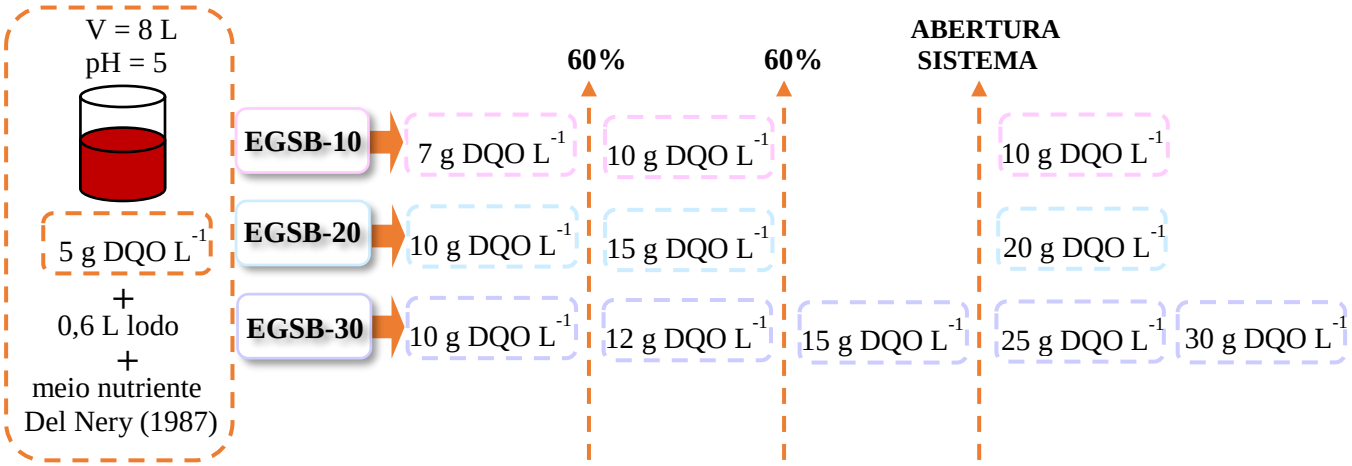
Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

A partida ocorreu de forma similar para os três EGSB, conforme indicado na figura 4.7. O ajuste do pH foi efetuado mediante adição de ácido clorídrico (HCl 30% v/v) no barrilete de alimentação, sendo a concentração máxima estabelecida de HCl em 2 mL L^{-1}. Com o intuito de eliminar o oxigênio dissolvido no meio líquido do barrilete e garantir a anaerobiose do sistema,

gás nitrogênio foi inserido no barrilete e no *headspace* do reator por 10 minutos. Após isso, os reatores EGSB-10, EGSB-20 e EGSB-30 foram operados em circuito fechado com recirculação do efluente por 11, 14 e 15 dias, respectivamente, a fim de garantir a adesão da biomassa ao material suporte e adaptação ao substrato (vinhaça).

Após o consumo em torno de 60% do carboidrato com estabilização do consumo, os sistemas foram suplementados com vinhaça e meio nutriente até atingirem as concentrações afluentes de operação. Análises de DQO e carboidratos totais foram feitas duas vezes ao dia, além de aferido o pH afluente e efluente, também duas vezes ao dia.

Figura 4.7 – Procedimento de adaptação dos reatores EGSB ao inóculo e substrato.



Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

4.6. OPERAÇÃO DOS REATORES EM MODO CONTÍNUO

Neste item serão apresentadas as condições operacionais dos reatores EGSB após abertura do sistema, nas seis fases de operação. Para o início da operação em modo contínuo, as bombas dosadoras foram conectadas aos barriletes e entradas dos reatores, e o barrilete afluente passou a ser renovado diariamente, constituído por meio nutriente Del Nery (1987) e vinhaça nas concentrações estabelecidas (10, 20 e 30 g DQO L^{-1} em EGSB-10, EGSB-20 e EGSB-30, respectivamente). Nos três reatores EGSB o pH afluente foi controlado entre 4,8 e 5,2 com o auxílio de NaOH 6 M (240 gL^{-1}), de forma a manter o pH efluente entre 4,5 e 4,8. A condição anaeróbia foi inicialmente garantida pela injeção de nitrogênio no barrilete de alimentação e também no *headspace* do reator.

A fim de garantir a expansão do leito nos reatores, a velocidade ascensional foi fixada em 1,3 vezes a velocidade mínima de fluidificação, proporcionando expansão de 30% do leito em relação à sua altura quando empacotado, sendo a altura empacotado correspondente a 1/3 da altura total do reator. A vazão de recirculação foi calculada com base na velocidade ascensional e na área transversal dos reatores, sendo 8 L h^{-1} para o EGSB-10 e EGSB-30 e 7,58 L h^{-1} para o EGSB-20. As operações do EGSB-10, EGSB-20 e EGSB-30 foram realizadas durante 190, 198 e 212 dias, respectivamente, em seis fases operacionais, conforme exposto na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 - Descrição das fases de operação de EGSB-10, EGSB-20 e EGSB-30.

Fase	**TDH (h)**	**$TCO_{teórica}$ (kg m^{-3} d^{-1})**	**$Vazão_{aflu}$ (mL h^{-1})**
EGSB-10			
1	24	10	91,0
2	16	15	136,1
3	8	30	273,0
4	4	60	546,1
5	2	120	1092,2
6	1	240	2184,4
EGSB-20			
1	24	20	64,5
2	16	30	96,7
3	8	60	193,4
4	4	120	386,8
5	2	240	773,6
6	1	480	1547,2
EGSB-30			
1	24	30	91,0
2	16	45	136,5
3	8	90	273,0
4	4	180	546,1
5	2	360	1092,2
6	1	720	2184,4

$TCO_{teórica}$: taxa de carregamento orgânico calculada; $Vazão_{aflu}$: Vazão de alimentação do reator ou vazão afluente.

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

O TDH inicial elevado justificou-se pela ausência de trabalhos realizados com o mesmo substrato e tipo de reator, sendo as fases de operação iniciais planejadas de modo que não ocorresse sobrecarga nos reatores, prejudicando a adaptação dos microrganismos produtores de hidrogênio às condições operacionais. A mudança de fase foi executada ao ser constatada estabilidade nos parâmetros de interesse (variação nos valores inferior a 10%), como produção de hidrogênio e consumo de carboidrato. Nas fases em que não houve produção de hidrogênio, a mudança de fase ocorreu pela constatação de estabilização do sistema em relação à conversão de carboidrato e pH efluente.

4.7. MÉTODOS ANALÍTICOS

O desempenho dos reatores foi avaliado a partir de análises físico-químicas, medidas de produção volumétrica de biogás e determinação de sua composição, além da determinação das concentrações de ácidos orgânicos e álcoois, sólidos suspensos totais (SST) e sólidos suspensos voláteis (SSV). Amostras afluentes e efluentes foram coletadas para análises físico-químicas e metabólicas em todo o período operacional dos reatores. As análises foram feitas em triplicata, utilizando como resultados os valores médios obtidos, exceto os valores discrepantes (*outliers*), os quais foram desprezados. Além das análises efetuadas, foram realizadas medidas diárias de vazão, pH e altura do leito.

4.7.1. Análises físico-químicas

As análises físico-químicas foram realizadas de acordo com as metodologias presentes em *Standard Methods of the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2012). As análises de sólidos suspensos totais (SST) e sólidos suspensos voláteis (SSV) foram efetuadas a partir de amostras líquidas de efluentes, enquanto foi necessária também a coleta de amostras afluentes para análise do pH e demanda química de oxigênio (DQO) com a finalidade de controle operacional diário.

4.7.2. Determinação de carboidrato

A determinação de carboidrato total afluente e efluente foi realizada em triplicata por método colorimétrico segundo Dubois *et al.* (1956). Esse método baseia-se na desidratação dos

açúcares com ácido sulfúrico, complexação dos produtos com adição de fenol e leitura na absorbância de 490 nm.

4.7.3. Determinação da produção e composição do biogás

A produção volumétrica de biogás formado nos reatores foi medida pelo método da proveta invertida (Walker et al., 2009), que consiste em uma proveta contendo solução salina saturada, com pH corrigido abaixo de 2 por H_2SO_4, invertida em um béquer. O volume de biogás foi mensurado pelo deslocamento da solução salina na proveta, promovido pela entrada de gás.

A determinação dos componentes presentes no biogás produzido foi realizada por cromatografia gasosa. 1,0 mL de amostra do biogás foi coletada no topo dos reatores, utilizando uma seringa *gas tight*. O gás coletado foi analisado em cromatógrafo gasoso Shimadzu GC-2010, equipado com detector de condutividade térmica (TCD), utilizando a coluna Sigma-Aldrich modelo Carboxen® 1010 Plot (30 m de comprimento, diâmetro interno de 0,53 mm).

As condições cromatográficas utilizadas são descritas a seguir:

- Temperatura do injetor: 30 ºC;
- Temperatura do detector: 200 ºC;
- Temperatura da coluna: 230 ºC;
- Vazão do gás de arraste (Ar): 5,66 mL min^{-1}.

4.7.4. Análise de Metabólitos Solúveis

Para a determinação e quantificação dos ácidos orgânicos voláteis e álcoois, foi aplicada cromatografia gasosa, em que o gás coletado no *headspace* foi analisado em um cromatógrafo da marca Shimadzu, modelo GC-17A, equipado com detector de ionização de chama (FID, *Flame Ionization Detector*) e coluna capilar DB-WAX, de 30m x 0,25mm x 0,25µm, sendo o hidrogênio o gás de arraste.

As condições cromatográficas utilizadas são descritas a seguir:

- Rampa de Temperatura: 35ºC (0’) 2ºC/min 42ºC (0’) 20ºC/min 75ºC (0’) 35ºC/min 120ºC (1’) 10ºC/min 170ºC (2’)
- Temperatura do injetor: 250 ºC

- Temperatura do detector: 280 ºC
- Razão de Split: 10
- Fluxo do gás de arraste (H2): 50 $mL.min^{-1}$
- Fluxo do make-up ou gás auxiliar (N2): 35 $mL.min^{-1}$
- Fluxo do gás de chama (ar sintético): 500 $mL.min^{-1}$
- Fluxo da coluna: 1,56 $mL.min^{-1}$
- Velocidade linear: 34,3 $cm.s^{-1}$

4.7.5. Frequência das análises

A tabela 4.5 apresenta a frequência de realização das análises até agora mencionadas, bem como as metodologias e equipamentos utilizados.

Tabela 4.5 - Análises realizadas em amostras coletadas nas fases operacionais de EGSB-10, EGSB-20 e EGSB-30.

Análise	**Amostra**	**Frequência**	**Metodologia**
Vazão	E	Diária	APHA (2012)
pH	A/E	Diária	
DQO	A/E	3x semana	
ST, SST[1], SSV[2]	E	3x semana	
Carboidratos	A/E	3x semana	Dubois et al. (1956)
Ácidos graxos e álcoois individuais	E	3x semana	Shimadzu GC - 17A
Conteúdo do biogás (H_2, N_2, CH_4; CO_2)	-	3x semana	Shimadzu GC-2010
Produção volumétrica de H_2	-	3x semana	Walker et al. (2009)

[1]SST: sólidos suspensos voláteis; [2]SSV: sólidos suspensos voláteis; A: amostra coletada no afluente; E: amostra coletada no efluente.

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

4.8. CÁLCULO DOS PRINCIPAIS INDICADORES DE DESEMPENHO

No presente item serão apresentados os principais cálculos realizados para a execução desse estudo, que abrangem a taxa de carregamento orgânico aplicada (4.1), taxa de carregamento orgânico aplicada real (4.2), produção volumétrica de hidrogênio (4.3), rendimento de hidrogênio por grama de DQO adicionada (4.4), rendimento molar de hidrogênio por mol de carboidrato consumido (4.5) e a conversão de carboidrato (4.6). Também a equação (4.7) quantifica a concentração de ácido acético proveniente da homoacetogênese, sendo a metodologia utilizada melhor detalhada a seguir.

$$TCO_{aplicada} = \left[\frac{\text{concentração substrato (g DQO } L^{-1})}{TDH_{teórico}\text{ (dias)}}\right] \text{Kg DQO}_{aplicada}\ m^{-3}\ d^{-1} \qquad (4.1)$$

Em que:

$TDH_{teórico}$ = TDH de projeto.

$$TCO_{aplicada\ real} = \left[\frac{\text{concentração substrato (g DQO } L^{-1})}{TDH_{real}\text{ (dias)}}\right] \text{Kg DQO}_{aplicada\ real}\ m^{-3}\ d^{-1} \qquad (4.2)$$

Em que:

TDH_{real} = TDH correspondente à vazão real do reator.

$$PVH = \left[\frac{\left(\frac{\text{volume de } H_2\text{(L)}}{\text{tempo (h)}}\right)}{V_{reator}\ \text{(L)}}\right] L\ H_2\ h^{-1}\ L^{-1} \qquad (4.3)$$

Em que:

V_{reator} = volume do reator.

$$HY_1 = \left[\frac{\text{produção molar de } H_2 \text{ (mmol } H_2 \text{ dia}^{-1})}{TCO_{\text{aplicada real}}}\right] \quad \text{Kg } DQO_{\text{aplicada}}\ m^{-3}\ d^{-1} \qquad (4.4)$$

$$HY_2 = \left[\frac{10^{-3} \text{ x produção molar de } H_2 \text{ (mmol } H_2 \text{ dia}^{-1})}{Q_A \text{ x (carboidrato}_{afl} - \text{ carboidrato}_{efl})}\right] \quad \text{mol } H_2\ \text{mol}^{-1} \text{ hexose} \qquad (4.5)$$

Em que:

Q_A = vazão medida na saída do reator;

$Carboidrato_{afl}$ = carboidrato afluente;

$Carboidrato_{efl}$ = carboidrato efluente.

$$\text{Conversão de carboidrato (\%)} = 100 \text{ x } \left[\frac{(\text{carboidrato}_{afl} \text{ - carboidrato}_{efl})}{\text{carboidrato}_{afl}}\right] \qquad (4.6)$$

Para calcular o acetato produzido por homoacetogênese (AC_{homoac}) foi utilizada a metodologia adaptada de Arroj et al. (2008) por Luo et al. (2011), que analisa as rotas de produção e consumo de hidrogênio na fermentação da glicose. As concentrações de acetato e hidrogênio podem ser subestimadas quando metano é produzido, visto que serão convertidos. Assumindo que o metano foi produzido unicamente a partir do acetato, a Equação 4.7 pode ser usada para calcular o AC_{homoac} máximo considerando 1 mol de CH_4 correspondente a 1 mol de acetato consumido. Se o metano for produzido apenas a partir do hidrogênio, a Equação 4.8 pode ser usada para calcular o acetato mínimo produzido, considerando que 1 mol de CH_4 corresponde a 4 mol de hidrogênio convertido. O valor real para AC_{homoac} foi considerado como intermediário aos dois valores calculados por essas equações (Equação 4.9).

$$\text{Máximo } Ac_{homoac} = \left[\frac{(2 \text{ x } [HAc] + CH_4) + 2 \text{ x } [HBu] - [HPr] - H_2)}{6}\right] \qquad (4.7)$$

$$\text{Máximo } Ac_{homoac} = \left[\frac{2 \text{ x } [Hac] + 2 \text{ x}[HBu] - [HPr] - (H_2 + 4CH_4)}{6}\right] \qquad (4.8)$$

$$Ac_{homoac} = \frac{(2 \text{ x } [HAc] + 2 \text{ x } [HBu] - [HPr] - H_2)}{6} \qquad (4.9)$$

Em que:

[HBu] = concentração média de ácido butírico no efluente do TDH analisado;

[HAc] = concentração média de ácido acético no efluente do TDH analisado;

[HPr] = concentração média de ácido propiônico no efluente do TDH analisado

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente item serão discutidos os resultados obtidos e a interpretação dos parâmetros analisados na operação dos três EGSB mesofílicos (EGSB-10, EGSB-20 e EGSB-30) utilizados para produção de hidrogênio e metabólitos solúveis a partir da vinhaça de cana-de-açúcar. A discussão dos resultados será pautada no efeito do TDH a partir das diferentes concentrações afluentes aplicadas aos reatores.

5.1. CONSUMO DE CARBOIDRATO

As conversões médias de carboidrato em cada fase operacional dos reatores EGSB mesofílicos são apresentadas na Tabela 5.1 e Figura 5.1. A redução do TDH de 24 para 1 h acarretou em TCO de 10 a 240 kg m^{-3} d^{-1}, 20 a 480 kg m^{-3} d^{-1} e 30 a 720 kg m^{-3} d^{-1} em EGSB-10, EGSB-20 e EGSB-30, respectivamente.

Tabela 5.1 - Concentrações e conversões médias de carboidrato nos reatores EGSB.

Fase	TDH (h)	TCO (kg DQO m^{-3} d^{-1})	C_{afl} (g L^{-1})	C_{efl} (g L^{-1})	Conversão [%]
EGSB-10					
1	24	10	1,76 ± 0,38	0,33 ± 0,11	81,64 ± 3,79$^{(9)}$
2	16	15	2,64 ± 0,74	0,52 ± 0,15	74,16 ± 4,95$^{(9)}$
3	8	30	1,79 ± 0,59	0,47 ± 0,16	72,57 ± 2,17$^{(8)}$
4	4	60	1,49 ± 0,38	0,44 ± 0,10	71,61 ± 2,80$^{(8)}$
5	2	120	2,65 ± 0,52	0,62 ± 0,07	75,87 ± 3,98$^{(10)}$
6	1	240	2,46 ± 0,57	0,66 ± 0,18	73,88 ± 5,25$^{(8)}$
EGSB-20					
1	24	20	4,14 ± 1,37	0,79 ± 0,14	79,91 ± 4,37$^{(13)}$
2	16	30	4,40 ± 1,00	0,94 ± 0,16	77,50 ± 6,41$^{(10)}$
3	8	60	3,26 ± 1,12	0,89 ± 0,38	71,71 ± 7,38$^{(8)}$
4	4	120	2,51 ± 0,36	0,81 ± 0,12	67,39 ± 4,19$^{(9)}$
5	2	240	4,36 ± 1,18	1,26 ± 0,38	71,24 ± 4,98$^{(13)}$
6	1	480	4,15 ± 0,57	1,44 ± 0,26	65,06 ± 5,26$^{(12)}$

Cafl: carboidrato afluente; Cefl: carboidrato efluente. Os números entre parênteses referem-se ao número de amostras utilizadas para média.

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

Tabela 5.1 - Concentrações e conversões médias de carboidrato nos reatores EGSB (Continuação).

Fase	TDH (h)	TCO (kg DQO m^{-3} d^{-1})	C_{afl} (g L^{-1})	C_{efl} (g L^{-1})	Conversão [%]
EGSB-30					
1	24	30	6,07 ± 1,96	1,33 ± 0,41	77,75 ± 5,38(9)
2	16	45	8,16 ± 1,36	1,65 ± 0,53	79,91 ± 5,49(8)
3	8	90	5,87 ± 1,06	1,58 ± 0,35	72,94 ± 5,37(12)
4	4	180	7,34 ± 2,15	2,34 ± 0,77	67,21 ± 8,18(8)
5	2	360	6,57 ± 0,79	2,72 ± 0,27	58,21 ± 5,20(8)
6	1	720	7,78 ± 1,15	3,08 ± 0,41	59,78 ± 7,07(9)

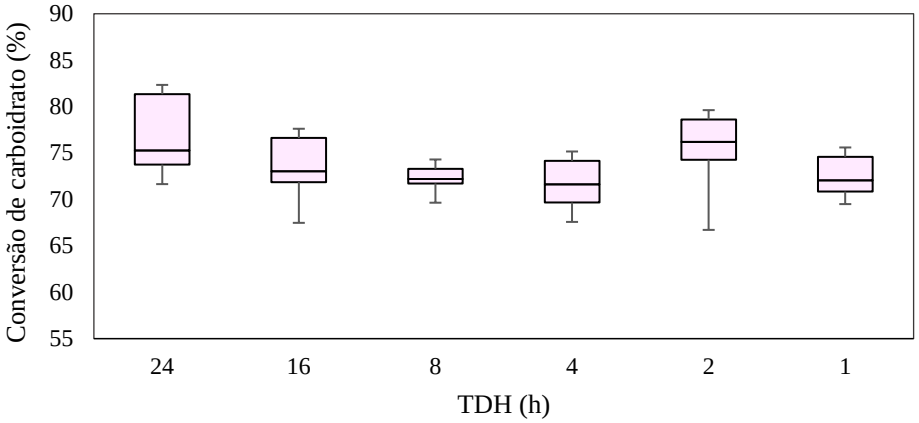
Cafl: carboidrato afluente; Cefl: carboidrato efluente. Os números entre parênteses referem-se ao número de amostras utilizadas para média.

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

Conforme apresentado na tabela 5.1, a concentração afluente de carboidrato variou no EGSB-10 entre 1,49 ± 0,38 e 2,65 ± 0,52 g L^{-1}, enquanto o intervalo para a concentração efluente foi de 0,33 ± 0,11 a 0,66 ± 0,18 g L^{-1}. A diminuição do TDH proporcionou decaimento na conversão média de carboidrato entre as fases 1 e 4, seguido por uma pequena elevação na fase 5 e posterior redução na fase 6. A máxima conversão ocorreu no TDH de 24 h (81,64 ± 3,79%), enquanto a mínima foi obtida no TDH de 4 h (71,61 ± 2,80 %). Logo, a conversão de carboidrato foi pouco impactada pela redução do TDH e consequente aumento da carga orgânica.

Como é possível visualizar na figura 5.1, houve maior dispersão na conversão de carboidrato na fase 1 (TDH de 24 h), e tanto nessa fase como nas fases 2, 3 e 6 (TDH de 16, 8 e 1 h, respectivamente), a mediana apresentou bastante assimetria, indicando que a média aritmética foi influenciada por valores extremos de conversão de carboidrato.

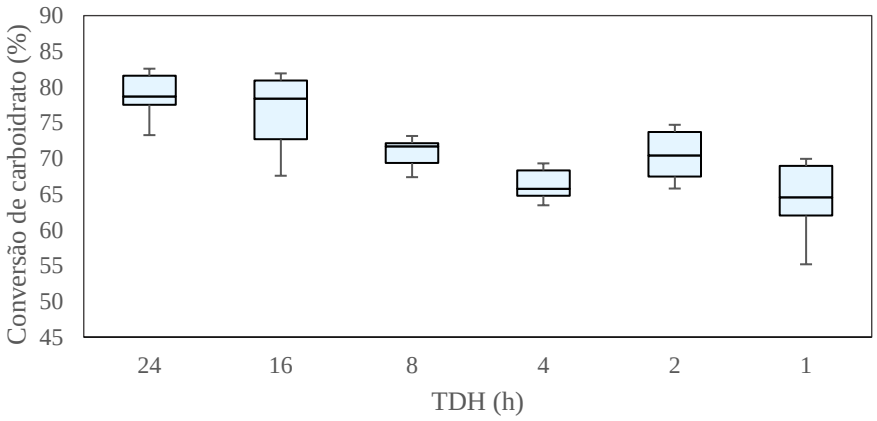
Figura 5.1 - Boxplot das conversões de carboidrato no EGSB-10.



Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

No EGSB-20 o comportamento foi parecido com o EGSB-10 (Tabela 5.1.), com conversão máxima no TDH de 24 h (79,91 ± 4,37 %), decréscimo até o TDH de 4 h e pequena elevação no TDH de 2 h (71,24 ± 4,98 %). No TDH de 1 h ocorreu novo decaimento, sendo nesse TDH o valor mínimo obtido de remoção de carboidrato (65,06 ± 5,26 %). A figura 5.2 demonstra maior dispersão dos dados na fase 2 (TDH de 16 h), enquanto houve maior constância na remoção de carboidrato na fase 5 (TDH de 2 h), visto que a mediana se encontra próxima ao centro do boxplot. Na fase 6 (TDH de 1), única em que foi detectado hidrogênio no EGSB-20, como será exposto no item 5.6, foi obtida a menor eficiência na conversão de carboidrato desse reator.

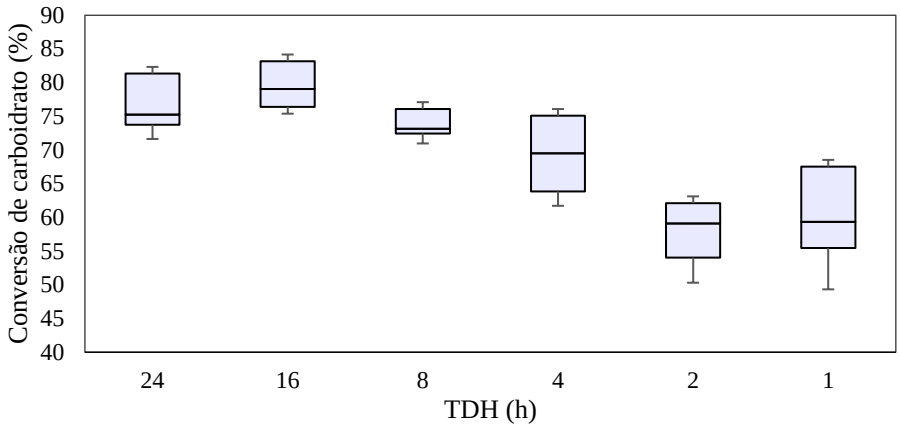
Figura 5.2 - Boxplot das conversões de carboidrato no EGSB-20.



Fonte: elaborado pela Autora (2018)

No EGSB-30 o comportamento já foi um pouco distinto, ocorrendo a maior conversão de carboidrato no TDH de 16 h (79,91 ± 5,49 %). Entre os TDH de 16 e 2 h a conversão foi decrescente, sendo o menor valor médio de conversão obtido em 2 h (58,21 ± 5,20 %), fase com o maior rendimento de hidrogênio (item 5.6). Ou seja, assim como no EGSB-20, o maior rendimento de hidrogênio ocorreu na fase com menor conversão de carboidrato. Em 1 h, cuja maior PVH foi obtida (item 5.6), a conversão manteve-se próxima à obtida no TDH de 2 h, correspondendo a 59,78 ± 7,07.

Figura 5.3 - Boxplot das conversões de carboidrato no EGSB-30.



Fonte: elaborado pela Autora (2018).

Comparando os três reatores EGSB, observa-se, pela tabela 5.1, que todos mantiveram valores de conversão de carboidrato próximos até o TDH de 4 h, embora as concentrações afluentes e consequentemente as TCO aplicadas fossem diferentes. Em geral o EGSB-10 apresentou a melhor performance na conversão de carboidrato (71,6 a 81,6%). Ainda assim, as conversões próximas dos três reatores EGSB indicam que essa configuração de reator foi capaz de suportar cargas orgânicas elevadas, mesmo com a utilização de um substrato complexo, sem grandes variações de conversão de carboidrato entre as fases.

Também utilizando vinhaça de cana-de-açúcar pura (36,2 g DQO L^{-1}), Ferraz Junior et al. (2014), operando quatro reatores APBR (55℃) em TDH entre 24 e 8 h (TCO entre 36,2 e 108,6 kg DQO m^{-3} d^{-1}), obtiveram resultados de conversão de carboidrato similares ao EGSB-30 (65 a 79,9%) para os TDH analisados, variando entre 67,3 e 79,4%. Nas mesmas condições e reator que Ferraz Junior et al. (2014), Fuess et al. (2016), em TCO fixa de 84,2 kg DQO m^{-3} d^{-1} obtiveram conversão média de carboidrato de 63,6%. As menores conversões alcançadas por Fuess et al. (2016) sugerem que a variação na composição da vinhaça utilizada pode ter

exercido grande influência no processo, com maior presença de compostos inibitórios aos organismos fermentativos.

Além disso, os resultados obtidos por Ferraz Junior et al. (2014) e Fuess et al. (2016), bem como do EGSB-30 no presente estudo reforçam que é possível obter elevadas conversões de carboidrato mesmo utilizando um substrato complexo em elevada concentração afluente. Particularmente, o reator EGSB demonstrou robustez na conversão de carboidratos mesmo em TCO bastante superiores às utilizadas por Ferraz Junior et al. (2014) (entre 30 e 720 kg DQO m^{-3} d^{-1}).

Santos et al. (2014b), operando RALF termofílicos (55℃) com vinhaça *in natura* (30 g DQO L^{-1}) e diluída (10 g DQO L^{-1}) entre os TDH de 8 e 1 h e 6 e 1 h, respectivamente, realizaram a adição de uma fonte de carbono simples (glicose) em co-fermentação com a vinhaça (relação 1:2 de glicose:vinhaça) durante a etapa de adaptação ao substrato, de forma a promover melhor adaptação. O reator com vinhaça *in natura* exibiu conversões de carboidrato entre 31,4 e 52,2%, enquanto no reator alimentado com vinhaça diluída, essa variou entre 47 e 49,9%. Santos et al. (2014c) utilizou-se da mesma estratégia em RALF com 15 e 20 g DQO L^{-1}, atingindo conversões de carboidrato entre 23,3 e 27,6% e 26,3 e 31%, respectivamente.

Mesmo com a estratégia de co-fermentação da vinhaça com um substrato sintético de fácil degradação na etapa inicial, as conversões de carboidrato obtidas por Santos et al. (2014b; 2014c) foram bastante inferiores ao presente trabalho. Nesses estudos a composição da vinhaça de cana-de-açúcar utilizada pode ter exercido influência negativa na conversão de carboidrato devido à maior presença, nesse substrato, de compostos tóxicos. Outro aspecto importante é a temperatura de operação dos reatores, uma vez que a faixa mesofílica promove maior diversidade de microrganismos e menor estresse ambiental, resultando em elevadas conversões de carboidrato.

Operando RALF em mesma temperatura que o presente estudo (30℃) em TDH de 8 a 1 h e concentração afluente de 5 g DQO L^{-1} de vinhaça pré-tratada físico-quimicamente, Rego (2016) obteve conversões de carboidrato entre 71 e 92%, valores superiores aos atingidos pelo EGSB-10 (71,6 a 81,6%). As elevadas conversões são justificadas pela baixa concentração afluente e TCO utilizadas, além do pré-tratamento de coagulação, floculação e sedimentação aplicados que, segundo Ferreira (2016), promove a redução de compostos tóxicos presentes no substrato.

Ferreira (2016), operando em condições similares a Rego (2016), exceto pela temperatura em faixa termofílica (55℃) e inóculo já adaptado à vinhaça de cana-de-açúcar, obteve conversão máxima no TDH de 2 h (75%), decaindo com a redução do TDH para 1 h

(54,6%). Os menores valores de conversão obtidos por Ferreira (2016) em comparação ao RALF operado por Rego (2016) e ao presente estudo reforçam a influência da temperatura termofílica, que promove maior estresse aos microrganismos, resultando em menor conversão de carboidrato.

5.2. REMOÇÃO DA DEMANDA QUÍMICA DE OXIGÊNIO

Os valores da DQO afluente, efluente e removida nos reatores EGSB são apresentados na Tabela 5.2 e nas figuras 5.4, 5.5 e 5.6.

Tabela 5.2 – Remoção de DQO em EGSB-10, EGSB-20 e EGSB-30.

Fase	TDH (h)	TCO (kg DQO m^{-3} d^{-1})	DQO_{aflu} (g DQO L^{-1})	DQO_{eflu} (g DQO L^{-1})	Remoção (%)
EGSB-10					
1	24	10	12,89 ± 3,87$^{(9)}$	09,48 ± 2,98$^{(9)}$	26,04 ± 9,35$^{(9)}$
2	16	15	12,34 ± 1,59$^{(8)}$	09,10 ± 1,30$^{(8)}$	25,00 ± 18,30$^{(8)}$
3	8	30	12,59 ± 3,39$^{(9)}$	10,09 ± 2,21$^{(9)}$	18,39 ± 9,28$^{(9)}$
4	4	60	10,42 ± 1,79$^{(8)}$	09,97 ± 1,62$^{(8)}$	12,66 ± 6,02$^{(8)}$
5	2	120	11,89 ± 3,95$^{(10)}$	10,72 ± 3,97$^{(10)}$	10,36 ± 6,72$^{(10)}$
6	1	240	11,86 ± 2,00$^{(7)}$	09,54 ± 1,45$^{(7)}$	18,64 ± 10,96$^{(7)}$
EGSB-20					
1	24	20	18,20 ± 1,81$^{(11)}$	15,22 ± 2,30$^{(11)}$	16,39 ± 8,86$^{(11)}$
2	16	30	18,38 ± 4,66$^{(9)}$	14,46 ± 3,25$^{(9)}$	8,43 ± 7,45$^{(9)}$
3	8	60	22,56 ± 3,51$^{(8)}$	18,03 ± 3,05$^{(8)}$	12,85 ± 7,18$^{(8)}$
4	4	120	18,57 ± 1,53$^{(9)}$	16,93 ± 2,17$^{(9)}$	9,00 ± 6,50$^{(9)}$
5	2	240	20,39 ± 3,70$^{(13)}$	18,00 ±3,21$^{(13)}$	11,60 ± 4,23$^{(13)}$
6	1	480	18,32 ± 1,88$^{(9)}$	16,52 ± 1,96$^{(9)}$	9,86 ± 4,92$^{(9)}$
EGSB-30					
1	24	30	27,10 ± 3,78$^{(8)}$	20,70 ± 5,52$^{(8)}$	17,64 ± 14,32$^{(8)}$
2	16	45	28,12 ± 5,63$^{(7)}$	20,19 ± 2,65$^{(7)}$	21,49 ± 17,68$^{(7)}$
3	8	90	29,98 ± 4,35$^{(9)}$	22,16 ± 4,63$^{(9)}$	18,53 ± 16,27$^{(9)}$
4	4	180	28,76 ± 1,61$^{(5)}$	27,40 ± 2,08$^{(5)}$	6,47 ± 8,98$^{(5)}$
5	2	360	26,78 ± 4,28$^{(8)}$	25,81 ± 4,50$^{(8)}$	7,02 ± 2,14$^{(8)}$
6	1	720	24,06 ± 4,05$^{(9)}$	20,71 ± 3,42$^{(9)}$	16,38 ± 11,37$^{(7)}$

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

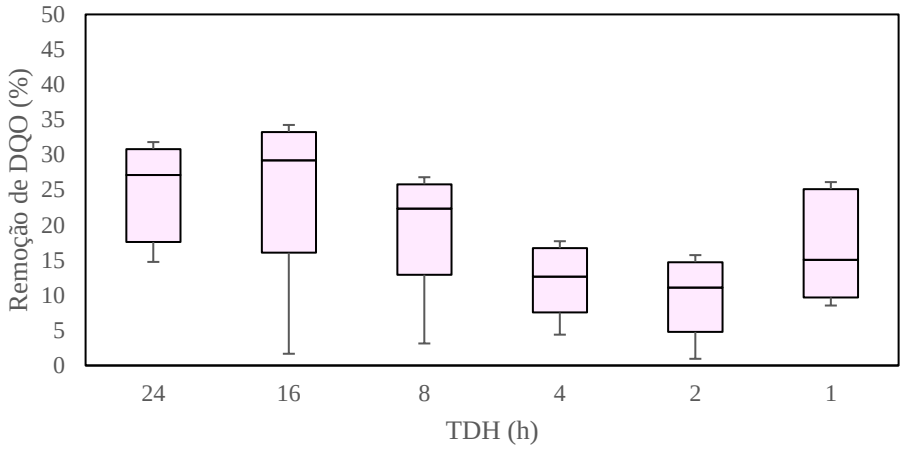
Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

Os valores obtidos para remoção da DQO nos três reatores acidogênicos são esperados, já que ocorre a conversão incompleta da matéria orgânica no processo de fermentação escura,

ou seja, apenas dos açúcares, com produção de biogás composto, principalmente, por gás carbônico e/ou hidrogênio, além de metabólitos solúveis (ácidos e álcoois).

No EGSB-10 a maior remoção de DQO ocorreu no TDH de 24 h (26,04 ± 9,35 %), sofrendo redução até o TDH de 2 h, em que foi obtido o menor valor de remoção de DQO (10,36 ± 6,72 %). No TDH de 1 h a remoção tornou a elevar-se, chegando a 18,64 ± 10,96 %. A menor discrepância entre os valores de remoção de DQO ocorreu no TDH de 4 h, como evidenciado na figura 5.4. Os outros TDH (24, 16, 8, 2 e 1 h) mostraram-se influenciados pela presença de valores extremos, indicando que a média não foi representativa, ou seja, ocorreram oscilações dentro da própria fase.

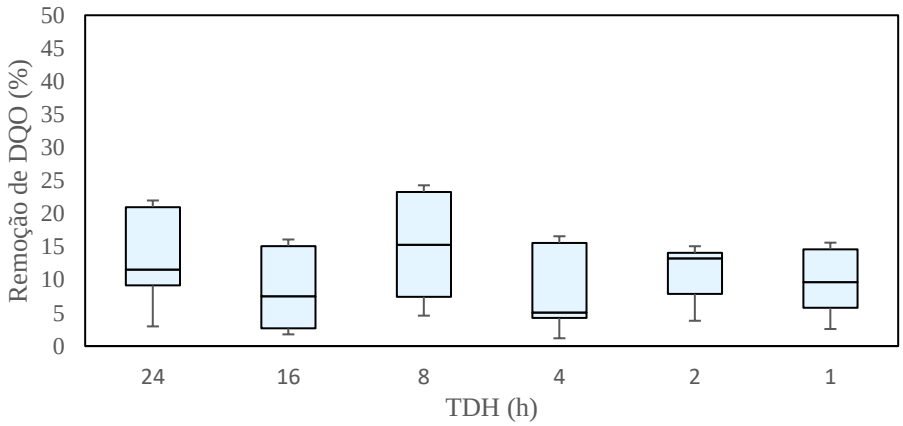
Figura 5.4 - Boxplot da remoção de DQO em EGSB-10.



Fonte: Elaborado pela Autora (2018)

No EGSB-20 o valor mínimo obtido na remoção foi de 8,43 ± 7,45 % no TDH de 16 h, enquanto o maior foi 16,39 ± 8,86 % no TDH de 24 h. Assim como no EGSB-10, a média sofreu influência de valores extremos, havendo maior constância no TDH de 1 h.

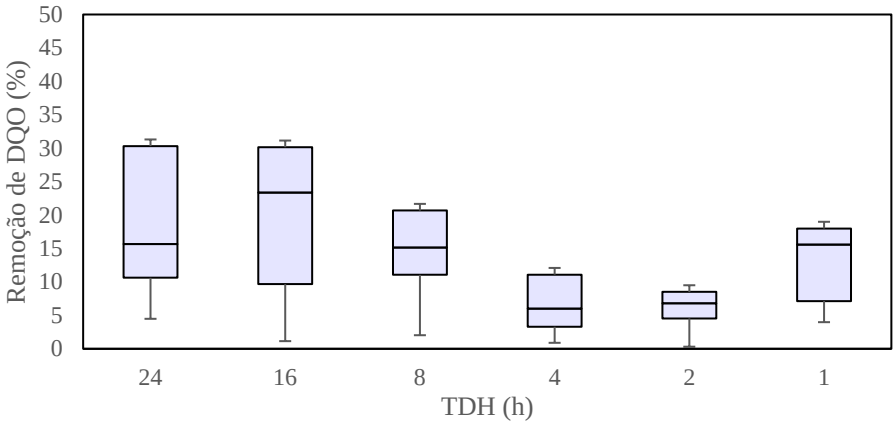
Figura 5.5 – Boxplot da remoção de DQO em EGSB-20.



Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

Já no EGSB-30 a variação foi de 6,47 ± 8,98 % a 20,21 ± 17,68 %, sendo o valor mínimo obtido no TDH de 4 h e o máximo em 16 h. A menor variação ocorreu no TDH de 2 h, enquanto a maior foi no TDH de 16 h, como pode ser visualizado na figura 5.6.

Figura 5.6 - Boxplot da remoção de DQO em EGSB-30.



Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

Conforme a Tabela 5.2, os três reatores EGSB não seguiram uma tendência na remoção de DQO com a redução do TDH e consequente elevação da carga orgânica, havendo oscilações entre as fases. As figuras 5.4, 5.5 e 5.6 e os desvios padrão dos valores da tabela 5.2 mostram que houve grande discrepância entre os valores obtidos nas próprias fases, com presença de valores extremos.

Resultados semelhantes aos obtidos no presente estudo foram observados em outros sistemas acidogênicos com vinhaça de cana-de-açúcar em diferentes concentrações afluentes. Santos et al. (2014b) operando dois RALF termofílico (55° C) em concentrações de 10 e 30 g DQO L^{-1}, relataram remoções de DQO entre 8,5% e 13,6% e 10,0% e 11,5%, respectivamente. Em ambos os reatores a maior remoção de DQO ocorreu no TDH de 4 h.

Já Rego (2016), operando RALF em faixa mesofílica com 5 g DQO L^{-1}, relatou estabilidade na remoção de DQO, permanecendo entre 12 e 13% nos TDH de 6 e 1 h. Somente no TDH de 8 h houve remoção de DQO mais elevada (23%).

Ferraz Junior et al. (2015b) obteve resultados mais expressivos de remoção de DQO utilizando APBR (55° C) com vinhaça pura (36,2 g DQO L^{-1}) e TCO fixa de 84,2 kg DQO m^3 d^{-1}, relatou remoção de DQO média de 31,3% durante a operação.

Devido à elevada concentração de matéria orgânica verificada no efluente dos reatores EGSB acidogênicos de vinhaça, uma alternativa para melhor aproveitamento da vinhaça acidificada é a produção contínua de bioenergia em reatores em série (reator acidogênico seguido por reator metanogênico). A aplicação de um processo de dois estágios, com a produção de ácidos orgânicos voláteis em fase acidogênica, proporciona a oportunidade de produzir compostos naturais com alto valor agregado, além de maximizar a recuperação de energia a partir de substratos complexos (CAVINATO et al., 2017).

5.3. INFLUÊNCIA DO pH

Os valores médios de pH verificados nas amostras afluentes e efluentes nos três reatores utilizados nesse estudo com a variação do TDH estão dispostos na Tabela 5.3. O pH afluente foi controlado em torno de 5 com a adição de NaOH 6M (240 g L^{-1}), enquanto o pH efluente manteve-se aproximadamente constante e entre 4,4 e 4,8, faixa de operação estabelecida para a pesquisa. As figuras 5.7 a), b) e c) ilustram a variação do pH com a redução do TDH e aumento da TCO, indicando pouca flutuação nos valores medidos.

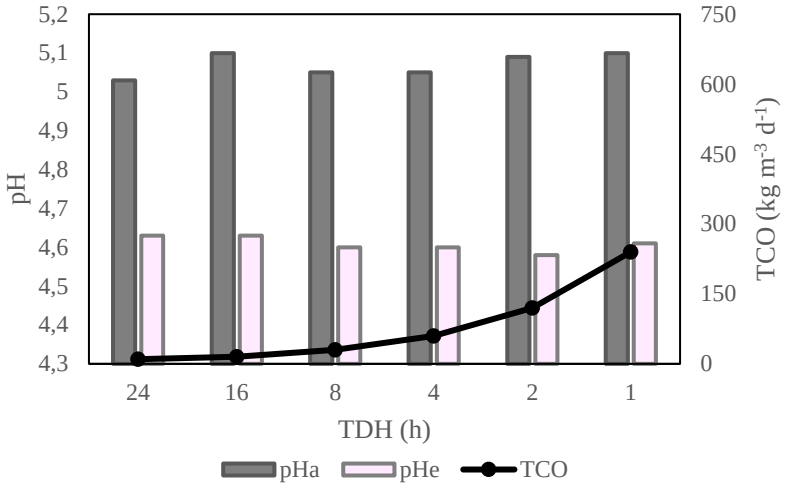
Tabela 5.3 - Valores médios de pH afluente e efluente em função do tempo de detenção hidráulica aplicado aos reatores EGSB operados em diferentes concentrações afluentes.

EGSB-10			
Fase	**TDH (h)**	**pH_{aflu}**	**pH_{eflu}**
1	24	5,03 ± 0,06$^{(27)}$	4,63 ± 0,08$^{(27)}$
2	16	5,10 ± 0,13$^{(38)}$	4,63 ± 0,09$^{(38)}$
3	8	5,05 ± 0,13$^{(35)}$	4,60 ± 0,08$^{(35)}$
4	4	5,05 ± 0,12$^{(33)}$	4,60 ± 0,09$^{(33)}$
5	2	5,09 ± 0,12$^{(44)}$	4,58 ± 0,08$^{(44)}$
6	1	5,10 ± 0,15$^{(13)}$	4,61 ± 0,24$^{(13)}$
EGSB-20			
Fase	**TDH (h)**	**pH_{aflu}**	**pH_{eflu}**
1	24	5,00 ± 0,05$^{(27)}$	4,69 ± 0,09$^{(27)}$
2	16	5,05 ± 0,10$^{(38)}$	4,71 ± 0,11$^{(38)}$
3	8	5,03 ± 0,12$^{(35)}$	4,73 ± 0,09$^{(35)}$
4	4	5,00 ± 0,11$^{(33)}$	4,70 ± 0,08$^{(33)}$
5	2	5,04 ± 0,13$^{(44)}$	4,61 ± 0,08$^{(44)}$
6	1	5,08 ± 0,12$^{(21)}$	4,60 ± 0,20$^{(21)}$
EGSB-30			
Fase	**TDH (h)**	**pH_{aflu}**	**pH_{eflu}**
1	24	5,00 ± 0,03$^{(27)}$	4,66 ± 0,07$^{(27)}$
2	16	5,05 ± 0,10$^{(38)}$	4,71 ± 0,11$^{(38)}$
3	8	5,01 ± 0,09$^{(67)}$	4,76 ± 0,10$^{(67)}$
4	4	5,08 ± 0,12$^{(45)}$	4,61 ± 0,09$^{(45)}$
5	2	5,09 ± 0,11$^{(13)}$	4,59 ± 0,22$^{(13)}$
6	1	5,06 ± 0,08$^{(22)}$	4,59 ± 0,13$^{(22)}$

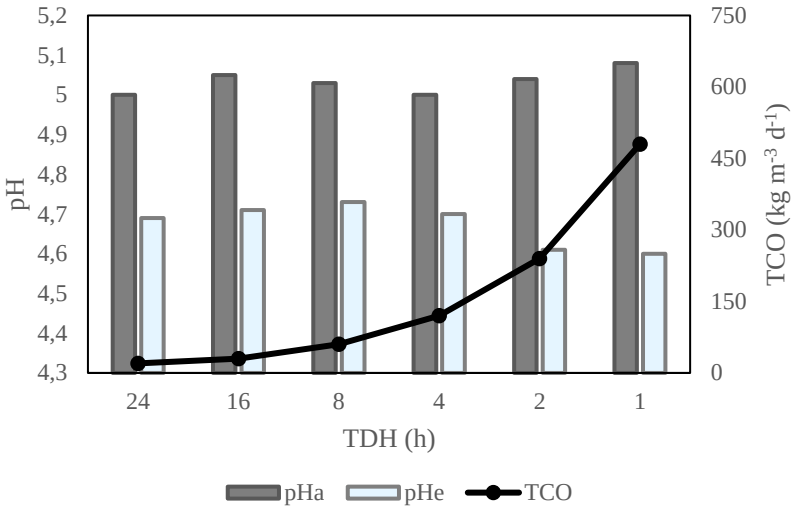
Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

Figura 5.7 - Variação do pH afluente e efluente em função do tempo de detenção hidráulica e da carga orgânica aplicada. a) EGSB-10; b) EGSB-20; c) EGSB-30.

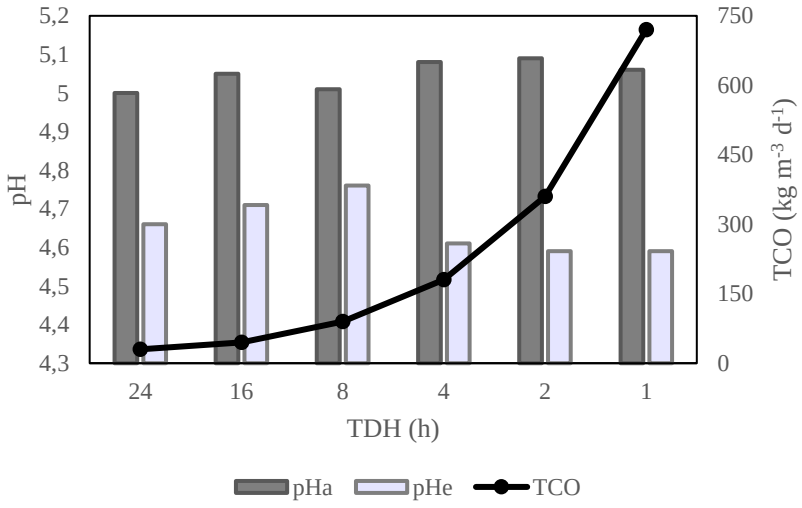
a)



b)



c)



Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

A definição do melhor pH para cada substrato é importante pois a formação de metabólitos solúveis é fortemente associada a esse parâmetro, sendo o seu papel, portanto, fundamental no processo fermentativo (WANG; ZHOW; LI, 2006; BUNDHOO; MOHEE, 2016). Sistemas acidogênicos caracterizados por variações de pH são vulneráveis à perda de performance devido a fatores que dependem do pH provido aos organismos, como as atividades de hidrogenases, rotas metabólicas e floculação celular, além de fenômenos de aderência (FUESS et al., 2016).

No caso da vinhaça, em alguns estudos realizados visando a produção de hidrogênio e metabólitos solúveis em RALF termofílicos (Santos et al., 2014a, 2014b; Ramos; 2016), o pH mantido em faixa inferior a 5 garantiu o direcionamento às rotas metabólicas desejadas à geração de hidrogênio (butírica e acética), além de ter promovido a inibição da metanogênese. No trabalho realizado por Santos et al. (2014a), o pH efluente foi mantido em 4,1, enquanto Santos et al. (2014c) controlaram o pH efluente entre 4,2 e 4,6. Já Ramos (2016) definiu como faixa ideal entre 4,55 e 4,95.

No presente estudo, o pH abaixo de 5 inibiu a metanogênese nos três reatores, porém não ocorreu a produção de hidrogênio durante a operação do EGSB-10, conforme será visto em itens posteriores. Nesse caso, a ocorrência de homoacetogênese aliada ao baixo pH pode ter influenciado negativamente no processo fermentativo. Rego (2016), operando RALF mesofílico, também atribuiu a ausência de hidrogênio na composição do gás à elevada produção de ácido acético por esse processo, visto que o reator operado em pH efluente entre 4,5 e 5 com concentração afluente de vinhaça de 5 g DQO L^{-1} não exibiu produção de hidrogênio.

5.4. SÓLIDOS SUSPENSOS

Os valores médios de sólidos suspensos totais (SST), sólidos suspensos voláteis (SSV) e sólidos suspensos fixos (SSF) medidos são apresentados na tabela 5.4. O valor de SST foi crescente com o aumento da concentração (10, 20 e 30 g L^{-1} em EGSB-10, EGSB-20 e EGSB-30, respectivamente), com variações em cada reator com os TDH aplicados. A maior parte dos sólidos suspensos contidos no efluente dos reatores EGSB foi representada por SSV, variando entre 80,7 e 93,0% no EGSB-10, 76,1 e 89,6% no EGSB-20 e 74,8 e 91,1% no EGSB-30.

Tabela 5.4 – Concentrações de SST, SSF e SSV em função dos tempos de detenção hidráulica aplicados em EGSB-10, EGSB-20 e EGSB-30.

Fase	TDH (h)	SST (mg L^{-1})	SSV (mg L^{-1})	SSF (mg L^{-1})	SSV (%)	SSF (%)
EGSB-10						
1	24	402 ± 145$^{(5)}$	330 ± 91$^{(5)}$	73 ± 15$^{(5)}$	82,0	18,1
2	16	514 ± 190$^{(5)}$	419 ± 162$^{(5)}$	96 ± 29$^{(5)}$	81,4	18,7
3	8	595 ± 106$^{(7)}$	480 ± 83$^{(7)}$	115 ± 31$^{(7)}$	80,7	19,3
4	4	399 ± 112$^{(5)}$	321 ± 103$^{(5)}$	78 ± 23$^{(5)}$	80,5	19,5
5	2	563 ± 121$^{(6)}$	511 ± 131$^{(6)}$	52 ± 22$^{(6)}$	90,8	9,2
6	1	813 ± 135$^{(5)}$	755 ± 114$^{(5)}$	57 ± 26$^{(5)}$	93,0	7,0
EGSB-20						
1	24	1005 ± 202$^{(6)}$	815 ± 192 $^{(6)}$	190 ± 73$^{(6)}$	81,1	18,9
2	16	872 ± 168$^{(7)}$	696 ± 140$^{(7)}$	177 ± 37$^{(7)}$	79,8	20,3
3	8	1211 ± 220$^{(8)}$	952 ± 189$^{(8)}$	258 ± 61$^{(8)}$	78,6	21,3
4	4	782 ± 235$^{(6)}$	595 ± 198$^{(6)}$	187 ± 45$^{(6)}$	76,1	23,9
5	2	1443 ± 293$^{(5)}$	1134 ± 198$^{(5)}$	309 ± 113$^{(5)}$	78,6	21,4
6	1	1154 ± 138$^{(6)}$	1034 ± 146$^{(6)}$	120 ± 32$^{(6)}$	89,6	10,4
EGSB-30						
1	24	1331 ± 331$^{(7)}$	995 ± 267$^{(7)}$	335 ± 106$^{(7)}$	74,8	25,2
2	16	1957 ± 399$^{(7)}$	1487 ± 327$^{(7)}$	470 ± 153$^{(7)}$	76,0	24,0
3	8	1543 ± 266$^{(12)}$	1176 ± 214$^{(12)}$	367 ± 69$^{(12)}$	76,2	23,8
4	4	1320 ± 378$^{(7)}$	1098 ± 302$^{(7)}$	222 ± 105$^{(7)}$	83,2	16,8
5	2	3099 ± 665$^{(6)}$	2571 ± 648$^{(6)}$	528 ± 143$^{(6)}$	83,0	17,0
6	1	2145 ± 504$^{(6)}$	1954 ± 500 $^{(6)}$	191 ± 25$^{(6)}$	91,1	8,9

SST: Sólidos Suspensos Totais; SSF: sólidos suspensos fixos; SSV: sólidos suspensos voláteis. Os valores entre parênteses referem-se ao número de amostras utilizado no cálculo da média.

Fonte: elaborado pela Autora (2018).

No contexto da produção fermentativa de hidrogênio, a elevada concentração de sólidos suspensos presente na vinhaça pode inviabilizar o processo, visto que será necessário maior tempo de contato para hidrolisar as moléculas de carboidrato (NASR, 2011). As concentrações excessivas de sólidos no reator promovem escassez de substrato aos microrganismos e estimulam as bactérias homoacetogênicas a consumirem hidrogênio molecular, além de elevarem as pressões parciais de hidrogênio, levando a mudanças de rotas metabólicas desfavoráveis no contexto da produção de hidrogênio (FUESS et al., 2016). As concentrações

de SST, SSF e SSV foram bastante alteradas entre as fases de operação dos reatores EGSB; no entanto, o conteúdo orgânico presente no afluente e efluente manteve-se predominante. O SSV é utilizado na determinação do fluxo de biomassa microbiana no reator. Dessa forma, os percentuais de SSV em relação aos SST medidos nos três reatores podem indicar a ocorrência de lavagem da biomassa, especialmente nos TDH inferiores (2 e 1 h), que apresentaram os valores máximos obtidos para SSV. Por outro lado, a vinhaça de cana-de-açúcar já possui, em sua constituição, elevado teor de SSV. Conforme exposto na Tabela 4.2 do item 4.3, a concentração de SSV na vinhaça pura correspondeu a 81,6% dos SST.

Santos et al. (2014b), utilizando RALF (55° C) na mesma concentração do EGSB-10 e EGSB-30, obtiveram valores de SSV entre 221 e 378 mg L^{-1} e 851 e 1485 mg L^{-1}, respectivamente. Os valores inferiores ao presente estudo podem ser devido a diferenças na composição do substrato pois alterações no processamento, composição do mosto, período da safra, dentre outros fatores, influenciam na geração de vinhaças com diferentes composições.

Santos et al. (2014c) operaram RALF termofílico na mesma concentração do EGSB-20, e obtiveram 88% dos SST no efluente na forma de SSV. Com o aumento da carga orgânica aplicada (em torno de 480 kg DQO m^{-3} d^{-1}), os sólidos suspensos foram mantidos no sistema, e consequentemente não detectados no efluente. No presente estudo ocorreu redução nos SST nos reatores EGSB-20 e EGSB-30 entre o TDH de 2 h e 1 h, indicando que houve acúmulo de biomassa em baixos TDH nesses reatores.

5.5. METABÓLITOS SOLÚVEIS PRODUZIDOS

As interferências na produção de hidrogênio podem ser atribuídas a vários parâmetros que podem inibir o processo, resultando em baixos rendimentos. A quantificação dos metabólitos solúveis produzidos nos reatores justifica as rotas metabólicas percorridas nas condições analisadas, bem como a predominância de determinados microrganismos em detrimento a outros, bem como mecanismos de inibição e toxicidade.

Devido à vinhaça ser um substrato complexo e sua composição sofrer mudanças sazonais e de procedimentos operacionais do processamento do açúcar e álcool, entender as interações microbianas que ocorrem nos sistemas torna-se um importante passo à otimização do processo fermentativo, além de possibilitar viabilização em escala real. Neste item serão discutidas a distribuição dos metabólitos produzidos em cada reator e quantificação, a fim de

analisar o comportamento dadas as concentrações de vinhaça aplicadas em EGSB-10, EGSB-20 e EGSB-30, com consequentes diferenciações nas taxas de carregamento orgânico.

5.5.1. Reator EGSB de vinhaça com concentração afluente de vinhaça de 10 g DQO L^{-1} (EGSB-10)

Na tabela 5.5 são dispostas as concentrações dos metabólitos obtidos em cada fase operacional do EGSB-10, além do percentual molar. Os metabólitos produzidos em maiores concentrações foram os ácidos acético (HAc), propiônico (HPr) e butírico (HBu). Outros metabólitos foram detectados em menores concentrações, sendo esses: ácido isobutírico (HIsoBu), ácido valérico (HVa), ácido isovalérico (HIsoVa), ácido capróico (HCa), ácido succínico (HSu), ácido lático (HLa) e etanol (EtOH). Os ácidos acético, propiônico e butírico foram os principais ácidos produzidos, sendo o ácido acético predominante.

Entre os TDH de 24 e 4 h houve pouca variação na composição e no percentual molar de cada metabólito produzido. Além disso, não ocorreram grandes oscilações no percentual molar do HAc e do HPr durante toda a operação, permanecendo entre 39,5 e 52,7% e 29,0 e 35,8%, respectivamente. Assim, é possível ver que o HAc foi o principal metabólito produzido durante a operação, seguido pelo HPr. A maior concentração de ambos os ácidos foi no TDH de 1 h, sendo 1329,6 ± 347,5 mg L^{-1} de HPr e 1471,0 ± 461,79 mg L^{-1} de HAc.

O HBu variou pouco entre os TDH de 24 e 2 h, ficando entre 6,4 e 12,2% do percentual molar. No TDH de 1 h ocorreu grande elevação na sua concentração, representando 23,9% dos metabólitos (1306,0 ± 347,5 mg L^{-1}). Já o HVa, presente em quase todas as fases operacionais do EGSB-10 (exceto no TDH de 1 h), constituiu uma pequena fração dos metabólitos, variando entre 74,4 ± 5,9 mg L^{-1} (2,2%) no TDH de 4 h e 230,8 ± 29,9 mg L^{-1} (5,25%) no TDH de 2 h.

Outros metabólitos foram produzidos somente em fases específicas, não exercendo grande influência sobre o processo fermentativo global. HIsoBu foi produzido somente nos TDH de 24 e 16 h, com percentuais molares de 3,6 e 10,6%, respectivamente. Concentrações reduzidas de HIsoVa e HCa foram obtidas no TDH de 2 h, correspondendo respectivamente 3,4% e 1,8%. Já HSu (1,1%) e HLa (6,4%) foram detectados somente no TDH de 1 h.

A detecção de EtOH ocorreu somente no TDH de 4 h, possivelmente devido ao etanol residual presente na vinhaça afluente, visto que nos reatores EGSB-20 e EGSB-30 também foram detectadas concentrações desse álcool em operação concomitante (TDH de 4 e 8 h, respectivamente).

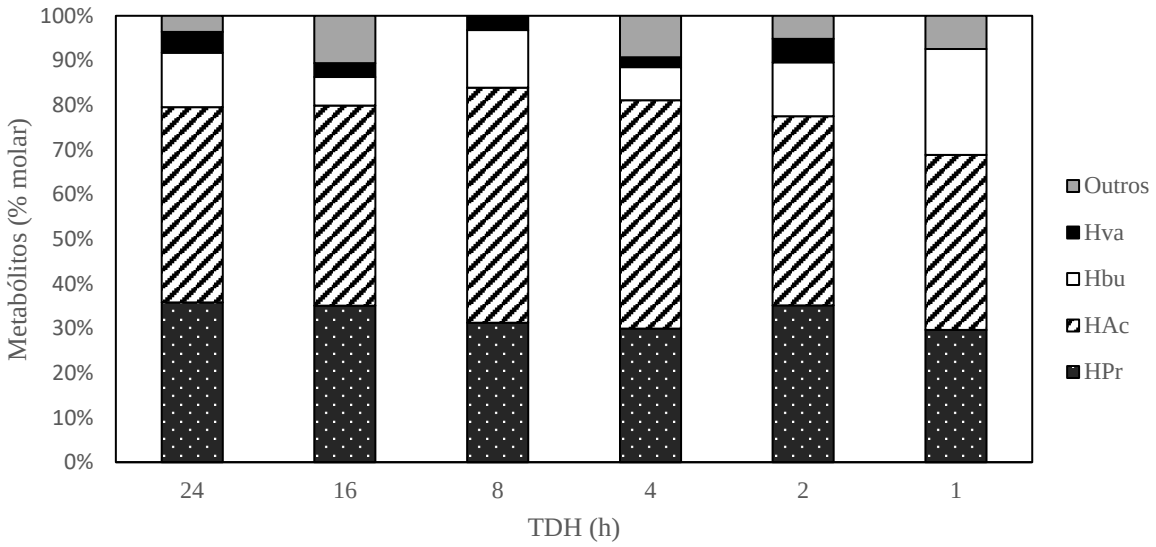
Tabela 5.5 - Concentração (g L^{-1}) e fração molar (%) dos metabólitos detectados durante a operação do EGSB-10.

	Metabólitos	TDH (h)					
		24	**16**	**8**	**4**	**2**	**1**
mg L^{-1}	HPr	743,1 ± 154,2$^{(8)}$	902,3 ± 71,9$^{(8)}$	792,8 ± 121,7$^{(6)}$	718,3 ± 79,4$^{(6)}$	1121,7 ± 124,6$^{(6)}$	1329,6 ± 192,9$^{(5)}$
%		35,8	35,1	31,3	29,9	35,2	29,0
mg L^{-1}	HAc	737,1 ± 110,4$^{(7)}$	936,5 ± 133,1$^{(8)}$	1083,3 ± 390,0$^{(7)}$	995,8 ± 173,1$^{(6)}$	1096,4 ± 430,7$^{(5)}$	1471,0 ± 461,79$^{(4)}$
%		43,8	44,9	52,7	51,1	42,4	39,5
mg L^{-1}	HIsoBu	90,0 ± 23,6$^{(8)}$	325,0 ± 130,5$^{(4)}$	ND	ND	ND	ND
%		3,6	10,6				
mg L^{-1}	HBu	301,5 ± 31,5$^{(8)}$	194,7 ± 26,5$^{(8)}$	388,9 ± 54,4$^{(7)}$	212,3 ± 41,1$^{(4)}$	457,3 ± 43,1$^{(4)}$	1306,0 ± 347,5$^{(4)}$
%		12,2	6,4	12,9	7,4	12,1	23,9
mg L^{-1}	HVa	133,8 ± 10,5$^{(8)}$	108,1 ± 19,3$^{(8)}$	110,7 ± 11,6$^{(6)}$	74,4 ± 5,9$^{(5)}$	230,8 ± 29,9$^{(5)}$	ND
%		4,7	3,1	3,2	2,2	5,25	
mg L^{-1}	HIsoVa	ND	ND	ND	ND	148,9 ± 20,2$^{(8)}$	ND
%						3,4	
mg L^{-1}	HCa	ND	ND	ND	ND	87,3 ± 10,6$^{(4)}$	ND
%						1,8	
mg L^{-1}	HSu	ND	ND	ND	ND	ND	83,8 ± 16,7$^{(4)}$
%							1,1
mg L^{-1}	EtOH	ND	ND	ND	139,7 ± 92,6$^{(3)}$	ND	ND
%					9,3		
mg L^{-1}	HLa	ND	ND	ND	ND	ND	359,0 ± 18,3$^{(4)}$
%							6,4

HPr: ácido propiônico; HAc: ácido acético; HIsoBu: ácido isobutírico; HBu: ácido butírico; HVa: ácido valérico; HIsoVa: ácido isovalérico; HCa: ácido capróico; HSu: ácido succínico; EtOH: etanol; HLa: ácido lático.

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

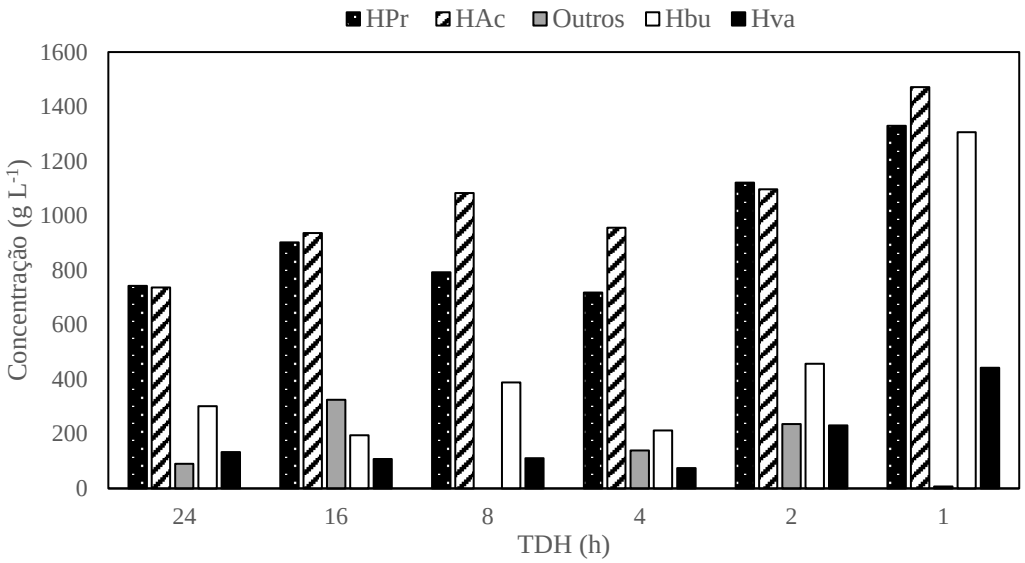
Figura 5.8 – Distribuição de metabólitos no EGSB-10 nas seis fases de operação.



Outros: EtOH + HLa + HSu + HCa + HIsoBu.

Fonte: elaborado pela Autora (2018).

Figura 5.9 – Concentrações de metabólitos solúveis produzidos no EGSB-10 em função do TDH.



Outros: EtOH + HLa + HSu + HCa + HIsoBu.

Fonte: elaborado pela Autora (2018).

Como é possível observar pela tabela 5.5 e figuras 5.8 e 5.9, o HAc predominou em todas as fases de operação. Conforme Bundhoo e Mohee (2016), apesar da formação de HAc como único produto final promover a geração teórica máxima de 4 mol H_2 mol^{-1} glicose

(segundo a equação 3.8), elevadas concentrações podem resultar em processo inibitório.

Embora o HAc tenha sido produzido em maiores concentrações (entre 737,1 e 1471 mg L^{-1}), não foi detectada a geração de hidrogênio durante todo o período operacional, fato que sugere que a sua formação ocorreu pela via homoacetogênica, com consumo de hidrogênio e/ou gás carbônico, como mostrado na Equação 3.20 proposta por Conrad e Wetter (1990) disposta a seguir, a qual consome 4 mols de hidrogênio na produção de 1 mol de HAc:

$$2CO_2 + 4H_2 \rightarrow CH_3COOH + 2H_2O \qquad (3.20)$$

Essa ocorrência é possível pois, de acordo com Oh et al. (2004); Saady (2013) e Zhou et al. (2018), o pré-tratamento térmico não remove homoacetogênicas formadoras de esporos e, portanto, não previne o consumo de hidrogênio e gás carbônico por esse grupo de microrganismos. As homoacetogênicas possuem habilidade de tolerar uma grande variedade de condições ambientais, como baixas temperaturas e ambientes ácidos, além de serem resistentes a altas pressões parciais de hidrogênio e utilizam o hidrogênio e o gás carbônico com mais agilidade que as acetogênicas. Por esse motivo, sob condições de estresse, inclusive o estresse imposto pelo pré-tratamento do inóculo, podem sobressair às acetogênicas. Segundo Hawkes et al. (2007), o enriquecimento de formadoras de esporo por tratamento térmico é mais comum, embora haja variações na metodologia.

Dessa forma, o aumento na produção de acetato não significa, necessariamente, geração de hidrogênio. Considerando a via da homoacetogênese, a contribuição de HBu com a geração de 2 mols de hidrogênio na sua formação não seriam suficientes (Equação 3.10), visto que mesmo no TDH de 1 h, em que houve um grande aumento na sua produção, o HPr seria responsável pelo consumo de 2 mols de hidrogênio para cada 2 mols formados, como visualizado na Equação 3.13 reescrita a seguir:

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

Segundo o modelo elaborado por Arroj et al. (2008) e reformulado por Luo et al. (2011), é possível quantificar a produção de acetato com consumo de hidrogênio pela homoacetogênese pela equação 4.7. Como o modelo considera somente a presença dos ácidos HAc, HBu e HPr, presumindo que outros metabólitos não exercem contribuição significativa no processo

fermentativo, a sua aplicação justifica-se somente para o EGSB-10. Os resultados obtidos no teste de homoacetogênese são descritos na Tabela 5.6.

Tabela 5.6 - Teste de homoacetogênese para cada fase operacional do EGSB-10.

TDH	AC_{homo} (mmol L^{-1})	AC_{homo}/AC_{total} (%)
24	3,562	28,991
16	3,908	25,038
8	5,706	31,603
4	4,719	28,431
2	5,297	28,987
1	10,125	41,297

AC_{homo}: concentração de ácido acético formado por homoacetogênese; AC_{total}: concentração de ácido acético total produzido pelo reator.

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

Pela tabela 5.6, é possível observar que o processo de homoacetogênese ocorreu em todos os TDH, intensificando-se em 1 h, sendo que o acetato formado por essa via correspondeu a 41,3% do acetato total produzido pelo EGSB-10 (607,38 mg L^{-1}). Logo, mesmo com a elevação de HBu no TDH de 1 h, o qual passou a corresponder a 23,9% da composição molar, a produção de hidrogênio foi inviabilizada.

Utilizando a mesma configuração de reator (EGSB) em condição mesofílica (37℃), Abreu et al. (2007) também reportaram consumo de hidrogênio com formação crescente de HAc pelo processo de homoacetogênese a partir de glicose e arabinose, com concentração afluente de 5 gDQO L^{-1}, enquanto em temperaturas na faixa termofílica e hipertermofílica, também testadas pelos autores, não foi detectada homoacetogênese, já que as produções de hidrogênio se mantiveram crescentes e a conversão em acetato não foi significativa em ambas as temperaturas. Os resultados de Abreu et al. (2007) sugerem que a temperatura mesofílica proporcionou condição para desenvolvimento desses microrganismos, ao contrário das faixas termofílica e hipertermofílica.

Embora Abreu et al. (2007) somente tenha constatado homoacetogênese em temperatura mesofílica, há estudos que relatam o direcionamento para essa rota de formação de acetato mesmo em temperaturas superiores. Santos et al. (2014b), operando RALF termofílico com 10 g DQO L^{-1}, atribuíram a redução no rendimento de hidrogênio de 2,86 para 1,92 mmol H_2 g^{-1} DQO ao aumento da TCO, a qual ocasionou sobrecarga no sistema devido ao maior aporte de compostos inibitórios ao processo, além de mudança na rota metabólica para a produção de acetato via homoacetogênese. Mesmo com a ocorrência de homoacetogênese, o rendimento de

hidrogênio manteve-se elevado (1,92 mmol H_2 g^{-1} DQO) devido à preponderância dos ácidos butírico e lático nas concentrações de 1235 e 1280 mg L^{-1}, respectivamente.

Fazendo um paralelo com o EGSB-10, a concentração de HBu no TDH de 1 h foi de 1306 mg L^{-1}; no entanto, a concentração de HPr também foi elevada no mesmo TDH (1329 mg L^{-1}) no mesmo TDH. Além disso, como já mencionado, 607 mg L^{-1} (41,3%) corresponderam ao HAc gerado por homoacetogênese. Alguns fatores operacionais utilizados por Santos et al. (2014b) podem ter exercido influência positiva na distribuição de metabólitos, como a temperatura elevada e o inóculo já adaptado à vinhaça e à temperatura de operação.

É importante ressaltar que, embora não tenha havido detecção de hidrogênio no EGSB-10, o principal metabólito gerado, HAc, é considerado um *commodity* químico amplamente usado na síntese de polímeros, indústrias têxtil e na produção de alimentos (KIM et al., 2018).

5.5.2. Reator EGSB de vinhaça com concentração afluente de vinhaça de 20 g DQO L^{-1} (EGSB-20)

Durante a operação do EGSB-20, os principais metabólitos produzidos foram HPr, HAc e HBu, como disposto na Tabela 5.7 e Figura 5.10. O HPr foi o metabólito predominante nos TDH de 24, 16, 2 e 1 h (40,9%, 47,5%, 46,5% e 36,6%, respectivamente). Sua concentração mínima foi detectada no TDH de 4 h, correspondendo a 1222,8 ± 234,1 mg L^{-1}, enquanto a máxima foi detectada no TDH de 1 h (2876,0 ± 455,3 mg L^{-1}). Já nos TDH de 8 e 4 h o HAc foi o principal metabólito, correspondendo respectivamente a 49,1% e 46,9%, sendo a maior concentração obtida no TDH de 4 h (1735,3 ± 325,1 mg L^{-1}).

Assim, entre os TDH de 24 e 2 h, o HPr e o HAc corresponderam a mais de 70% da composição molar do efluente. Nos TDH em que o HPr foi elevado, o HAc diminuiu, sendo o contrário válido. Esse comportamento também foi observado por Fuess et al. (2016) que, operando APBR (55 °C) com vinhaça pura na concentração de 28,3 g DQO L^{-1} e TDH fixo em 7,5 h (TCO de 84,2 kg DQO m^{-3} d^{-1}), observou redução de HAc e HBu, cujas rotas metabólicas levam à produção de hidrogênio, ao mesmo passo em que ocorreu aumento significativo de HPr. Segundo os autores, o aumento da proporção de HPr no biogás pode estar relacionada à inibição da rota fermentativa do HAc, visto que a concentração de HPr manteve-se aproximadamente constante (entre 686 e 721 mg L^{-1}) e a atividade hidrogenotrófica foi reduzida.

Menores concentrações de HBu foram detectadas - entre 512,5 ± 62,2 mg L^{-1} (TDH de 16 h) e 810,8 ± 157,3 mg L^{-1} (TDH de 8 h), correspondendo a 10,1 e 16,9% dos metabólitos, respectivamente. Outros metabólitos foram detectados em menores quantidades e em TDH específicos, exercendo pouca influência no processo fermentativo. Foram esses o HVa, produzido entre os TDH de 24 e 2 h, sendo nessas duas fases sua produção mais acentuada (5,59 e 8,9%, respectivamente); HCa, produzido nos TDH de 24, 16, 4 e 2 h e correspondendo a apenas 1,18 a 1,5%; HIsoBu, produzido nos TDH de 24 e 16 h, sendo 2,1 e 1,5%, respectivamente e HIsoVa, produzido somente no TDH de 2 h. O EtOH produzido no TDH de 4 h possivelmente possui relação com a elevada concentração desse metabólito na vinhaça afluente, como explicado no item 5.5.1 (Metabólitos no EGSB-10).

Vale ressaltar que, no TDH de 2 h, além da elevação do HPr, ocorreu maior produção maior de HVa e de HIsoVa, consumidores de hidrogênio na sua formação. Assim, somados, os três metabólitos corresponderam a 60% do total molar nesse TDH.

No TDH de 1 h, apesar do HPr ter sido obtido em maior concentração, foi detectado, conforme será melhor explicado no item 5.6.1, 10,64% de hidrogênio na composição do biogás, com PVH de 4,36 L d^{-1} L^{-1} e HY de 0,34 mmol H_2 g^{-1} DQO (ou 0,72 mol H_2 mol^{-1} hexose). Esse resultado sugere alterações nas rotas metabólicas, que direcionaram o processo fermentativo a produtos com formação de hidrogênio. O HLa foi produzido em concentração significativa (2335,6 ± 772,7 mg L^{-1}), com fração molar de 23,8%. É interessante notar também que a concentração de HBu quase triplicou nesse TDH (1686,4 ± 457,6 mg L^{-1}), somando 18% do percentual molar. Ocorreu ainda pequena produção de ácido fórmico (2,6%) e ácido succínico (2,2%). Somados, o HAc, HBu, HLa e HFo corresponderam a 63% dos metabólitos.

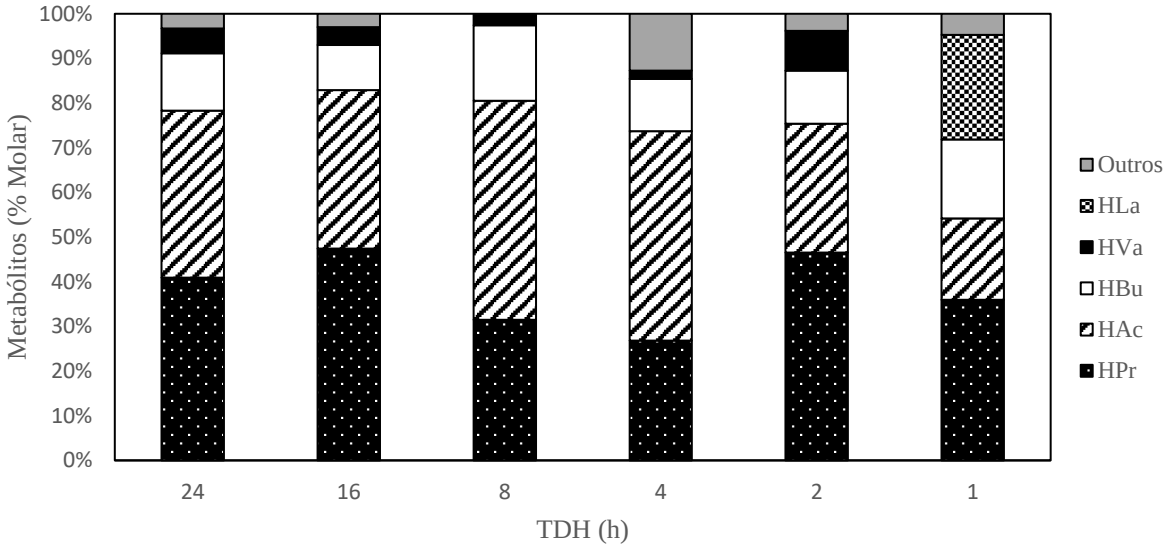
Tabela 5.7. Concentração (g L^{-1}) e fração molar (%) dos metabólitos detectados durante a operação do EGSB-20.

	Metabólitos	TDH (h)					
		24	**16**	**8**	**4**	**2**	**1**
mg L^{-1}	HPr	1856,5 ± 256,4$^{(8)}$	2025,4 ± 415,6$^{(8)}$	1270,0 ± 292,3$^{(6)}$	1222,8 ± 234,1$^{(8)}$	2200,1 ± 580,7$^{(8)}$	2876,0 ± 455,3$^{(8)}$
%		40,9	47,5	31,5	26,8	46,5	36,6
mg L^{-1}	HAc	1373,4 ± 323,3$^{(7)}$	1227,4 ± 252,9$^{(8)}$	1604,9 ± 257,8$^{(7)}$	1735,3 ± 325,1$^{(8)}$	1105,1 ± 153,5$^{(8)}$	1180,5 ± 136,8$^{(8)}$
%		37,4	35,5	49,1	46,9	28,8	18,5
mg L^{-1}	HIsoBu	113,7 ± 20,6$^{(6)}$	74,6 ± 16,7$^{(5)}$	ND	ND	ND	ND
%		2,1	1,5				
mg L^{-1}	HBu	689,9 ± 85,1$^{(8)}$	512,5 ± 62,2$^{(8)}$	810,8 ± 157,3$^{(5)}$	632,5 ± 99,0$^{(4)}$	671,0 ± 85,5$^{(6)}$	1686,4 ± 457,6$^{(7)}$
%		12,8	10,1	16,9	11,7	11,9	18,0
mg L^{-1}	HVa	349,3 ± 5,6$^{(8)}$	232,9 ± 37,0$^{(8)}$	142,0 ± 43,3$^{(4)}$	117,0 ± 14,0$^{(4)}$	578,6 ± 206,7$^{(5)}$	ND
%		5,59	4,0	2,6	1,9	8,9	
mg L^{-1}	HIsoVa	ND	ND	ND	ND	165,4 ± 48,1$^{(5)}$	ND
%						2,5	
mg L^{-1}	HCa	84,1 ± 21,3$^{(8)}$	101,9 ± 34,2$^{(7)}$	ND	109,7 ± 26,7$^{(4)}$	93,6 ± 16,5$^{(5)}$	ND
%		1,18	1,5		1,5	1,3	
mg L^{-1}	HFo	ND	ND	ND	ND	ND	132,4 ± 21,1$^{(7)}$
%							2,6
mg L^{-1}	HSu	ND	ND	ND	ND	ND	282,0 ± 104,3$^{(4)}$
%							2,2
mg L^{-1}	EtOH	ND	ND	ND	318,4 ± 96,1$^{(5)}$	ND	ND
%					11,2		
mg L^{-1}	HLa	ND	ND	ND	ND	ND	2335,6 ± 772,7$^{(5)}$
%							23,8

HPr: ácido propiônico; HAc: ácido acético; HIsoBu: ácido isobutírico; HBu: ácido butírico; HVa: ácido valérico; HIsoVa: ácido isovalérico; HCa: ácido capróico; HFo: ácido fórmico; HSu: ácido succínico; EtOH: etanol; HLa: ácido lático.

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

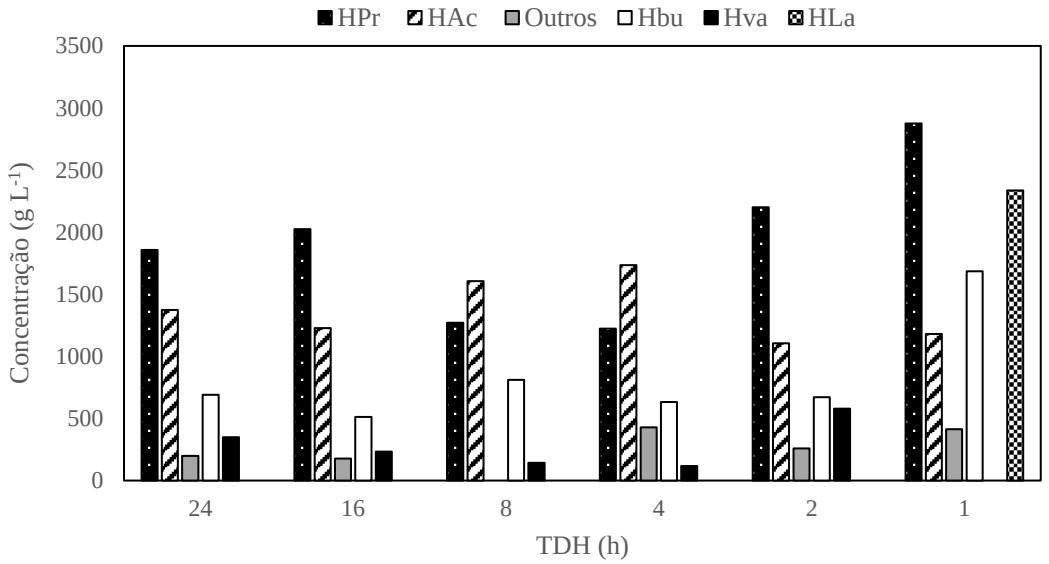
Figura 5.10 – Distribuição de metabólitos no EGSB-20 nas seis fases de operação.



Outros: HIsoBu + EtOH + HIsoVa + HCa + HSu +HFo

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

Figura 5.11 – Concentrações de metabólitos solúveis produzidos no EGSB-20 em função do TDH.



Outros: HIsoBu + EtOH + HIsoVa + HCa + HSu +HFo

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

A formação de 2 mols de HPr (conforme Equação 13 do item 3.3.3.1) a partir da glicose promove o consumo direto de 2 mols de hidrogênio ou utiliza NADH disponível (ZHANG et

al., 2007; AGLER et al., 2011; BUNDHOO; MOHEE, 2016). Além da formação direta a partir da glicose, é possível a contribuição da reação secundária e termodinamicamente favorável de produção do propionato a partir do lactato presente na vinhaça afluente; essa reação é típica de alguns produtores do gênero *Clostridium (Clostridium propionicum* e *Clostridium homopropionicum*), conforme a equação 3.14 disposta a seguir:

$$CH_3CHOHCOOH + H_2 \rightarrow CH_3CH_2COOH + H_2O \qquad 3.14$$

O elevado percentual de HPr mesmo em maiores TDH (40,9% em 24 h e 47,5% em 16 h) pode indicar que as condições operacionais propiciaram essa rota secundária, já que o lactato é um intermediário na rota metabólica do propionato. Já no TDH de 1 h pode também ter havido influência do acúmulo de sólidos no reator, levando a alterações de rotas metabólicas para produção de compostos mais reduzidos (HBu e HPr), como será discutido no item 5.6.2 (Rendimento de hidrogênio).

Ainda assim, como observado no presente estudo, é possível a obtenção de hidrogênio mesmo com elevadas concentrações de HPr. Santos et al. (2014c) relataram concentrações de HPr entre 1236 e 4378 mg L^{-1} em reator alimentado com 15 g DQO L^{-1} (R15) e entre 1354 e 3557,6 mg L^{-1} em reator alimentado com 20 g DQO L^{-1} (R20). Apesar de ser o principal metabólito em quase todas as fases de operação dos reatores, o aumento da TCO proporcionou a PVH de 13,44 L d^{-1} L^{-1} no R15 e 17,04 L d^{-1} L^{-1} no R20. Isso ocorreu devido à diversificação de metabólitos no processo fermentativo, predominância de HBu, seguido por HIsoBu e HLa.

Ramos (2016), operando RALF termofílico (55℃) para geração de hidrogênio a partir da vinhaça com concentração afluente de 10 g DQO L^{-1} obteve a maior fração molar de HPr (17%) no TDH de 6 h, e mesmo assim obteve o segundo melhor rendimento de hidrogênio do estudo (1,52 mmol g^{-1} DQO).

Embora a formação de HPr não seja desejada concomitantemente à produção de hidrogênio por ser um fator inibitório, recentemente o interesse na produção desse ácido tem sido maior, devido ao seu alto valor agregado em aplicações industriais. O HPr usualmente é produzido pela indústria petroquímica e convertido à forma de sal (propionato de sódio, de cálcio ou de amônio) e pode ser utilizado na manufatura de herbicidas e intermediários químicos, além de preservativos para conservação de comida, de grãos e de alimentos para animais, síntese de vitamina E, dentre outros (ZHOU et al., 2018). Por isso, alguns estudos utilizando outros substratos atualmente se concentram na produção de HPr a partir do processo

fermentativo (DISHISHA et al., 2015; YANG et al., 2018). A produção de hidrogênio no TDH de 1 h, mesmo com a elevada concentração de HPr, se deve à diversificação das rotas metabólicas. Nesse TDH a concentração de HAc manteve-se estável em relação ao anterior, compondo 18,5% dos metabólitos; a concentração de HBu, no entanto, quase triplicou em relação ao anterior, chegando a 18% da composição molar. O HLa foi produzido em grande concentração também, correspondendo a 23,8%. Foi ainda produzido HFo em baixa concentração, correspondendo a 2,6%.

Como já abordado, a formação de 1 mol de HBu (Equação 3.10) é acompanhada pela geração de 2 mols de hidrogênio. Já a detecção do HLa pode ser devida à concentração desse metabólito já existente na vinhaça afluente, ou ter se dado pelas equações 3.15 (como único produto) ou 3.17 (concomitante à formação de ácido acético) transcritas a seguir:

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CHOHCOOH + CO_2 \qquad (3.15)$$

$$2C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CHOHCOOH + 3CH_3COOH + CO_2 \qquad (3.17)$$

Considerando no TDH de 1 h a redução no consumo de carboidrato para 65,06%, elevada concentração de sólidos suspensos totais (1154 mg L^{-1}) e o baixo valor de HY (0,34 mmol H_2 g^{-1} DQO) obtidos para o EGSB-20 (como descrito nos itens 5.1, 5.4 e 5.6.2, respectivamente), infere-se que as concentrações elevadas de sólidos podem ter promovido a escassez de substrato aos microrganismos, ocasionando, inclusive, baixo HY em relação a outros trabalhos que abordam a produção de hidrogênio com vinhaça de cana-de-açúcar. Dessa forma, a fermentação do HLa pode ter contribuído como rota alternativa às bactérias para obtenção de energia nessa condição de baixa disponibilidade de carboidrato, produzindo HAc, HPr e gás carbônico, conforme a equação 3.18 (BAGHCHEHSARAEE et al., 2009; FUESS et al., 2018):

$$3CH_3CHOHCOOH \rightarrow 2CH_3CH_2COOH + CH_3COOH + CO_2 + H_2O \qquad (3.18)$$

Outra estratégia metabólica possível para obtenção de energia em baixos níveis de carboidrato seria o uso de HLa e HAc como substratos para a produção de hidrogênio e gás carbônico (Equação 3.19) (BAGHCHEHSARAEE et al., 2009), sendo essa reação realizada pela espécie *Clostridium propionicum*:

$$CH_3COOH + 2CH_3CH_2COOH \rightarrow H_2 + 3/2CH_3(CH_2)_2COOH + CO_2 + H_2O \qquad (3.19)$$

Essa reação, somada à contribuição do HBu com 2 mols de hidrogênio por mol de ácido, além do HAc, que gera 4 mols de hidrogênio por mol de ácido produzido (Equação 3.8) explicaria a produção de hidrogênio no TDH de 1 h.

Alguns estudos apontam a influência positiva do HLa no processo fermentativo para produção de hidrogênio. Baghchehsaraee et al. (2009) testaram a adição de alguns metabólitos (EtOH, HLa, HBu e HAc) em batelada contendo amido e cultura mista e constataram que o HLa exerceu efeito positivo na produção de hidrogênio. Segundo os autores, concentrações de até 3000 mg L^{-1} de HLa desbalanceiam a conversão de piruvato em HLa, levando a um acúmulo de NADH. Com excesso de NADH a produção de hidrogênio é elevada, pois ocorre a reoxidação do NADH. A concentração de HLa obtida no TDH de 1 h no EGSB-20 foi de 2335,6 mg L^{-1}, portanto em concordância com o exposto por Baghchehsaraee et al. (2009).

Santos et al. (2014b) observaram efeito positivo da presença de HLa (entre 0,5 e 4 g L^{-1}) na produção de hidrogênio em RALF termofílicos com 10 e 30 g DQO L^{-1}. A diminuição do TDH no RALF com 10 g DQO L^{-1} foi acompanhada pela predominância de HLa (32,7%), com maior HY (2,86 mmol H_2 g^{-1} DQO) no TDH de 6 h, em que ocorreu a maior produção de HLa (1999 mg L^{-1}). Já no RALF com 30 g DQO L^{-1}, o percentual de HLa manteve-se entre 23,9 e 27,2% e o maior HY obtido foi 0,8 mmol H_2 g^{-1} DQO em 4 h.

5.5.3. Reator EGSB de vinhaça com concentração afluente de vinhaça de 30 g DQO L^{-1} (EGSB-30)

O principal metabólito produzido durante toda a operação foi o HPr, com predominância nos TDH de 16 h, 4 h, 2 h e 1 h. A concentração mínima de 2105,8 ± 159,6 mg L^{-1}, que representou 26,7% dos metabólitos, foi detectada no TDH de 8 h. Já a máxima ocorreu no TDH de 2 h (5662,5 ± 1399,8 mg L^{-1}) e foi equivalente a 41,2% da composição molar dos metabólitos. No TDH de 24 h o HAc permaneceu em concentração próxima à do HPr, enquanto no TDH de 8 h esse ácido predominou (3019,3 ± 577,4 mg L^{-1}), representando 47,2% da composição molar. Assim como no EGSB-20, em geral o HAc e o HPr exibiram comportamento contrário, ou seja, nas fases em que houve aumento de HPr, também ocorreu inibição na produção de HAc.

Já o HBu foi produzido em menores concentrações, atingindo o ápice no TDH de 2 h com 3197,0 ± 367,8 mg L^{-1} (19,5%). Em 1 h a produção manteve-se acentuada, equivalendo a 19,8% dos metabólitos. O HLa foi detectado entre os TDH de 8 e 1 h e sua produção aumentou significativamente nos TDH de 2 e 1 h, sendo sua contribuição de 20,7 (3467,8 ± 918,4 mg L^{-1}) e 25,4% (3206,8 ± 868,1 mg L^{-1}) na composição molar, respectivamente.

Outros ácidos foram produzidos em TDH específicos e menores concentrações, exercendo menor influência no processo fermentativo. Vale mencionar o HVa, cujas concentrações variaram entre 258,5 ± 110,9 e 730,3 ± 109,9 mg L^{-1}, o HSu, entre 81,3 ± 21,3 e 459,8 ± 47,5 mg L^{-1} e o HFo, entre 75,0 ± 19,2 e 133,0 ± 68,5 mg L^{-1}.

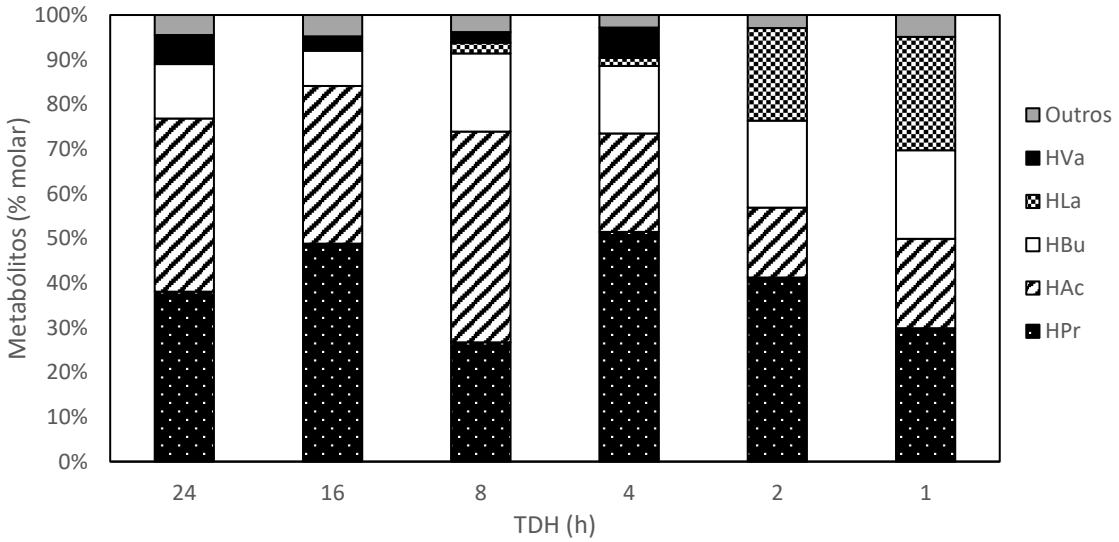
Tabela 5.8. Concentração (g L^{-1}) e fração molar (%) dos metabólitos detectados durante a operação do EGSB-30.

	Metabólitos	TDH (h)					
		24	**16**	**8**	**4**	**2**	**1**
mg L^{-1}	HPr	2672,4 ± 254,5$^{(7)}$	3758,1 ± 167,6$^{(8)}$	2105,8 ± 159,6$^{(9)}$	4013,7 ± 408,9$^{(6)}$	5662,5 ± 1399,8$^{(8)}$	3109,3 ± 524,0$^{(8)}$
%		38,1	48,8	26,7	51,4	41,2	29,9
mg L^{-1}	HAc	2202,4 ± 124,0$^{(5)}$	2199,3 ± 240,8$^{(6)}$	3019,3 ± 577,4$^{(8)}$	1393,9 ± 237,1$^{(7)}$	1739,0 ± 265,6$^{(6)}$	1683,9 ± 348,3$^{(8)}$
%		38,8	35,3	47,2	22	15,6	20,0
mg L^{-1}	HBu	1017,7 ± 132,4$^{(9)}$	721,0 ± 56,5$^{(7)}$	1639,3 ± 102,4$^{(6)}$	1397,8 ± 223,2$^{(5)}$	3197,0 ± 367,8$^{(5)}$	2447,8 ± 861,1$^{(4)}$
%		12,2	7,9	17,5	15,1	19,5	19,8
mg L^{-1}	HMa	ND	541,8 ± 211,0$^{(6)}$	ND	ND	ND	ND
%			3,9				
mg L^{-1}	HVa	623,6 ± 52,1$^{(9)}$	341,9 ± 120,7$^{(8)}$	258,5 ± 110,9$^{(6)}$	730,3 ± 109,9$^{(8)}$	ND	ND
%		6,5	3,2	2,4	6,8		
mg L^{-1}	HCa	228,0 ± 52,8$^{(7)}$	108,7 ± 18,4$^{(7)}$	ND	ND	ND	ND
%		2,1	0,9				
mg L^{-1}	HSu	81,3 ± 21,3$^{(4)}$	ND	ND	164,3 ± 49,3$^{(4)}$	267,4 ± 88,2$^{(5)}$	459,8 ± 47,5$^{(5)}$
%		0,7			1,3	1,2	2,8
mg L^{-1}	HIsoBu	139,0 ± 26,1$^{(7)}$	ND	ND	ND	ND	ND
%		1,7					
mg L^{-1}	EtOH	ND	ND	187,7 ± 71,0$^{(7)}$	ND	ND	ND
%				3,8			
mg L^{-1}	HLa	ND	ND	228,0 ± 66,2$^{(4)}$	172,3 ± 118,2$^{(4)}$	3467,8 ± 918,4$^{(6)}$	3206,8 ± 868,1$^{(6)}$
%				2,4	1,8	20,7	25,4
mg L^{-1}	HFo	ND	ND	ND	75,0 ± 19,2$^{(5)}$	147,8 ± 29,7$^{(5)}$	133,0 ± 68,5$^{(4)}$
%					1,5	1,7	2,1

HPr: ácido propiônico; HAc: ácido acético; HIsoBu: ácido isobutírico; HBu: ácido butírico; HVa: ácido valérico; HIsoVa: ácido isovalérico; HCa: ácido capróico; HSu: ácido succínico; EtOH: etanol; HLa: ácido lático; HFo: ácido fórmico. Os números em parênteses referem-se ao número de amostras utilizadas para cálculo da média.

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

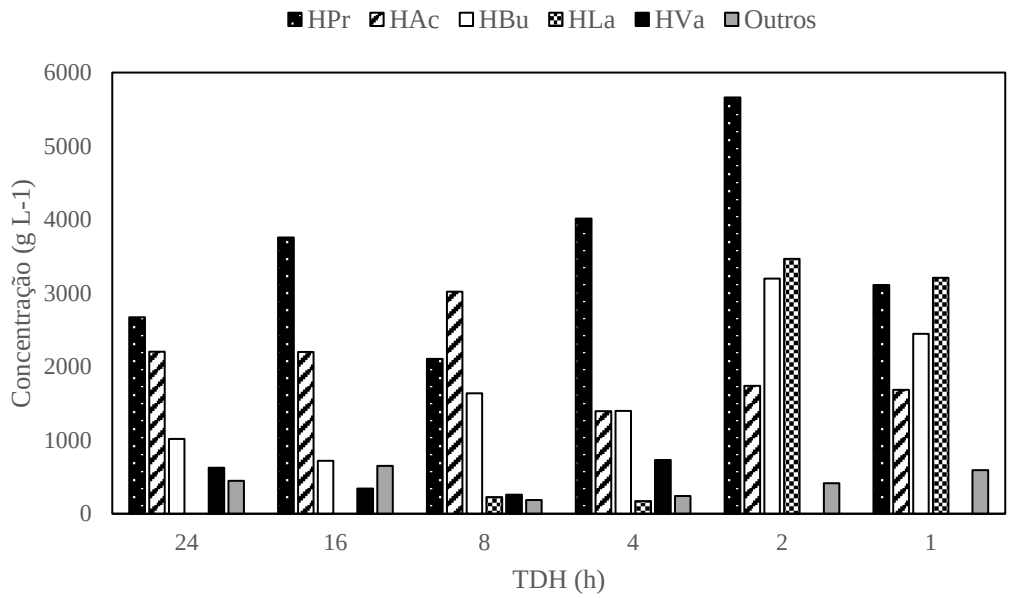
Figura 5.12 – Distribuição de metabólitos no EGSB-30 nas seis fases de operação.



Outros: HMa + HCa + HIsoBu + EtOH + HSu

Fonte: elaborado pela Autora (2018).

Figura 5.13 – Concentrações de metabólitos solúveis produzidos no EGSB-20 em função do TDH.



Outros: HMa + HCa + HIsoBu + EtOH + HSu

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

Uma explicação para a predominância de HPr e HAc entre os TDH de 24 e 4 h no EGSB-30 é, assim como ocorreu no EGSB-20, a fermentação do HLa existente na vinhaça afluente em HPr e HAc, conforme a equação 3.18 transcrita a seguir. É possível observar que, nesse processo, não há geração de hidrogênio, o que explicaria os percentuais elevados desses metabólitos na vinhaça e apenas detecção de gás carbônico no biogás entre os TDH de 24 e 4 h.

$$3CH_3CHOHCOOH \rightarrow 2CH_3CH_2COOH + CH_3COOH + CO_2 + H_2O \qquad (3.18)$$

Fuess et al. (2016), operando APBR (55℃) com vinhaça pura (36,2 g DQO L^{-1}), observaram a possível relação entre a elevada proporção de HPr e inibição da rota fermentativa do HAc, já que a concentração média do HPr permaneceu em 721 mg L^{-1}. A proporção HBu/HAc acima de 2 foi associada à predominância de HPr ao invés de HAc na vinhaça acidificada; logo, a rota fermentativa do HBu por si só não pôde manter níveis satisfatórios de hidrogênio. No presente trabalho, considerando a tabela 5.8 e as figuras 5.12 e 5.13, é possível perceber que, no EGSB-30, o HPr provavelmente inibiu a rota acética, visto que, com a elevação na sua proporção, o HAc foi reduzido. No entanto, considerando que a proporção HBu/HAc aumentou nos TDH de 2 e 1 h, foi impossível estabelecer sentido entre a proporção desses ácidos com a predominância de HPr, .

No EGSB-30, a partir do TDH de 2 h as mudanças nas rotas metabólicas propiciaram maior diversificação de metabólitos, com expressiva contribuição no processo fermentativo. Embora a concentração de HPr no TDH de 2 h tenha sido a maior obtida no estudo, representando 41,2% dos metabólitos produzidos, no TDH de 2 h o rendimento de hidrogênio foi de 0,33 ± 0,10 mmol H_2 g^{-1} DQO (1,11 ± 0,37 mol H_2 mol^{-1} hexose), como será reportado no item 5.6.2. Isso pode ter ocorrido devido à utilização de HLa já presente na vinhaça e também produzido *in situ* como fonte de carbono alternativa, contribuindo para a geração de hidrogênio com baixo rendimento, como ocorreu no EGSB-20. Somados, o HAc, HBu e HLa representaram 56% da composição molar; por isso, acredita-se que a produção desses ácidos tenha influenciado significativamente nos resultados positivos. Já no TDH de 1 h esses ácidos somaram 65% da fração molar, e foi obtida a maior PVH do estudo (8,77 ± 1,46 L d^{-1} L^{-1}).

Segundo Wang, Zhow e Li (2006), a formação de hidrogênio é catalisada por hidrogenase em condições anaeróbias, sendo, assim como a fermentação do propionato, uma rota metabólica para reduzir o acúmulo de NADH na fermentação anaeróbia. Uma vez que

NADH acumula, o que geralmente ocorre em situações de sobrecarga ou choque de carga, a fermentação tipo propiônica irá ser ativada espontaneamente para reduzir a concentração de NADH e manter uma taxa $NADH/NAD^+$ adequada. Essa, segundo os autores, pode ser a razão para muitos trabalhos obterem elevadas produções de hidrogênio, mesmo com grande acúmulo de ácido propiônico. Assim, a redução do TDH, com consequente elevação da TCO, pode ter proporcionado o acúmulo de NADH, levando à maior geração de HPr, visto que essa reação é termodinamicamente favorável.

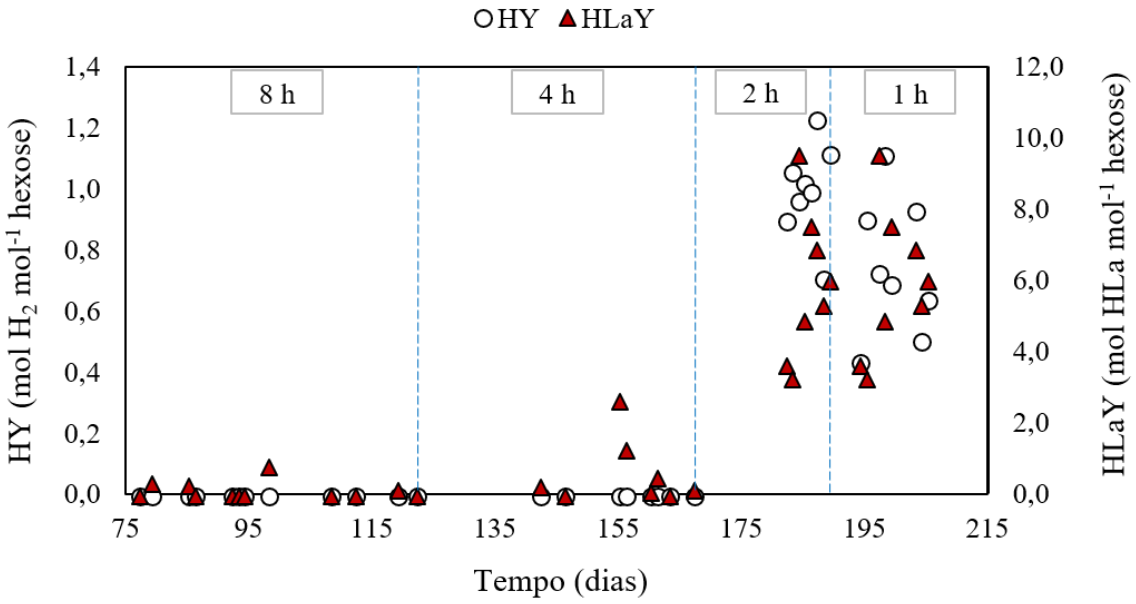
Para evitar o acúmulo de ácido propiônico e aumentar a geração de biohidrogênio, a separação em duas fases do processo anaeróbio é uma escolha mais adequada, visto que diferentes condições ótimas de operação podem ser aplicadas para a acidogênese e metanogênese separadamente.

As rotas metabólicas possíveis na formação de HLa foram demonstradas nas equações 3.15, 3.16 e 3.17. As bactérias produtoras de HLa são bastante tolerantes a condições ácidas e sua predominância em reatores alimentados com vinhaça de cana-de-açúcar se deve, principalmente, a eventos de contaminação no processo de fermentação do caldo de cana. Nas biorefinarias, podem sobreviver a baixas condições de pH, mesmo quando há a injeção de ácido sulfúrico para prevenção de contaminação (FUESS et al., 2018).

Pelo mecanismo já abordado no item 5.5.2 (metabólitos produzidos no EGSB-20), o HLa presente na vinhaça e também produzido *in situ* pode ter sido utilizado como fonte de carbono secundária nos TDH de 2 e 1 h no EGSB-30 (Equação 3.19). Pela figura 5.14 é possível observar que o aumento no rendimento de HLa produzido por mol de carboidrato consumido foi concomitante à geração de hidrogênio nos menores TDH de operação (2 e 1 h). Essa via, no entanto, promoveu menor rendimento na produção de hidrogênio em relação às vias do HAc e HBu, permanecendo entre 1,11 ± 0,37 e 0,76 ± 0,21 mmol H_2 mol^{-1} hexose.

Além de propiciar a produção de hidrogênio em condições específicas, o HLa possui importância para o setor industrial devido ao seu valor agregado, sendo largamente utilizado nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética, além de ser um monômero útil na produção de polímeros biodegradáveis na indústria química (AGLER et al., 2011)

Figura 5.14 - Relação entre rendimento de hidrogênio (HY) e rendimento na produção de ácido lático (HLaY) ao longo das fases de operação do EGSB-30.



Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

Santos et al. (2014a) associaram os efeitos positivos do HLa sobre a produção de hidrogênio e HBu a partir da vinhaça com 5 g DQO L^{-1} em condição termofílica (55℃), destacando o papel determinante do gênero *Lactobacillus* na transformação de HLa em HBu. Os autores associaram a geração de HLa, em concentrações entre 217,1 e 1357,7 mg L^{-1}, ao aumento na produção de hidrogênio, visto que, entre os TDH de 8 e 4 h, a mistura de glicose e vinhaça proporcionou os maiores níveis de HLa (24,7 a 30,9%, respectivamente), rendimento de hidrogênio (4,98 e 5,73 mmol H_2 g^{-1} DQO adicionada) e elevados percentuais. No TDH de 1 h, a diminuição desse metabólito para 7% da fração total foi relacionada à redução no rendimento de hidrogênio.

Vale mencionar também que a concentração de HBu elevou-se bastante nos TDH de 2 e 1 h, porém mantendo-se no mesmo percentual molar (19,5 e 19,8%, respectivamente) de TDH anteriores. O HBu possui diferentes e importantes aplicações comerciais, como a produção de fibras para a indústria têxtil, além de apresentar potencial para aplicação como matéria-prima na produção de butanol e produção de bioplásticos (SARMA et al., 2015).

Embora produzido em baixas concentrações nesse estudo e correspondendo somente a 1,5 a 2,1% do total molar, a possibilidade de produção de ácido fórmico a partir da fermentação da vinhaça se torna interessante, pois esse ácido é um líquido não tóxico e ambientalmente

benigno com baixa inflamabilidade em condições ambientais. O HFo tem algumas aplicações na indústria alimentícia, de cosméticos, toners, etc., além de possuir potencial para ser utilizado como um transportador de hidrogênio líquido, podendo ser aplicável em automóveis e aparelhos móveis (EPPINGER; HUANG, 2017). Em condições ácidas, o ácido fórmico é convertido em hidrogênio e gás carbônico para manter o pH da fermentação e reduzir a concentração de formato na célula (equações 3.1 e 3.2):

$$\text{Piruvato} + \text{CoA} \rightarrow \text{Acetil-CoA} + \text{Formato} \tag{3.1}$$

$$\text{Formato } (HCOO^-) + H^+ \rightarrow H_2 + CO_2 \tag{3.2}$$

Conforme será visto nos itens 5.6.2 e 5.6.3, apesar da PVH ter sido elevada entre os TDH de 2 e 1 h, o HY manteve-se aproximadamente constante. As grandes concentrações de ácidos orgânicos voláteis na vinhaça afluente e acidificada em TCO mais elevadas em TDH de 2 e 1 h (360 e 720 kg DQO m^{-3} d^{-1}) podem ter exercido grande influência nesse indicador de desempenho, inibindo a produção de hidrogênio. Segundo Wu, Yang e Guo (2010), altas concentrações de substrato são atraentes do ponto de vista da energia despendida no processo, já que minimizariam a energia necessária para processamento. No entanto, em altas com

centrações de substrato o processo pode sofrer inibição por substrato ou por produto (ácidos orgânicos voláteis).

Assim como no presente estudo, Santos et al. (2014b) observaram aumento na concentração de ácidos orgânicos disponíveis à degradação microbiana, ocasionando sobrecarga no sistema biológico e produzindo ácidos orgânicos voláteis. Esses ácidos em alta concentração no afluente, especialmente butírico (3700 mg L^{-1}) e acético (3000 mg L^{-1}) exerceram papel inibitório no reator alimentado com vinhaça *in natura* (30 g DQO L^{-1}), reduzindo o HY até o valor mínimo de 0,79 mmol H_2 g^{-1} DQO adicionada.

Ferraz Junior et al. (2015b), utilizando vinhaça *in natura* (36,2 g DQO L^{-1}) também produziram elevadas concentrações de ácidos orgânicos voláteis, influenciando negativamente a produção de hidrogênio. Foram produzidos 2800 mg L^{-1} de HAc e 2300 mg L^{-1} de HBu, que contribuíram para 78,3 e 21,7% da produção teórica de hidrogênio, respectivamente. Apesar da maior contribuição de HAc e HBu e da produção de HPr ter sido apenas 700 mg L^{-1}, representando 6,3% de consumo de hidrogênio teórico, o valor na prática de produção de

hidrogênio foi equivalente a apenas 12,8% do teórico. Isso, segundo os autores, indicou a necessidade de reduzir a quantidade de intermediários químicos, visto que o HAc pode ter sido produzido por via homoacetogênica. No entanto, o controle sobre a produção de ácidos torna-se dificultoso devido à elevada complexidade na composição da vinhaça de cana-de-açúcar, que contém outros compostos solúveis não medidos no estudo.

5.6. PERFORMANCE DOS REATORES EGSB NA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO

No presente item serão discutidos os aspectos relativos à produção de hidrogênio nos reatores EGSB mesofílicos acidogênicos. A tabela 5.9 sintetiza os resultados de percentual de hidrogênio no biogás, rendimento (HY) e produção volumétrica (PVH) de hidrogênio obtidos e que serão discutidos nos subitens 5.6.1, 5.6.2 e 5.6.3.

5.6.1. Composição do biogás

A composição do biogás em todos os TDH para o EGSB-10, EGSB-20 e EGSB-30 restringiu-se à produção de hidrogênio e gás carbônico, com ausência de metano, o que comprova a eficácia do pré-tratamento térmico do lodo e dos grânulos para inibição da metanogênese, associado a outros fatores, como o pH mantido em baixos valores e elevada carga orgânica aplicada.

No EGSB-10 não foi detectada concentração de hidrogênio nas seis fases de operação, sendo o biogás gerado composto somente por gás carbônico. Visto que o principal metabólito produzido em todas as fases foi ácido acético e houve nula geração de hidrogênio, é provável que a rota metabólica a qual levou à formação de ácido acético tenha sido a homoacetogênese, uma vez que esse processo consome hidrogênio e gás carbônico na formação de acetato. Além disso, grande quantidade de ácido propiônico foi produzida, também consumindo hidrogênio em sua formação.

Tabela 5.9 - Valores médios de percentual de hidrogênio no biogás, produção volumétrica e rendimento de hidrogênio para os diferentes tempos de detenção hidráulica aplicados.

Fase	TDH (h)	TCO (kg m^{-3} d^{-1})	C_{H2} (mmol L^{-1})	H_2 (%)	PVH (L H_2 d^{-1} L^{-1})	PVH' (mmol H_2 h^{-1} L^{-1})	HY (mmol H_2 g^{-1} DQOapl)	HY (mol H_2 mol^{-1} hexose)
EGSB-20								
1	24	20	0(8)	0(8)	0(8)	0(8)	0(8)	0(8)
2	16	30	0(8)	0(8)	0(8)	0(8)	0(8)	0(8)
3	8	60	0(8)	0(8)	0(8)	0(8)	0(8)	0(8)
4	4	120	0(8)	0(8)	0(8)	0(8)	0(8)	0(8)
5	2	240	0(8)	0(8)	0(8)	0(8)	0(8)	0(8)
6	1	480	5,19 ± 1,638(8)	10,64 ± 3,65(8)	4,36 ± 1,68(8)	7,05 ± 2,72(8)	0,34 ± 0,05(8)	0,72 ± 0,22(8)
EGSB-30								
1	24	30	0(8)	0(8)	0(8)	0(8)	0(8)	0(8)
2	16	45	0(8)	0(8)	0(8)	0(8)	0(8)	0(8)
3	8	90	0(8)	0(8)	0(8)	0(8)	0(8)	0(8)
4	4	180	0(8)	0(8)	0(8)	0(8)	0(8)	0(8)
5	2	360	4,31 ± 0,69(8)	8,86 ± 1,27(8)	5,23 ± 1,87(8)	8,44 ± 3,02(8)	0,33 ± 0,08(8)	1,11 ± 0,37(8)
6	1	720	5,07 ± 0,99(7)	10,43 ± 2,14(7)	8,77 ± 1,46(7)	14,13 ± 2,47(7)	0,30 ± 0,08(7)	0,76 ± 0,21(7)

C_{H2}: concentração de hidrogênio detectada; DQOapl: DQO aplicada; nd: não detectado. Os números entre parênteses referem-se ao número de amostras utilizadas no cálculo das médias.

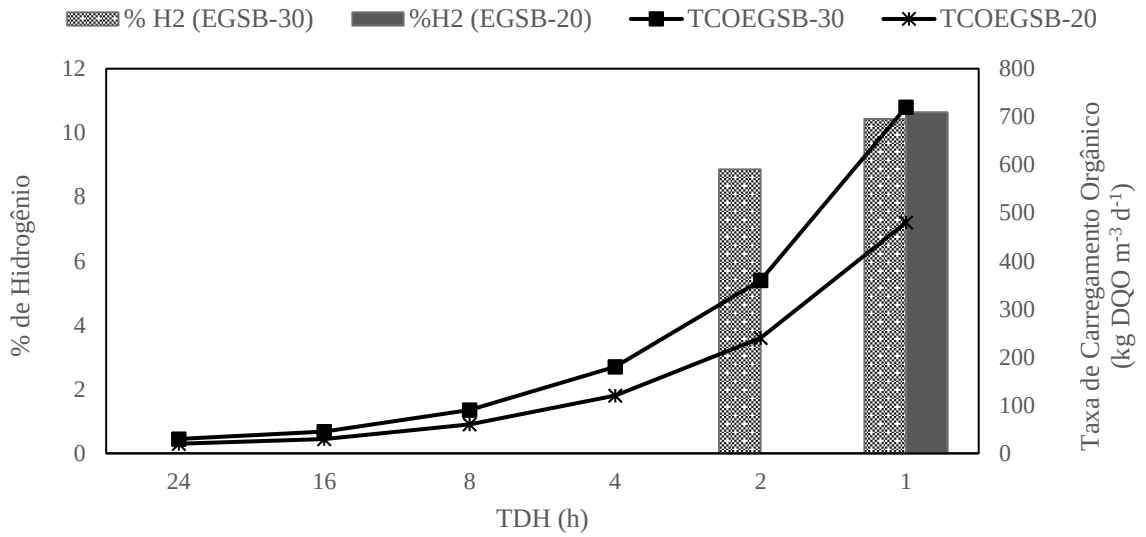
Fonte: elaborado pela Autora (2018).

Conforme a Tabela 5.9, no EGSB-20 a produção de hidrogênio ocorreu somente no TDH de 1 h (fase 6), sendo o biogás produzido nos TDH de 24, 16, 8, 4 e 2 h formado em sua totalidade por gás carbônico. As rotas produtoras de hidrogênio entre os TDH de 24 e 2 h não foram favorecidas; sendo detectado somente no TDH de 1 h (TCO de 480 kg m^{-3} d^{-1}). Já no EGSB-30 foi detectado hidrogênio nos TDH de 2 e 1 h (TCO de 360 e 720 kg m^{-3} d^{-1}, respectivamente). Logo, tanto no EGSB-20 quanto no EGSB-30, a redução do TDH com aplicação de elevadas cargas orgânicas sugere alterações no metabolismo dos microrganismos já presentes nos reatores ou seleção de microrganismos com maior capacidade de produzir hidrogênio.

No EGSB-20 a ausência de hidrogênio entre as fases 1 e 5 e seu baixo conteúdo (10,64 ± 3,65 %) na fase 6 são justificados pela grande quantidade de ácido propiônico (HPr) gerado, que variou entre 26,8% (no TDH de 4 h) e 47,5% (no TDH de 16 h). O HPr foi o principal metabólito obtido na operação do EGSB-20, sendo predominante nos TDH de 24, 16, 2 e 1 h. Mesmo nos TDH de 8 e 4 h em que o ácido acético (HAc) predominou, a concentração de HPr ainda foi bastante alta, podendo ter promovido e consumo do hidrogênio formado. Já no TDH de 1 h houve maior distribuição de metabólitos, com a geração de ácido butírico (HBu) em maior quantidade, além do ácido lático (HLa), o qual foi utilizado pelos microrganismos como fonte alternativa de carboidrato.

No EGSB-30 as rotas metabólicas também não foram direcionadas à obtenção de hidrogênio entre as fases 1 e 4 (TDH de 24 a 4 h). Nesse reator o HPr foi o principal metabólito obtido na maioria das fases (TDH de 16, 4, 2 e 1 h), mantendo-se ainda em concentrações elevadas no TDH de 24 e 8 h, cujo metabólito produzido em maior percentual foi o HAc. Nos TDH de 2 e 1 h houve alterações nas rotas metabólicas dos microrganismos ou seletividade, possibilitando maior geração de HBu e HLa, assim como ocorreu no EGSB-20. Logo, apesar de, no EGSB-30, o metabólito produzido em maior quantidade ter sido o HPr, a maior distribuição de metabólitos através de rotas produtoras de hidrogênio contribuiu para que fossem obtidos os percentuais de 8,86 ± 1,27 % e 10,43 ± 2,14 % no biogás nos TDH de 2 e 1 h. A figura 5.14 permite melhor visualização dos percentuais de hidrogênio nos reatores EGSB.

Figura 5.15 – Percentual de hidrogênio em função do tempo de detenção hidráulica e aumento da taxa de carregamento orgânico.



Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

Na literatura, os percentuais encontrados de hidrogênio no biogás foram, em sua maioria, superiores aos desse estudo, mesmo em baixas concentrações afluentes. Utilizando RALF termofílico (55℃) de vinhaça na concentração de 10 g DQO L^{-1}, Ramos (2016) obteve porcentagens constantes de hidrogênio na composição do biogás entre os TDH de 8 e 1 h, variando entre 43,5% e 46,4%, respectivamente. Com a redução do TDH para 0,5 h a fração molar do hidrogênio foi favorecida, apresentando valor máximo de 61,9%. Esse resultado indica que a redução do TDH, com consequente aumento da TCO, tende a elevar o percentual de hidrogênio, assim como ocorreu com o EGSB-30 no presente estudo, em que houve elevação de 8,86 para 10,43% no percentual de hidrogênio.

Santos et al. (2014a), operando RALF termofílico com 5 g DQO L^{-1}, observaram conteúdo aproximadamente constante de hidrogênio no biogás realizando co-digestão de vinhaça e glicose. Quando somente a vinhaça foi utilizada como substrato, foram obtidos menores percentuais nos TDH testados de 2 e 1 h (41,6 e 31,4%, respectivamente), sendo essa redução atribuída à maior concentração de ácido propiônico, além da ocorrência de homoacetogênese, responsável pela maior produção de ácido acético, com consumo de gás carbônico e hidrogênio na formação desse ácido.

Pelo estudo de Santos et al. (2014a), é possível observar que a utilização de vinhaça como único substrato em concentração reduzida (5 g DQO L^{-1}) pode ter promovido maior estresse aos microrganismos, visto que a vinhaça é um substrato complexo, e, portanto, de

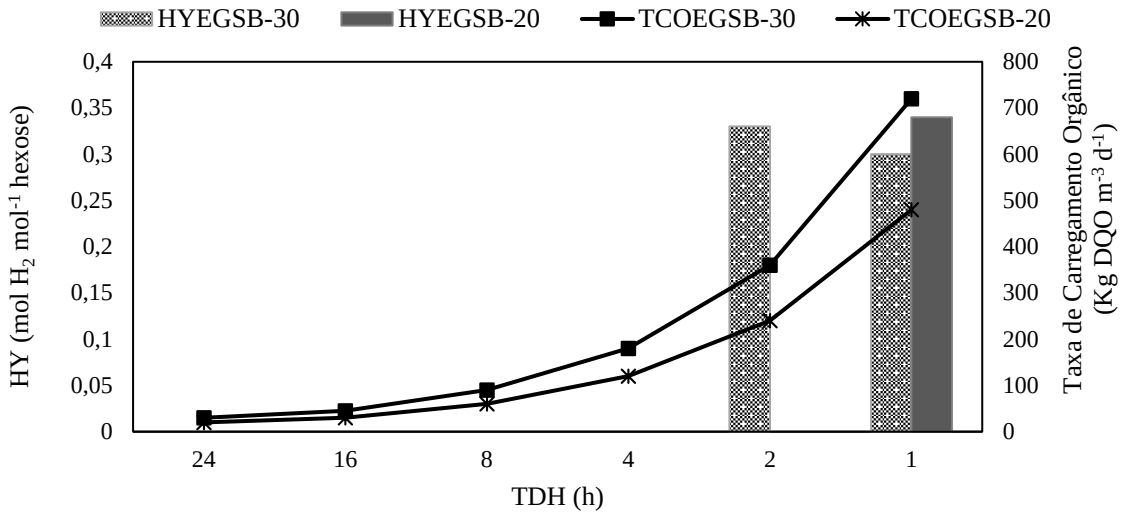
difícil degradação biológica. Como consequência, as rotas metabólicas foram direcionadas para geração de ácido propiônico e acetato pelo processo de homoacetogênese. Ainda assim, os autores obtiveram percentuais elevados de hidrogênio, ao contrário do presente estudo, em que no EGSB-10 sequer ocorreu produção de hidrogênio. Por isso, outros fatores podem ter influenciado, como a configuração do reator, além do inóculo já adaptado ao substrato e à temperatura termofílica.

A influência desses fatores se comprova pelo estudo de Rego (2016) que, com a mesma concentração afluente (5 g DQO L^{-1}) e reator (RALF) utilizados por Santos et al. (2014a), porém com diferente inóculo (lodo de abatedouro de aves) e a temperatura de operação (30 °C). O autor obteve percentuais de hidrogênio somente nos TDH de 2 e 1 h (TCO de 16 a 124 kg DQO m^{-3} d^{-1}), sendo 13 e 9%, respectivamente. O presente estudo utilizou o mesmo lodo e temperatura que Rego (2016) nos três reatores EGSB, somente apresentando percentuais de hidrogênio em TCO muito elevadas (acima de 240 kg DQO m^{-3} d^{-1}).

5.6.2. Rendimento de Hidrogênio (HY)

Devido aos fatores anteriormente mencionados, foi possibilitada apenas na fase 6 a obtenção de hidrogênio no EGSB-20, sendo o rendimento de hidrogênio igual a 0,34 ± 0,05 mmol H_2 g^{-1} DQO (0,72 ± 0,22 mol H_2 mol^{-1} hexose). Não foi possível, então, a comparação da performance do reator em outras fases utilizando esse indicador, sendo necessário maior detalhamento de outros fatores intervenientes no processo de fermentação escura. Já no EGSB-30 o mais elevado HY foi obtido no TDH de 2 h, sendo 0,33 ± 0,01 mmol H_2 g^{-1} DQO (ou 1,11 ± 0,37 mol H_2 mol^{-1} hexose), sendo reduzido no TDH de 1 h para 0,30 ± 0,08 mmol H_2 g^{-1} DQO (0,76 ± 0,21 mol H_2 mol^{-1} hexose).

Figura 5.16 - Rendimento de hidrogênio em função da redução do tempo de detenção hidráulica e aumento da taxa de carregamento orgânico.



Fonte: Elaborado pela Autora (2018)

Devido à elevada TCO aplicada, é possível que o EGSB-20 e o EGSB-30 tenham sido submetidos à sobrecarga orgânica, o que explica, em parte, os baixos valores de HY e também a redução desse parâmetro entre os TDH de 2 e 1 h no EGSB-30. Segundo Tawfik e Salem (2012), altas taxas de carregamento orgânico podem induzir à redução no rendimento de hidrogênio (HY) em sistemas biológicos, visto que as rotas metabólicas sofrem modificações.

Segundo Fuess et al. (2018), baixos HY tendem a indicar condições menos favoráveis para a biomassa acidogênica, como o acúmulo excessivo de sólidos no leito, que resulta em redução da disponibilidade de substrato aos microrganismos, estimulando as bactérias homoacetogênicas a consumir hidrogênio molecular. Além disso, com o acúmulo de sólidos também ocorre o estabelecimento de altas pressões parciais de hidrogênio, levando a mudanças metabólicas para a produção de compostos mais reduzidos (como ácido propiônico e butírico) e resultando em efeito inibitório ao HY (INANC; MATSUI, 1996; WANG, ZHOW; LI, 2006, HAFEZ et al., 2010; FUESS et al., 2016). Como mostrado no item 5.4, no TDH de 1 h houve redução no teor de sólidos suspensos (voláteis e fixos) no efluente do EGSB-20 e EGSB-30, podendo ser indício de acúmulo de sólidos nos reatores.

A temperatura também pode exercer influência na pressão parcial de hidrogênio. A faixa de temperatura mesofílica de operação é mais utilizada principalmente pelas vantagens econômicas e tecnológicas, além da maior parte das espécies de bactérias produtoras de hidrogênio estarem presentes na faixa mesofílica (HAWKES et al., 2006). Por outro lado,

termodinamicamente existe maior dificuldade de desprendimento do gás da fração líquida em temperaturas mais baixas. Quando a pressão parcial de hidrogênio se eleva, a síntese de hidrogênio torna-se desfavorável e o metabolismo é deslocado para a produção de compostos reduzidos. Assim, considerando a Lei de Henry, temperaturas elevadas reduzem a solubilidade do gás na fase aquosa, desfavorecendo o consumo de gás para geração de outros processos, como a geração de metabólitos que consomem hidrogênio (LEVIN; PITT; LOVE, 2004).

Apesar da maior parte dos estudos serem realizados em faixa de temperatura termofílica, a literatura apresenta resultados bastante diversificados em relação ao HY. Isso ocorre devido aos valores de HY sofrerem grande influência dos microrganismos selecionados no inóculo pelas condições operacionais aplicadas (MATHEWS; WANG, 2009; OH et al., 2011).

O estudo desempenhado por Ferraz Junior et al. (2014) em APBR (55°C) com concentração afluente 36,2 g DQO L^{-1} reportou baixos valores de HY que, segundo os autores, se deve à excessiva carga orgânica aportada ao sistema. O valor máximo de HY foi 0,3 mmol H_2 g^{-1} DQO em TCO de 72,4 kg DQO m^{-3} d^{-1} (TDH de 12 h). Ao aumentar a TCO para o valor de 108,6 kg DQO m^{-3} d^{-1}, o HY foi reduzido em 63,9%. Os resultados máximos obtidos pelos autores foram próximos aos HY atingidos por EGSB-20 e EGSB-30; no entanto, a TCO utilizada foi muito inferior, indicando que o EGSB é capaz de atingir maiores rendimentos mesmo em elevadas TCO (acima de 240 kg DQO m^{-3} d^{-1}).

Santos et al. (2014b) também atribuíram a redução do rendimento de hidrogênio no reator com 30 g DQO L^{-1} de 0,79 para 0,19 mmol H_2 g^{-1} DQO entre os TDH de 8 e 1 h à sobrecarga ocasionada pela elevação da carga orgânica, além da maior disponibilidade de compostos recalcitrantes/tóxicos presentes na vinhaça de cana-de-açúcar, o que refletiu negativamente nesse parâmetro. Similarmente, Santos et al. (2014c) observaram redução do HY com o aumento da carga orgânica, com valores máximos de 1,85 mmol H_2 g^{-1} DQO aplicada no R20, observado no TDH de 6 h. A redução do HY abaixo desse TDH indicou que a produção de hidrogênio foi realizada sob condição de sobrecarga orgânica nos reatores.

Fazendo um paralelo com o presente trabalho, as concentrações testadas por Santos et al (2014b; 2014c) corresponderam às mesmas aplicadas em EGSB-30 e EGSB-20, respectivamente, nos TDH de 8 a 1 h. No entanto, em ambos os estudos a temperatura termofílica, a adição inicial de glicose em 33% do substrato na fase de adaptação e o inóculo já adaptado ao substrato e à temperatura termofílica podem ter sido cruciais para o direcionamento a rotas metabólicas mais favoráveis ao aproveitamento do substrato na produção de hidrogênio O HBu, HIsoBu foram os produtos principais da fermentação nesses estudos, ao passo que, no

presente trabalho, os metabólitos mais expressivos foram o HPr e o HAc, ocorrendo diversificação na rotas metabólicas somente em TDH mais baixos.

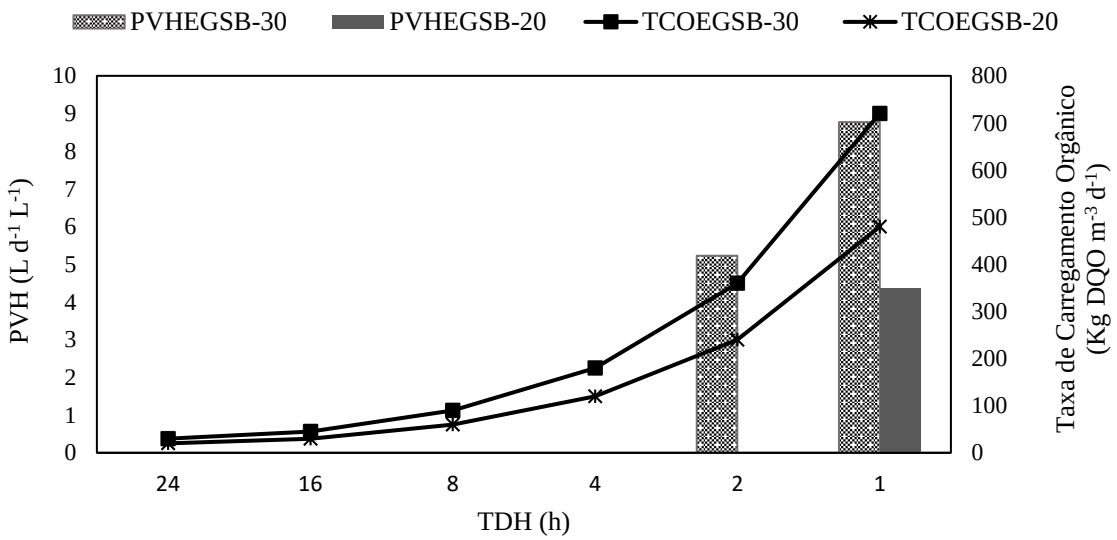
A partir dos resultados apresentados anteriormente, é possível constatar que, quando a vinhaça de cana-de-açúcar é utilizada como substrato, o inóculo, a concentração afluente e o TDH aplicados e, como consequência, a carga orgânica e teor de sólidos, exercem grande influência sobre o HY.

5.6.3. Produção Volumétrica de Hidrogênio (PVH)

A PVH é influenciada por parâmetros operacionais como a concentração aplicada, o TDH, TCO, pH e temperatura utilizados. No presente tópico a discussão será pautada na influência do TDH e consequentemente da TCO aplicada nos reatores EGSB-20 e EGSB-30, visto que no EGSB-10 não ocorreu produção de hidrogênio.

No EGSB-20, a redução do TDH condicionou a produção volumétrica de hidrogênio apenas no TDH de 1 h, sendo essa igual a 4,36 ± 1,68 L d^{-1} L^{-1}. Já no EGSB-30, a menor PVH ocorreu no TDH de 2 h (5,23 ± 1,87 L d^{-1} L^{-1}), sendo elevada para 8,77 ± 1,46 L d^{-1} L^{-1} em 1 h. Logo, o aumento da TCO exerceu efeito positivo nesse parâmetro, conforme mostrado na figura 5.16 e na tabela 5.9.

Figura 5.17 - Produção volumétrica de hidrogênio em função da redução do TDH e aumento da taxa de carregamento orgânico.



Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

Assim como nesse estudo, Santos et al. (2014b) também observaram aumento da PVH com a redução do TDH. Tanto RALF com vinhaçaafluente diluída (10 g DQO L^{-1}) como no RALF com vinhaça *in natura* (30 g DQO L^{-1}), a maior PVH foi obtida no TDH de 1 h, sendo 47,0 e 19,2 L H_2 d^{-1} L^{-1}, respectivamente. Dessa forma, No RALF1, de menor concentração, a PVH mostrou-se superior ao RALF2, assim como ocorreu com o HY. Quando comparados os resultados obtidos por Santos et al. (2014b) com os reatores EGSB-10 e EGSB-30 no presente estudo, não é possível afirmar que os resultados convergem, apesar dos reatores terem sido operados em mesma concentração afluente e TCO. Enquanto os autores obtiveram melhor performance na operação do RALF alimentado com 10 g DQO L^{-1}, resultados de produção de hidrogênio na presente pesquisa somente foram observados em TCO acima de 240 kg DQO m^{-3} d^{-1}, ou seja, nos TDH de 1 h no EGSB-20 e 2 e 1 h no EGSB-30.

Esses resultados sugerem que, no trabalho de Santos et al. (2014b) alguns fatores podem ter constituído condições mais adequadas à produção de hidrogênio, como a composição do substrato (vinhaça), temperatura (55℃) e o inóculo adaptado ao substrato, o que levou à preponderância de HLa e HBu durante a operação e ao favorecimento da produção de hidrogênio.

Outros estudos com o mesmo tipo de reator (RALF) em temperatura termofílica (55℃) observaram comportamento similar ao de Santos et al. (2014b) em concentração de 10 g DQO L^{-1}. Variando entre 8 e 0,5 h, Ramos (2016) observou comportamento crescente da PVH ao longo de toda a operação, variando entre 1,68 L e 17,04 L H_2 d^{-1} L^{-1} com a redução do TDH de 8 para 0,5 h. Ferreira (2016), em concentração afluente de 5 g DQO L^{-1} e TDH entre 8 e 1 h também verificou aumento da PVH com a elevação da TCO, produzindo 12,9 L d^{-1} L^{-1} no TDH de 1 h (117 kg DQO m^{-3} d^{-1}).

Assim, os estudos mencionados com leito fluidificado relataram aumento na PVH com a elevação da carga orgânica, assim como ocorreu no EGSB-30. É possível observar que o RALF se mostrou mais robusto na PVH do que o EGSB mesmo em TCO mais baixas, especialmente quando considerada a temperatura de operação em faixa termofílica. É importante mencionar que, apesar da produção de hidrogênio não ter ocorrido em todos os TDH e concentração afluente estudados, outros compostos de valor agregado foram produzidos, conforme foi abordado no item 5.5. A tabela 5.10 compara os valores de HY e PVH máximos obtidos para os reatores EGSB-20 e EGSB-30 em relação à literatura a partir da vinhaça visando a produção de hidrogênio.

Tabela 5.10 - Comparação do desempenho de EGSB-20 e EGSB-30 em relação à literatura a partir da vinhaça visando a produção de hidrogênio.

Reator	**Inóculo**	**T (°C)**	**Cafl (g DQO L^{-1})**	**TDH (h)**	**TCO (kg m^{-3} d^{-1})**	**Maior HY**	**Maior PVH (L H_2 d^{-1} L^{-1})**	**Principais Metabólitos**	**Autoria (Ano)**
ASBR	lodo da mesma água residuária	37	20 - 60	32 - 13	15 - 112,5	172 mL H_2 g^{-1} DQO removida	3,31	HBu; HVa	Searmsirimongkol et al. (2011)
APBR	biomassa auto-fermentada	55	36,2	24 - 8	36,2 - 108,6	0,3 mmol H_2 g^{-1} DQO	0,53	HAc; HBu; HPr	Ferraz Junior et al. (2014)
Batelada	UASB mesofílico (abatedouro de aves)	37	2, 5, 7, 12	-	-	2,23 mmol H_2 g^{-1} DQO aplicada	-	HBu; HAc; EtOH	Lazaro et al. (2014)
		55	2, 5, 7, 12	-	-	2,31 mmol H_2 g^{-1} DQO aplicada	-		
RALF	UASB termofílico (tratamento de vinhaça)	55	5	8 - 1	26,6 - 225,3	5,73 mmol H_2 g^{-1} DQO aplicada	18,72	HSu; HLa; HBu	Santos et al. (2014a)
RALF	UASB termofílico (tratamento de vinhaça)	55	10	8 - 1	40 - 240	2,86 mmol H_2 g^{-1} DQO aplicada	47,04	HAc, HBu; HLa	Santos et al. (2014b)
			30	6 - 1	90 - 720	0,79 mmol H_2 g^{-1} DQO aplicada	19,44		
RALF	UASB termofílico (tratamento de vinhaça)	55	15	6 - 1	60 - 360	2,23 mmol H_2 g^{-1} DQO aplicada	35,76	HBu; HPr; HIsoBu; HLa	Santos et al. (2014c)
			20	6 - 1	60 - 480	1,85 mmol H_2 g^{-1} DQO aplicada	28,8		
APBR	biomassa auto-fermentada	25	36,2	24	36,2	0,3 mol H_2 mol^{-1} hexose	0,084	HPr; HBu	Ferraz Junior et al. (2015a)

ASBR: *Anaerobic Sequencing Batch Reator* (Reator Anaeróbio em Batelada Sequencial), APBR: *Anaerobic Packed Bed Reactor* (Reator Anaeróbio de Leito Empacotado), RALF: Reator Anaeróbio de Leito Fluidificado.

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

Tabela 5.10 - Comparação do desempenho de EGSB-20 e EGSB-30 em relação à literatura a partir da vinhaça visando a produção de hidrogênio.

Reator	**Inóculo**	**T (°C)**	**Cafl (g DQO L^{-1})**	**TDH (h)**	**TCO (kg m^{-3} d^{-1})**	**Maior HY**	**Maior PVH (L H_2 d^{-1} L^{-1})**	**Principais Metabólitos**	**Autoria (Ano)**
APBR	biomassa auto-fermentada	55	36,2	10,2	84,2	0,8 mol H_2 mol^{-1} hexose	0,76	HAc; HBu	Ferraz Junior et al. (2015b)
RALF	UASB mesofílico (abatedouro de aves)	22	5 10	6 - 1 6 - 1	-	3,07 mmol H_2 g^{-1} DQO aplicada	13,68	MetOH; EtOH; HBu	Reis et al. (2015)
RALF	UASB termofílico (tratamento de vinhaça)	55	5	8 -1	15 - 120	0,33 mol H_2 mol^{-1} hexose	12,96	HAc; HBu; EtOH	Ferreira (2016)
APBR	biomassa auto-fermentada	55	28,3	7,5	84,2	0,49 mmol H_2 g^{-1} DQO aplicada	HAc; HBu	HBu; HAc	Fuess et al. (2016)
RALF	UASB mesofílico (abatedouro de aves)	30	5	8 -1	16 - 112	-	-	HAc; HSu; HPr	Rego (2016)
RALF	UASB termofílico (tratamento de vinhaça)	55	10	8 - 0,5	30 - 480	1,64 mmol H_2 g^{-1} DQO aplicada	17,04	HAc; HPr; HBu	Ramos (2016)

ASBR: *Anaerobic Sequencing Batch Reator* (Reator Anaeróbio em Batelada Sequencial), APBR: *Anaerobic Packed Bed Reactor* (Reator Anaeróbio de Leito Empacotado), RALF: Reator Anaeróbio de Leito Fluidificado.

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

Tabela 5.10 - Comparação do desempenho de EGSB-20 e EGSB-30 em relação à literatura a partir da vinhaça visando a produção de hidrogênio.

Reator	**Inóculo**	**T (°C)**	**Cafl (g DQO L^{-1})**	**TDH (h)**	**TCO (kg m^{-3} d^{-1})**	**Maior HY**	**Maior PVH (L H_2 d^{-1} L^{-1})**	**Principais Metabólitos**	**Autoria (Ano)**
EGSB-20	UASB mesofílico (abatedouro de aves)	30	20	24 - 1	20 - 480	0,34 mmol H_2 g^{-1} DQO aplicada 0,72 mol H_2 mol^{-1} hexose	4,36	HPr; HAc; HBu	Presente estudo
EGSB-30	UASB mesofílico (abatedouro de aves)	30	30	24 - 1	30 - 720	0,33 mmol H_2 g^{-1} DQO aplicada 1,11 mol H_2 mol^{-1} hexose	8,77	HPr; HAc; HLa; HBu	Presente estudo

ASBR: *Anaerobic Sequencing Batch Reator* (Reator Anaeróbio em Batelada Sequencial), APBR: *Anaerobic Packed Bed Reactor* (Reator Anaeróbio de Leito Empacotado), RALF: Reator Anaeróbio de Leito Fluidificado.

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

5.7. BALANÇO DE MASSA

A vinhaça de cana-de-açúcar é um resíduo complexo que apresenta todos os compostos introduzidos na produção e transformação da cana-de-açúcar, sendo os componentes mais representativos da matéria orgânica da vinhaça a glicerina, ácidos orgânicos, além de melanoidina, compostos fenólicos, celulose e hemicelulose. (BENKE et al., 1998; FITZGIBBON et al., 1998).

Como não foi possível a análise de todos os componentes citados contribuintes à DQO nos reatores EGSB-10, EGSB-20 e EGSB-30, foram aplicados dois balanços distintos. O primeiro, como exposto nas tabelas 5.11, 5.12 e 5.13, foi o balanço de massa da fração solúvel no efluente dos reatores EGSB, que considerou as medições em DQO equivalente de carboidratos efluente, a concentração dos sólidos suspensos voláteis, além dos metabólitos produzidos em cada reator. Já o segundo foi o balanço de massa geral (tabelas 5.14, 5.15 e 5.16), que considerou, além dos compostos do balanço de massa da fração solúvel, a produção de hidrogênio. Na tabela 5.11 são dispostas as DQO equivalentes utilizadas nos cálculos dos balanços.

Tabela 5.11 – DQO equivalentes utilizadas nos cálculos dos balanços de massa da fase solúvel e global.

Componente	**DQO equivalente [g componente g^{-1} DQO]**
HPr	1,5135
HAc	1,0667
HIsoVa	2,0392
HSu	0,9492
HIsoBu	1,8182
HBu	1,8182
HVa	2,0392
HCa	2,2069
EtOH	2,0869
HLa	1,0657
HFo	0,3478
H_2	8,0000
SSV	1,3400
Carboidrato (sacarose)	1,1228

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

Considerando o balanço de massa em relação à DQO total efluente, No EGSB-10, os compostos analisados corresponderam a um percentual entre 39,08% (TDH de 24 h) e 85,58% (TDH de 1 h) na vinhaça acidificada (Tabela 5.12). No EGSB-20 os compostos medidos corresponderam entre 42,32% (TDH de 8 h) e 87,68% (TDH de 1 h), conforme a tabela 5.13. Por fim, no EGSB-30 os compostos medidos variaram entre 59,66% (TDH de 4 h) e 98,96% (TDH de 1 h) (Tabela 5.14). É possível observar que os compostos solúveis medidos para o cálculo da DQO efluente não representam a totalidade dos compostos contribuintes à DQO medida, indicando contribuição de outros compostos não medidos.

Esses resultados estão em consonância com outros estudos utilizando a vinhaça de cana-de-açúcar *in natura* (36,2 g DQO L^{-1}) como substrato desempenhados por Ferraz Junior et al. (2014), cujos intermediários corresponderam somente a 34 a 53,2%; Ferraz Junior et al. (2015a), com 48,5% da fração solúvel e Ferraz Junior et al. (2015b), cujo percentual foi entre 76,4 e 91,4% a partir dos produtos detectados em relação à DQO total medida. Fuess et al. (2016) também obtiveram grande diferença entre os compostos medidos em relação à DQO total (43,9%). Em todos esses trabalhos não foram avaliados compostos como melanoidinas, glicerol, além dos ácidos lático e succínico, justificando, segundo os autores, as grandes discrepâncias no balanço de massa da fração solúvel da DQO efluente.

Dessa forma, assim como no presente estudo, em outros trabalhos a composição da vinhaça influenciou diretamente no percentual de compostos solúveis medidos no efluente dos reatores. Bonini (2012) destacou uma concentração de 2800 mg L^{-1} de glicerol na vinhaça de cana-de-açúcar, contribuindo para uma parcela da DQO de 3408,72 g DQO L^{-1} (DQO equivalente do glicerol = 1,2174 g glicerol g^{-1} DQO).

Também há a contribuição não quantificada no presente estudo de materiais resultantes da lise celular no processo fermentativo, como moléculas de DNA, lipoproteínas, etc., além da fração solúvel de substâncias poliméricas extracelulares (SPE) (FUESS et al., 2017). Espera-se uma produção maior de SPE em sistemas acidogênicos em detrimentos aos metanogênicos, sendo nos metanogênicos em torno de 25% da DQO afluente transformada em SPE, de acordo com Aquino e Stuckey (2006).

Similarmente a Fuess et al. (2016), foi realizado no presente trabalho o balanço de massa global do processo, implicando em menores discrepâncias entre as frações discriminada e não discriminada. No EGSB-10, a fração discriminada permaneceu entre 77,01% (TDH de 24 h) e 95,92% (TDH de 2 h) (Tabela 5.15). Já para o EGSB-20 (Tabela 5.16), no TDH de 16 h obteve-se a menor fração discriminada (83,73%), enquanto no TDH de 1 h a fração discriminada excedeu a não discriminada em 8,36 % (TDH de 1 h). No EGSB-30 (Tabela 5.17), a maior

diferença entre a fração medida e não medida ocorreu no TDH de 2 h, excedendo 22,75%, enquanto no TDH de 4 h a fração discriminada atingiu quase exatamente (diferença de 0,39%) o valor da DQO global. Nesse balanço, a fração não discriminada decorre de possíveis erros atrelados ao processo experimental, composição diferente da vinhaça de cana-de-açúcar, além do crescimento celular no leito, o qual não foi considerado.

As discrepâncias no balanço de massa global condizem com as obtidas por Fuess et al. (2016), conforme a tabela 5.18, expressa em percentuais. Deve-se levar em consideração que a composição da vinhaça de cana-de-açúcar é um fator relevante, variando de acordo com o processo produtivo do álcool, mosto utilizado, concentração de açúcares e nutrientes na cana-de-açúcar, época da safra, dentre outros.

Tabela 5.12 - Balanço de massa da fração solúvel em relação à DQO total efluente do EGSB-10 (10000 mg L^{-1}).

DQO (mg DQO L^{-1}) - EGSB-10															
Fase	**HPr**	**HAc**	**HIsoVa**	**HSu**	**HIsoBu**	**HBu**	**HVa**	**HCa**	**EtOH**	**HLa**	**SSV**	**Cefl (DQO)**	**DQO total**	**DQO medida**	**%Dif**
1	1124,68	786,26	0,00	0,00	163,64	548,19	272,84	0,00	0,00	0,00	442,20	368,28	3706,10	9484,00	60,92
2	1365,63	998,96	0,00	0,00	590,92	354,00	220,44	0,00	0,00	0,00	561,46	646,73	4738,14	9099,00	47,93
3	1199,90	1155,56	0,00	0,00	0,00	707,10	225,74	0,00	0,00	0,00	643,20	547,93	4479,42	10090,00	55,61
4	1087,15	1062,22	0,00	0,00	0,00	386,00	151,72	0,00	291,54	0,00	430,14	485,05	3893,82	9097,00	57,20
5	1697,69	1169,53	303,64	0,00	0,00	831,46	470,65	192,66	0,00	0,00	684,74	659,08	6009,46	10720,00	43,94
6	2012,35	1569,12	0,00	79,54	0,00	2374,57	0,00	0,00	0,00	382,59	1012,50	730,94	8161,61	9537,00	14,42

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

Tabela 5.13 - Balanço de massa da fração solúvel em relação à DQO total efluente do EGSB-20 (20000 mg L^{-1}).

DQO (mg DQO L^{-1}) - EGSB-20																
Fase	**HPr**	**HAc**	**HIsoVa**	**HSu**	**HIsoBu**	**HBu**	**HVa**	**HCa**	**EtOH**	**HLa**	**HFo**	**SSV**	**Cefl (DQO)**	**DQO total**	**DQO medida**	**%Dif**
1	2809,8	1465,01	0,00	0,00	206,73	1254,38	712,29	185,60	0,00	0,00	0,00	1091,70	887,01	8612,53	15219,00	43,41
2	3065,4	1308,84	0,00	0,00	135,64	931,83	474,93	224,88	0,00	0,00	0,00	932,37	1055,43	8129,37	14457,00	43,77
3	1922,1	1711,95	0,00	0,00	0,00	1474,20	289,57	0,00	0,00	0,00	0,00	1276,35	954,38	7628,58	18027,00	57,68
4	1850,7	1851,04	0,00	0,00	0,00	1150,01	238,59	242,10	664,47	0,00	0,00	797,30	875,78	7670,00	16934,00	54,71
5	3329,9	1178,81	337,28	0,00	0,00	1220,01	1179,88	206,57	0,00	0,00	0,00	1519,02	1381,04	10352,47	18003,00	42,50
6	4352,8	1259,24	0,00	267,67	0,00	3066,21	0,00	0,00	0,00	2489,05	46,05	1386,36	1616,83	14484,25	16519,00	12,32

Fonte: Elaborado pela Autora (2018)

Tabela 5.14 - Balanço de massa da fração solúvel em relação à DQO total efluente do EGSB-30 (30000 mg L^{-1}).

DQO (mg DQO L^{-1}) - EGSB-30																
Fase	**HPr**	**HAc**	**HMa**	**HSu**	**HIsoBu**	**HBu**	**HVa**	**HCa**	**EtOH**	**HLa**	**HFo**	**SSV**	**Cefl (DQO)**	**DQO total**	**DQO medida**	**%Dif**
1	4044,68	2349,30	0,00	77,17	252,73	1850,38	1271,65	503,17	0,00	0,00	0,00	1333,30	1488,83	13171,21	20696,00	36,36
2	5687,88	2345,99	388,15	0,00	0,00	1310,92	697,20	239,89	0,00	0,00	0,00	1992,58	1848,13	14510,75	20188,00	28,12
3	3187,10	3220,63	0,00	0,00	0,00	2980,58	527,13	0,00	391,74	242,98	0,00	1575,84	1772,90	13898,90	22155,00	37,27
4	6074,73	1486,87	0,00	155,95	0,00	2541,48	1489,23	0,00	0,00	183,62	26,09	1471,32	2918,16	16347,45	27402,00	40,34
5	8570,95	1854,99	0,00	253,44	0,00	5812,79	0,00	0,00	0,00	3695,85	51,40	3445,14	3057,38	26741,94	25811,00	3,61
6	4705,47	1796,32	0,00	436,63	0,00	4450,95	0,00	0,00	0,00	3417,70	46,26	2613,00	3454,86	20921,19	20706,00	1,04

Fonte: Elaborado pela Autora (2018)

Tabela 5.15 - Balanço de massa global do EGSB-10 (10000 mg L^{-1}).

SSV (mg d^{-1})	DQO H_2 (mg d^{-1})	DQO efluente (mg d^{-1})	Σ DQO (SSV, H_2, efluente) (g d^{-1})	DQO afluente (g d^{-1})	Fração discriminada (%)	Fração não discriminada (%)
40,24	-	863,04	0,90	1,17	77,01	22,99
76,36	-	1237,46	1,31	1,68	78,29	21,71
175,59	-	2754,57	2,93	3,44	85,25	14,75
234,86	-	4966,96	5,20	5,69	91,41	8,59
747,74	-	11706,24	12,45	12,98	95,92	4,08
2211,71	-	20832,62	23,04	25,91	88,95	11,05

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

Tabela 5.16 - Balanço de massa global do EGSB-20 (20000 mg L^{-1}).

SSV (mg d^{-1})	DQO H_2 (mg d^{-1})	DQO efluente (mg d^{-1})	Σ DQO (SSV, H_2, efluente) (g d^{-1})	DQO afluente (g d^{-1})	Fração discriminada (%)	Fração não discriminada (%)
70,41	-	981,63	1,05	1,17	89,62	10,38
90,16	-	1397,99	1,49	1,78	83,73	16,27
246,85	-	3486,42	3,73	4,36	85,58	14,42
308,40	-	6550,07	6,86	7,18	95,48	4,52
1175,12	-	13927,12	15,10	15,77	95,74	4,26
2144,98	3014,40	25554,89	30,71	28,34	108,36	-8,36

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

Tabela 5.17 - Balanço de massa global do EGSB-30 (30000 mg L^{-1}).

SSV (mg d^{-1})	**DQO H_2 (mg d^{-1})**	**DQO efluente (mg d^{-1})**	**Σ DQO (SSV, H_2, efluente) (g d^{-1})**	**DQO afluente (g d^{-1})**	**Fração discriminada (%)**	**Fração não discriminada (%)**
121,33	-	1883,34	2,00	2,47	81,29	18,71
271,99	-	2755,66	3,03	3,84	78,88	21,12
430,20	-	6048,32	6,48	8,18	79,16	20,84
803,34	-	14961,49	15,76	15,70	100,39	-0,39
3762,09	3956,80	28185,61	35,90	29,25	122,75	-22,75
5707,84	6592,00	45230,19	57,53	52,56	109,46	-9,46

Fonte: Elaborado pela Autora (2018).

Tabela 5.18 – Comparação com Fuess et al. (2016) em relação às divergências obtidas entre a fração discriminada e não discriminada.

Reator	FASE	Proporção na DQO medida (%)			Fração discriminada	Fração não discriminada
		DQO solúvel efluente	H_2	SSV		
EGSB-10	1	73,57	0	3,43	77,00	23,00
	2	73,74	0	4,55	78,29	21,71
	3	80,14	0	5,11	85,25	14,75
	4	87,31	0	4,13	91,44	8,56
	5	90,16	0	5,76	95,92	4,08
	6	80,44	0	8,54	88,98	11,02
EGSB-20	1	83,62	0	2,43	86,05	13,95
	2	78,66	0	3,05	81,71	18,29
	3	79,92	0	2,85	82,78	17,22
	4	91,19	0	2,32	93,51	6,49
	5	88,29	0	3,36	91,65	8,35
	6	90,17	3,0144	5,53	98,71	1,29
EGSB-30	1	76,37	0	4,919	81,29	18,71
	2	71,79	0	7,086	78,88	21,12
	3	73,90	0	5,257	79,16	20,84
	4	95,28	0	5,115	100,39	-0,39
	5	96,38	3,957	12,864	113,20	-13,20
	6	86,06	6,592	10,860	103,51	-3,51
APBR Fuess et al. (2016)	-	75,00	0,5	7,4	82,9	17,1

Fonte: Fuess et al., (2016); Autora (2018).

6. CONCLUSÕES

O presente trabalho buscou avaliar a possibilidade de a vinhaça de cana-de-açúcar ser usada como substrato para a produção de hidrogênio e metabólitos solúveis em condição mesofílica com tempos de detenção hidráulica variando entre 24 e 1 h e diferentes concentrações fixas de substrato para o EGSB-10, EGSB-20 e EGSB-30 (10, 20 e 30 g DQO L^{-1}, respectivamente). A partir dos resultados obtidos, é possível concluir que:

- Os reatores EGSB mesofílicos (30 °C) mostraram aptidão à produção de hidrogênio utilizando a vinhaça de cana-de-açúcar como substrato em TCO acima de 240 kg DQO m^{-3} d^{-1}, correspondendo à concentração afluente de 20 g DQO L^{-1} em TDH de 1 h e de 30 g DQO L^{-1} em TDH de 2 h.
- No EGSB-10, a redução do TDH não proporcionou a produção de hidrogênio, sendo o principal metabólito obtido o ácido acético, seguido pelo ácido propiônico. Parte do ácido acético (entre 25 e 41%) foi gerado pelo processo de homoacetogênese, sendo via consumidora de hidrogênio e gás carbônico;
- No EGSB-20 a produção de hidrogênio foi favorecida somente no TDH de 1 h (480 kg DQO m^{-3} d^{-1}), originado por via mista composta principalmente por HAc, HBu e HLa. No entanto, ao longo da operação o HPr foi o metabólito predominante, originado a partir do lactato na vinhaça afluente. Logo, o ácido lático desempenhou dualidade no processo fermentativo: a produção de hidrogênio por via com menor rendimento, ao mesmo passo em que promoveu o consumo de hidrogênio na formação de propionato. Assim, o percentual de hidrogênio no biogás no TDH de 1 h foi de 10,64%, enquanto a produção volumétrica de hidrogênio foi 4,36 L H_2 d^{-1} L^{-1}, e o HY 0,34 g DQO L^{-1} (ou 0,72 mol H_2 mol^{-1} hexose).
- No EGSB-30 os TDH mais reduzidos foram favoráveis à produção volumétrica de hidrogênio, a qual foi incrementada de 5,23 para 8,77 L H_2 d^{-1} L^{-1} com a redução do TDH de 2 h para 1 h. No entanto, o rendimento de hidrogênio permaneceu aproximadamente constante, com decaimento de 0,33 g DQO L^{-1} (ou 1,11 mol H_2 mol^{-1} hexose) para 0,3 g DQO L^{-1} (ou 0,76 mol H_2 mol^{-1} hexose). Nesses TDH, foi constatada a maior participação de HBu e HLa no processo fermentativo, sendo que a via produtora do HLa ofereceu menor rendimento, assim como no EGSB-20.

7. SUGESTÕES

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, é sugerido às pesquisas posteriores e complementares:

- Comparar a produção contínua de hidrogênio a partir da vinhaça de cana-de-açúcar sob faixa termofílica de temperatura em reator EGSB;
- Analisar possibilidade de sistema com separação de fases, constituído por reator acidogênico seguido por reator metanogênico, a fim de promover maiores ganhos energéticos e destinação ambientalmente adequada da vinhaça;
- Analisar possibilidade de sistema acidogênico de vinhaça de cana-de-açúcar em co-digestão com substrato de fácil degradação rico em carboidrato, visto que a vinhaça é um resíduo complexo e repleto de nutrientes (nitrogênio, potássio, sulfato, etc);
- Analisar aplicação de diferentes meios suportes na produção de hidrogênio e na estrutura da comunidade microbiológica estabelecida em reatores a partir da vinhaça de cana-de-açúcar;
- Estudos microbiológicos para identificação dos microrganismos presentes e compreensão das funções desempenhadas no processo fermentativo.
- Análises econômicas a fim de verificar a viabilidade da aplicação do processo de fermentação escura em reatores de alta taxa.

REFERÊNCIAS

ABREU, A. A.; DANKO, A. S.; ALVES, M. M. **Bio-hydrogen production in an EGSB reactor under mesophilic, thermophilic and hyperthermophilic conditions.** Apresentado em pôster PT-01-Biohydrogen 11th IWA World Congress on Anaerobic Digestions, p. 23-27, setembro de 2007, Brisbane, Austrália.

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, p. 9577-9586, 2010.

ACAR, C.; DINCER, I. Comparative assessment of hydrogen production methods from renewable and non-renewable sources. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, p.1-12, 2014.

ABDEL-RAHMAN, M. A., TASHIRO, Y., SONOMOTO, K. Lactic acid production from lignocellulose derived sugars using lactic acid bacteria: overview and limits. **Journal of Biotechnology**, v. 156, p. 286 – 301, 2011.

ABDEL-RAHMAN, M. A.; TASHIRO, Y.; SONOMOTO, K. Recent Advances in Lactic Acid Production by Microbial Fermentation Processes. **Biotechnology Advances**, v. 31, p. 877 – 902, 2013.

AGLER, M. T.; WRENN, B. A.; ZINDER, S.H.; ANGENENT, L.T. Waste to bioproduct conversion with undefined mixed cultures: the carboxylate platform. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 70-78, 2011.

ALMANÇA, R. Avaliação do uso da vinhaça da cana-de-açúcar na geração de energia Elétrica (Estudo de caso). **Dissertação de Mestrado**, PIPGE USP, 1994.

ALMEIDA, J. R. de. O problema da vinhaça. **O solo**, 1:73-5, 1952.

AMORIM, E. L. C. de; BARROS, A. R.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z.; SILVA, E. L. Anaerobic fluidized bed reactor with expanded clay as support for hydrogen production through dark fermentation of glucose. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, p. 783 – 790, 2009.

AMORIM, E. L. C.; SADER, L. T.; SILVA, E. L. Effect of Substrate Concentration on Dark Fermentation Hydrogen Production Using an Anaerobic Fluidized Bed Reactor. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 166, p. 1248-1263, 2012.

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

AQUINO, S. **Avaliação da Aplicação de Ozônio como Pré-Tratamento ao Processamento Anaeróbio de Vinhaça**. 2012. 112 p. Dissertação (Mestrado) – EESC - USP. São Carlos, 2012.

AQUINO, S.; STUCKEY, D. Chromatographic characterization of dissolved organics in effluents from two anaerobic reactors treating synthetic wastewater. **Water Sci Technology**, v. 54, n. 2, p. 193 – 198, 2006.

AROOJ, M. F.; HAN, S K.; KIM, S. H.; KIM, D. H.; SHIN, H. S. Effect of HRT on ASBR converting starch into biological hydrogen. **Int. Journal Hydrogen Energy**, v. 33, p. 6509 – 6514, 2008.

BAGHCHEHSARAEE, B.; NAKHLA, G.; KARAMANEV, D.; MARGARITIS; REID, G. The effect of heat pretreatment temperature on fermentative hydrogen production using mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, p. 4064-4073, 2008.

BAGHCHEHSARAEE, B.; NAKHLA, G.; KARAMANEV, D.; MARGARITIS, A. Effect of extrinsic lactic acid on fermentative hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, p. 2573-2579, 2009.

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

BASTIDAS-OYANEDEL, J.; MOHD-ZAKI, Z.; ZENG, R.J.; BERNET, N.; PRATT, S.; STEYER, J.; BATSTONE, D.J. Gas controlled hydrogen fermentation. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 503-509, 2012.

BENKE, M.B., MERMUT, A.R., CHATSON, B. Carbon-13 CP/MAS NMR and DR-FTIR spectroscopic studies of sugarcane distillery waste. **Canadian Journal of Soil Science**, v.78, p. 227–236, 1998.

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

BONINI, M. A. **Cultivo heterotrófico de *Aphanothece microscópica Nãgeli e Chlorella vulgaris* em diferentes fontes de carbono e em vinhaça.** 2012, 96 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2012.

BOSIO, M. **Produção de hidrogênio e metabólitos em Reator Anaeróbio de Leito Fluidizado e em Reator de Leito Granular Expandido a partir de glicerol**. 2014. 111 f. Dissertação (Mestrado) – Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2014.

BUITRÓN, G.; CARVAJAL, C. Biohydrogen production from Tequila vinasses in an anaerobic sequencing batch reactor: Effect of initial substrate concentration, temperature and hydraulic retention time. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 9071-9077, 2010.

BUNDHOO, M.A.Z.; MOHEE, R. Inhibition of dark fermentative bio-hydrogen production: A review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, p. 6713-6733, 2016.

CAMPOS, J. R.; PEREIRA, J.A.R. Reator anaeróbio de leito expandido/fluidificado. *In*: Campos, J.R. (Coord). **Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbio e disposição controlada no solo.** PROSAB/ABES, 199-219, 1999.

CAVINATO, C.; ROS, C. D.; PAVAN, P.; BOLZONELLA, D. Influence os temperature and hydraulic retention on the production of volatile fatty acids during anaerobic fermentation of cow manure and maize silage. **Bioresource Technology**, v. 223, p. 59-64, 2017.

CHEN, S.; LO, Y.; LEE, K.; HUANG, T.; CHANG, J. Sequencing batch reactor enhances bacterial hydrolysis of starch promoting continuous bio-hydrogen production from starch feedstock. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, p. 8549-8557, 2009.

CHEONG, D. Y.; HANSEN, C. L. Bacterial stress enrichment enhances anaerobic hydrogen production in cattle manure sludge. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 72, p. 635-643, 2006.

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

CHRISTOFOLETTI, C.A.; ESCHER, J.P.; CORREIA, E.J.; MARINHO, J.F.U.; FONTANETTI, C.S. Sugarcane Vinasse: Environmental Implications of its use. **Waste Management**, v. 33, p. 2752-2761, 2013.

CICHELLO, G. C. V.; RIBEIRO, R.; TOMMASO, G. 2012. Caracterização e Cinética do Tratamento Anaeróbio de Efluentes de Laticínios. **UNOPAR Científica, Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 15, n. 1, p. 27 – 40, 2013.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Vinhaça – critérios e procedimentos para aplicação em solos agriculturais.** Norma Técnica P4.231. São Paulo: CETESB; 2006.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). Acompanhamento da Safra Brasileira – Cana-de-açúcar, v. 4, safra 2017/2018, n. 3 – Terceiro levantamento. Dezembro/2017. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/18_01_08_09_08_38_cana_dezembro_novo.pdf> Acesso em: 17 dez. 2017.

CONRAD, R.; WETTER, B. Influence of temperature on energetics of hydrogen metabolism in homoacetogenic, methanogenic, and other anaerobic bacteria. **Archives of Microbiology**, v. 155, p. 94-98, 1990.

CORTEZ, L.; MAGALHAES, P; HAPPI, J. Principais Subprodutos da Agroindústria Canavieira e sua valorização. **Revista Brasileira de Energia**, v. 2, n. 2, 1992.

DAREIOTI, M. A.; VAVOURAKI, A. I.; KORNAROS, M. Effect of pH on the anaerobic acidogenesis of agroindustrial wastewaters for maximization of bio-hydrogen production: A lab-scale evaluation using batch tests. **Bioresource Technology**, v. 162, p. 218-227, 2014.

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

DELFORNO, T. P. **Degradação de surfactante aniônico em reator EGSB sob condição metanogênicas e ferro redutora com água residuárias de lavanderia comercial**. 2014. 204 f. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

DEL NERY, V. **Utilização de lodo anaeróbio imobilizado em gel no estudo da partida de reatores de fluxo ascendente com manta de lodo.** 1987. 187 f. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1987.

DIAS, M. O. S.; FILHO, R.M.; MANTELATTO, P.E.; CAVALETT, O.; ROSSELL, C.E.; BONOMI, A.; LEAL, M.R.L.V. Sugarcane processing for etanol and sugar in Brazil. **Environmental Development**, v. 15, p. 35-51, 2015.

DINSDALE, R. M.; HAWKES, F. R.; Hawkes, D. R. Anaerobic digestion of short chain organic acids in an expanded granular sludge bed reactor. **Water Research**, v. 34, p. 2433-2438, 2000.

DISHISHA, T.; IBRAHIM, M. H. A.; CAVERO, V. H.; ALVAREZ, M. T.; KAUL, R. H. Improved propionic acid production from glycerol: Combining cyclic batch and sequential batch fermentations with optimal nutriente composition. **Bioresource Technology**, v. 176, p. 80-87, 2015.

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

ELBESHBISHY, E.; DHAR, B. R.; NAKHLA, G.; LEE, H. S. A critical review on inhibition of dark biohydrogen fermentation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 79, p. 656-668, 2017.

EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA. **Balanço Energético Nacional 2017: ano base 2016.** Rio de Janeiro, 292 p., 2017. Disponível em: < https://ben.epe.gov.br/BENRelatorioFinal.aspx?anoColeta=2017&anoFimColeta=2016>. Acesso em: 18 dez. 2017.

EPPINGER, J.; HUANG, K. W. Formic acid as a hydrogen energy carrier**. American Chemical Society Energy Letters**, v. 2, p. 188 – 195, 2017.

ESPAÑA-GAMBOA, E.; MIJANGOS-CORTES, J.; BARAHONA-PEREZ, L.; DOMINGUEZ-MALDONADO, J.; HERNÁNDEZ-ZARATE, G.; ALZATE-GAVIRIA, L.

Vinasses: characterization and treatments. **Waste Management & Research**, v. 29, n. 12, p. 1235-1250, 2011.

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

FERNANDES, B. S.; PEIXOTO, G.; ALBRECHT, F. R.; DEL AGUILA, N. K. S.; ZAIAT, M. Potential to produce biohydrogen from various wastewaters. **Energy for Sustainable Development**, v. 14, p. 143-148, 2010.

FERRAZ JUNIOR., A. D. **Digestão anaeróbia da vinhaça de cana de açúcar em reator acidogênicos de leito fixo seguido de reator metanogênico de manta de lodo.** 2013. 164 f. Tese (Doutorado) - Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

FERRAZ JUNIOR, A.D.N.; WENZEL, J.; ETCHEBEHERE, C.; ZAIAT, M. Effect of organic loading rate on hydrogen production from sugarcane vinasse in thermophilic acidogenic packed bed reactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, p. 16852-16862, 2014.

FERRAZ JUNIOR, A.D.N.; ETCHEBEHERE, C.; ZAIAT, M. Mesophilic hydrogen production in acidogenic packed-bed reactors (APBR) using raw sugarcane vinasse as substrate: Influence of support materials. **Anaerobe**, v. 34, p. 94-105, 2015a.

FERRAZ JUNIOR, A.D.N.; ETCHEBEHERE, C.; ZAIAT, M. High organic loading rate on thermophilic hydrogen production and metagenomics study at an anaerobic packed-bed reactor treating a residual liquid stream of a Brazilian biorefinery. **Bioresource Technology**, v. 186, p. 81-88, 2015b.

FERREIRA, T. B. **Produção de hidrogênio e metabólitos solúveis a partir de subprodutos da indústria sucroalcooleira em reator anaeróbio de leito fluidificado termofílico.** 2016. 149 f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

FITZGIBBON, F., SINGH, D., MCMULLAN, G., MARCHANT, R.. The effect of phenolic acids and molasses spent wash concentration on distillery wastewater remediation by fungi. **Process Biochemistry**, v.33, p.799-803, 1998.

FORESTI, E.; FLORÊNCIO, L.; VAN HAANDEL, A.; ZAIAT, M.; CAVALCANTI, P. F. F. Fundamentos do tratamento anaeróbio. **In: CAMPOS, R. (coord.) Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbio e disposição controlada no solo**. Rio de Janeiro: PROSAB. Cap. 2, p. 29 – 52, 1999.

FUESS, L. T. **Biodigestão anaeróbia termofílica de vinhaça em sistemas combinados do tipo acidogênico-metanogênico para potencialização da recuperação de Bioenergia em biorrefinarias de cana-de-açúcar de primeira geração**. 2017. 344 f. Tese (Doutorado) - Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

FUESS, L. T.; GARCIA, M. L. Implications of stillage land disposal: a critical review on the impacts of fertirrigation. **Journal of Environmental Management**, v. 145, p. 210-229, 2014.

FUESS, L. T.; KIYUNA, L. S. M.; GARCIA, M. L.; ZAIAT, M. Operational strategies for log-term biohydrogen production from sugarcane stillage in a continuous acidogenic packed-bed reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, p. 8132-8145, 2016.

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

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

GRANATO, E. F. **Geração de Energia Através da Biodigestão anaeróbia da vinhaça**. 2003. 139 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia da Unesp, Universidade Estadual de São Paulo, Bauru, 2003.

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

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

GUO, X. M.; TRABLY, E.; LATRILLE, E.; CARRÉRE, H.; STEYER, J. Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, p. 10660-10673, 2010.

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

HAFEZ, H.; BAGHCHEHSARAEE, B.; NAKHLA, G.; KARAMANEV, D.; MARGARITIS, A.; NAGGAR, H. E. Comparative assessment of decoupling of biomass and hydraulic retention times in hydrogen production bioreactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, p. 7603-7611, 2009.

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

HALLENBECK, P.C. Fermentative hydrogen production: Principles, progress, and prognosis. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, p. 7379-7389, 2009.

HALLENBECK, P.C.; GHOSH, D. Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward? **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 5, p.287-297, 2009.

HAWKES, F.R.; HUSSY, I.; KYAZZE, G.; DINSDALE, R.; HAWKES, D.L. Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: principles and progress. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 32, p. 172-184, 2007.

IEL/NC; SEBRAE. **O Novo Ciclo da Cana: Estudo sobre a Competitividade do Sistema Agroindustrial da Cana-de-Açúcar e Prospecção de Novos Empreendimentos**. Brasília, 2005. 337 p.

INANC, B.; MATSUI, S.; IDE, S. Propionic Acid Accumulation and Controlling Factors in Anaerobic Treatment of Carbohydrate: effects of H_2 and pH. **Water Science Technology**, v. 34, n. 5 – 6, p. 317 – 325, 1996.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE**). Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (LSPA**). Janeiro-Dezembro. 2017. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9201-levantamento-sistematico-da-producao-agricola.html?&t=resultados>. Acesso em 17 dez. 2017.

INTANOO, P.; RANGSUNVIGIT, P.; NAMPROHM, W.; THAMPRAJAMCHIT, B.; CHAVADEJ, S. Hydrogen Production from Alcohol Wastewater by an Anaerobic Sequencing Batch Reactor Under Thermophilic Operation: Nitrogen and phosphorous uptakes and transformation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, p. 11104 – 11112, 2012.

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

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, p. 8338 – 8342, 2012.

KATO, M.T. **The anaerobic treatment of low strength soluble wastewaters.** Tese de doutorado. Agricultural University of Wageningen, The Netherlands, 1994.

KATO, M. T.; FIELD, J. A.; LETTINGA, G. The anaerobic treatment of low strength wastewater in UASB e EGSB reactors. **Water Science and Technology**, v. 36, p. 375 – 382, 1997.

KHOTARI, R.; SINGH, D. P.; TYAGI, V. V.; TYAGI, S. K. Fermentative hydrogen production – An alternative clean energy source. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, p. 2337-2346, 2012.

KIM D.H.; HAN, S. K.; KIS. H.; SHIN, H. S. Effect of gas sparging on continuous fermentative hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 31, n. 15, p. 2158-2169, 2006.

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

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

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

LAIME, E. M.. Possibilidades tecnológicas para a destinação da vinhaça: uma revisão. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**. V. 5, N. 3, pág. 16, 2011.

LAZARO, C. Z.; PERNA, V.; ETCHEBEHERE, C.; VARESCHE, M. B. A. Sugarcane vinasse as substrate for fermentative hydrogen production: The effects of temperature and substrate concentration. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, p. 6407-6418, 2014.

LETTINGA, G.; DE MAN, A.; VAN DER LAST, A. R. M.; WIEGANT, W.; VAN KNIPPENBERG, K.; FRIJNS, J.; VAN BUUREN, J. C.L. Anaerobic Treatment Of Domestic Sewage And Wastewate. **Water Science and Technology**, v. 27, p. 67-73, 1993.

LETTINGA, G.; HULSHOFF POL, L. W.; ZEEMAN, G., FIELD, J.; VAN LIER, J. B.; VAN BUUREN, J. C. L.; JANSSEN, A. J.H.; LENS, P. **Anaerobic treatment in sustainable environmental production concepts**. Proceedings of the 8th International Conference on Anaerobic Digestion,Sendai, Japan, v. 1, p. 32-39, 1997.

LEE, K. S.; LIN P. J.; CHANG, J. S. Temperature effects on biohydrogen production in a granular sludge bed induced by activated carbon carriers. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 31, p. 465-472, 2006.

LEE, H. S.; SALERNO, M. B.; RITTMANN, B. E. Thermodynamic evaluation on H_2 production in glucose fermentation. **Environmental Science and Technology**, v. 42, n. 7, p. 2401 – 2407, 2008.

LEE, W. S.; CHUA, A. S. M.; YEOH, H. K.; NGOH, G. C. A review of the production and applications of waste-derived volatile fatty acids. **Chemical Engineering Journal**, v. 235, p. 83 – 99, 2014.

LEVIN, D. B.; PITT, L.; LOVE, M. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 29, p. 173–189, 2004.

LIM, S. J.; KIM, T. H. Applicability and trends of anaerobic granular sludge treatment process. **Biomass and Bioenergy**, v. 60, p. 189-202, 2014.

LIN, C. N.; WU, S. Y.; CHANG, J. S. Fermentative hydrogen production with a draft tube fluidized bed reactor containing silicone-gel-imobilized anaerobic sludge. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 31, p. 2200-2210, 2006.

LIU, I.; WHANG, L., REN, W.; LIN, P. The effect of pH on the production of biohydrogen by clostridia: Thermodynamic and metabolic considerations. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, p. 439-449, 2011.

LO, Y.C; CHEN, X.J; HUANG, C.Y; YUAN, Y.J. Dark fermentative hydrogen production with crude glycerol from biodiesel industry using indigenous hydrogen producing bacteria. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, p. 15815-15822, 2013.

LUDOVICE, M.T. **Estudo do efeito poluente da vinhaça infiltrada em canal condutor de terra sobre o lençol freático**. 1997. 143 p. Dissertação (Mestrado) – FEC/UNICAMP, Campinas, 1996.

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

LUO, G.; KARAKASHEV, D.; XIE, L.; ZHOU, Q.; ANGELIDAKI, I. Long-Term Effect of Inoculum Pretreatment on Fermentative Hydrogen Production by Repeated Batch Cultivations: Homoacetogenesis and Methanogenesis as Competitors to Hydrogen Production. **Biotech. Bioeng**, v. 108, n. 8, 2011.

LUO, H.; YANG, R.; ZHAO, Y.; WANG, Z.; LIU, Z.; HUANG, M. Recent advances and strategies in process and strain engineering for the production of butyric acid by microbial fermentation. **Bioresource Technology**, v. 253, p. 343 – 354, 2018.

MARIAKAKIS, I.; MEYER, C.; STEINMETZ, H. Fermentative hydrogen production by molasses: effect of hydraulic retention time, organic loading rate and microbial dynamics. **Hydrogen Energy Challenge and Perspectives**, 2012.

MARQUES, M.O. Aspectos técnicos e legais da produção, transporte e aplicação de vinhaça. In: SEGATO, S. V.; PINTO, A. S.; JENDIROBA, E.; NÓBREGA, J. C. M**. Atualização em produção de cana-de-açúcar.** Piracicaba: Editorial 2006. p. 369-375.

MATHEWS, J.; WANG, G. Metabolic pathway engineering for enhanced biohydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, p. 7404-7416, 2009.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Portaria n. 75, de 05 de março de 2015 - Fixa o percentual obrigatório de adição de etanol anidro combustível à gasolina.

MOHAN, S. V.; BABU, V.L.; SARMA, P.N. Anaerobic biohydrogen production from dairy wastewater treatment in sequencing batch reactor (AnSBR): effect of organic loading rate. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p. 506-515, 2007.

MORAES, B.S.; ZAIAT, M.; BONOMI, A. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil: Challenges and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 44, p. 888-903, 2015.

MOSEY, F.E. Mathematical modeling of the anaerobic digestion process: Regulatory mechanisms for the formation of short-chain volatile fatty acids from glucose. **Water science Technology**, v.15, p.209-232, Copenhagen, 1993.

MOTA, V.T; FERRAZ-JUNIOR, A. D. N.; TRABLY, E.; ZAIAT, M. Biohydrogen production at pH below 3.0: Is it possible? **Water Research**, v. 128, p. 350-361, 2018.

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

NICOLELLA, C.; VAN LOOSDRECHT, M.C.M.; HEIJNEN, J.J. Wastewater Treatment with Particulate Biofilm Reactors. **J. Biotechnol.**, v. 80, n. 1, 2000.

NOBLECOURT, A.; CHRISTOPHE, G.; LARROCHE, C.; FONTANILLE, P. Hydrogen production by dark fermentation from pre-fermented depackaging food wastes. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 864 – 870, 2018.

OH, Y. K.; RAJ, S. M.; JUNG, G. Y.; PARK, S. Current status of the metabolic engineering of microorganisms for biohydrogen production. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 8357-8367, 2011.

OLIVEIRA, B. G.; CARVALHO, J. L. N.; CERRI, C. E. P.; CERRI, C. C.; FEIGL, B. J. Soil greenhouse gas fluxes from vinasse application in Brazilian sugarcane areas. **Geoderma**, v. 200 – 201, p. 77 – 84, 2013.

OTTAVIANO, L. M.; RAMOS, L. R.; BOTTA, L. S.; VARESCHE, B. A.; SILVA, E. L. Continuous thermophilic hydrogen production from cheese whey powder solution in an anaerobic fluidized bed reactor: Effect of hydraulic retention time and initial substrate concentration. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, p. 4848 - 4860, 2017.

OZTURK, S. S. Scale-up and optimization of high density cell culture bioreactors. In: Galindo E, Ramirez OT, editors. Advances in bioprocess engineering. **The Netherlands: Kluwer Academic Publishers**, 1994.

PANWAR, N. L.; KAUSHIK, S.C.; KOTHARI, S. Role of renewable energy sources in environmental protection: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, p. 1513-1524, 2011.

PARANHOS, A. G. de O. **Produção otimizada de 1,3 – propanodiol, ácido propiônico, etanol e hidrogênio a partir de glicrol bruto e cultura mista, em reator anaeróbio de leito fluidificado.** 2016. 142 f. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2016.

PATTRA, S.; LAY, C.; LIN, C.; O-THONG, S.; REUNGSANG, A. Performance and population analysis of hydrogen production from sugarcane juice by non-sterile continuous stirred tank reactor augmented with *Clostridium butyricum.* **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, p. 8697-8703, 2011.

PUGAZHENDHI, A.; ANBURAJAN, P.; PARK, J. H.; KUMAR, G.; SIVAGURUNATHAN, P.; KIM, S. H. Process performance of biohydrogen production using glucose at various HRT and assessment of microbial dynamics variation via q-PCR. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 45, p. 27550-27557, 2017.

QIU, C.; ZHENG, Y.; ZHENG, J.; LIU, Y.; XIE, C.; SUN, L. Mesophilic and thermophilic biohydrogen production from xylose at various initial pH and substrate concentrations with microflora community analysis. **Energy Fuels**, v. 30, n. 2, p. 1013-1019, 2016.

RAMOS, C.; BUITRÓN, G.; MORENO-ANDRADE, I.; CHAMY, R. Effect of the initial total solids concentration and initial pH on the bio-hydrogen production from cafeteria food waste. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, p. 13228 – 13295, 2012.

RAMOS, L. R. **Aplicação de biorreatores anaeróbios em diferentes temperaturas para produção de hidrogênio a partir de águas residuárias agroindustriais**. 2016. 138 f. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2016.

REGO, G. C. **Produção de hidrogênio em reatores anaeróbios de leito fluidificado mesofílico a partir de diferentes substratos orgânicos da indústria sucroalcooleira.** 2016. 119 f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

REIS, C.M.; CAROSIA, M.F.; SAKAMOTO, I.K.; VARESCHE, M.B.A.; SILVA, E.L. Evaluation of hydrogen and methane production from sugarcane in an anaerobic fluidized bed reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, p. 8498- 8509, 2015.

REN, N. Q.; LI, Y. F.; WANG, A. J.; LI, J. Z.; DING, J.; ZADSAR, M. Hydrogen production by fermentation: review of a new approach to environmentally safe energy production. **Aquatic Ecosystem Health & Management**, v. 9, n. 1, p. 39-42, 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, p. 2807-2813, 2010.

REN, N.; GUO, W.; LIU, B.; CAO, G.; DING, J. Biological hydrogen production by dark fermentation: challenges and prospects towards scaled-up production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, p. 365-370, 2011.

REUNGSANG, A; SITTIJUNDA, S; O-THONG, S. Biohydrogen production from glycerol by immobilized *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 on heat-treated UASB granules as affected

by organic loading rate. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, p. 6970 – 6979, 2013.

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

SÁ, L. R. V.; CAMMAROTA, M. C.; OLIVEIRA, T. C.; OLIVEIRA, E. M. M; MATOS, A.; FERREIRA-LEITÃO, V. S. Pentoses, hexoses and glycerin as substrates for biohydrogen production: An approach for Brazilian biofuel integration. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, p. 2986–2997, 2013.

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

SALOMON, K. R.; LORA, E. E. S.; ROCHA, M. H.; OLMO, O. A. del. Cost Calculations for biogás from vinasse biodigestion and its energy utilization. **Sugar Industry/ Zuckerindustrie**, v. 136, n.4, p. 217–223, 2011.

SANTOS, S. C.; ROSA, P. R. F.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M.B.A.; SILVA, E. L. Continuous thermophilic hydrogen production and microbial community analysis from anaerobic digestion of diluted sugar cane stillage. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, p. 9000-9011, 2014a.

SANTOS, S.C.; ROSA, P. R. F.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B. A.; SILVA, E. L. Hydrogen production from diluted and raw sugarcane vinasse under thermophilic anaerobic conditions. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, p. 9599-9610, 2014b.

SANTOS, S. C.; ROSA, P. R. F.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B. A.; SILVA, E. L. Organic loading rate impact on biohydrogen production and microbial communities at anaerobic fluidized thermophilic bed reactors treating sugarcane stillage. **Bioresource Technology**, v. 159, p. 55-63, 2014c.

SARMA, S. J.; PACHAPUR, V.; BRAR, S. K.; BIHAN, Y. L. Hydrogen biorefinery: potential utilization of the liquid waste from fermentative hydrogen production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews,** v. 50, p. 942-951, 2015.

SCARLAT, N.; DALLEMAND, J. Recent developments of biofuels/bioenergy sustainability certification: a global overview. **Energy Policy**, v. 39, p. 1630-1646, 2011.

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, p. 12810-12821, 2011.

SEGHEZZO, L; ZEEMAN, G; VAN LIEL, J.B; H. V. M. HAMELERS, H.V.M; LETTINGA, G. A Review: The Anaerobic Treatment of Sewage in UASB and EGSB Reactors. **Bioresource Technology**, n.65, p. 175-90, 1998.

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

SHI, X.; KIM, D.H.; SHIN, H.S.; JUNG, K.W. Effect of temperature on continuous fermentative hydrogen production from Laminaria japonica by anaerobic mixed cultures. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 225-231, 2013.

SHIDA, G.M.; BARROS, A.R.; REIS, C.M.; AMORIM, E.L.C.; DAMIANOVIC, M.H.R.Z.; SILVA, E.L. Long-Term Stability Of Hydrogen And Organic Acids Production In An Anaerobic Fluidized-Bed Reactor Using Heat Treated Anaerobic Sludge Inoculum. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, p. 3679 – 3688, 2009.

SHOW, K.Y., LEE, D.J., TAY, J.H., LIN, C.Y., CHANG, J.S. Biohydrogen Production: Current Perspectives and the Way Forward. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.37**,** 15616-15631, 2012.

SIMÕES, A. N. **Processamento do glicerol bruto em reatores anaeróbios de leito fluidificado, acidogênico e metanogênico, em temperatura mesofílica**. 2017. 147 f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

SILVA, R. T.; SILVA, T. J.. **Necessidades de P&D na Área Industrial em Vinhaça**. Universidade Federal do ABC, 2012.

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

SYDNEY, E. B.; LARROCHE, C.; NOVAK, A. C.; NOUAILLE, R.; SARMA, S. J.; BRAR, S. K.; LETTI, L. A. J.; SOCCOL, V. T.; SOCCOL, C. R. Economic process to produce biohydrogen and volatile fatty acids by a mixed culture using vinasse from sugarcane ethanol industry as nutrient source. **Bioresource Technology**, v. 159, p. 380-386, 2014.

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, p. 186-190, 2012.

VAN HAANDEL, A. "**Valorização de subprodutos gerados nas destilarias de álcool**", 2003.

VENKATESWAR, R. M.; AMULYA, K.; ROHIT, M.; SARMA, P.; Venkata M. S. Valorization of fatty acid waste for bioplastics production using Bacillus tequilensis: integration with dark-fermentative hydrogen production process. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, p. 7616-7626, 2014.

VI, L. V. T.; SALAKKAM, A.; REUNGSANG, A. Optimization of key factors affecting bio-hydrogen production from sweet potato starch. **Energy Procedia**, v. 138, p. 973-978, 2017.

VIJAYARAGHAVAN, K.; AHMAD, D.; IBRAHIM, M. K. B. Biohydrogen generation from jackfruit peel using anaerobic contact filter. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 31, p. 569-579, 2005.

WALISZEWSKI, K.N., ROMERO, A., PARDIO, V.T. Use of cane condensed molasses solubles in feeding broilers. **Anim. Feed Sci. Technol.**, v. 67, p. 253–258, 1997

WALKER, M. et al. Potential errors in the quantitative evaluation of biogas production in anaerobic digestion processes. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 24, p. 6339-6346, 2009.

WANG, L.; ZHOU, Q.; LI, F. T. Avoiding propionic acid accumulation in the anaerobic process for biohydrogen production. **Biomass and Bioenergy**, v. 30, p. 177–182, 2006.

WANG, J.; LIN, M.; XU, M.; YANG, S. T. Anaerobic Fermentation for Production of Carbolylic Acids as Bulk Chemicals from Renewable Biomass. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 156, p. 323-361, 2015.

WANG, S.; ZHANG, T.; SU, H. Enhanced hydrogen production from corn starch wastewater as nitrogen source by mixed cultures. **Renewable Energy**, v. 96, p. 1135-1141, 2016.

WANG, W.; XIE, L.; LUO, G.; ZHOU, Q. Enhanced fermentative hydrogen production from cassava stillage by co-digestion: The effects of different co-substrates. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, p. 6980-6988, 2013a.

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

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

WANG, J.; WAN, W. Comparision of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing cultures from digested sludge. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, p. 2934-2941, 2008b.

WANG, J.; WAN, W. Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 2, p. 799-811, 2009.

WANG, S.; ZHANG, T.; SU, H. Enhanced hydrogen production from corn starch wastewater as nitrogen source by mixed cultures. **Renewable Energy**, v. 96, p. 1135 – 1141, 2016.

WILKIE, A.C.; RIESEDEL, K.J.; OWENS, J.M. Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstockS. **Biomass and Bioenergy**, v. 19, no. 2, p. 63-102, 2000.

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

WU, S. Y.; LIN, C.N.; CHANG, J.S. Hydrogen Production with Immobilized Sewage Sludge in Three-Phase Fluidized-Bed Bioreactors. **Biotechnology Prog**, v. 19, p. 828−832, 2003.

WU, D.; HAO, C.; LING, J.; JIN, C.; ZHINAN, X.; PEILIN, C. Efficient Separation of Butyric Acid by an Aqueous Two-phase System with Calcium Chloride. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 18, n. 4, p. 533 – 537, 2010.

WU, X.; YANG, H.; GUO, L. Effect of operation parameters on anaerobic fermentation using cow dung as a source of microorganisms. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 15, p. 46 – 51, 2010.

YANG, H.; WANG, Z.; LIN, M.; YANG, S. T. Propionic acid production from soy molasses by *Propionibacterium acidipropionici*: Fermentation kinetics and economic analysis. **Bioresource Technology**, v. 250, p. 1-9, 2018.

YONEDA, N.; KUSANO, S.; YASUI, M.; PUJADO, P.; WILCHER, S. Recent advances in processes and catalysts for the production of acetic acid. **Applied Catalysis A: General**, v. 221, p. 253 – 265, 2001.

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 activated carbon anaerobic fluidized bed reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 32, p. 185-191, 2007.

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