

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Escola de Engenharia de São Carlos

PRODUÇÃO DE BIOHIDROGÊNIO EM REATORES ANAERÓBIOS A PARTIR DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS: COMPREENDENDO O PAPEL DO LEITO FIXO E SUA INFLUÊNCIA NA MICROBIOTA ACIDOGÊNICA

MATHEUS NEVES DE ARAUJO

ORIENTADOR: PROF. TIT. MARCELO ZAIAT

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

MATHEUS NEVES DE ARAUJO

PRODUÇÃO DE BIOHIDROGÊNIO EM REATORES ANAERÓBIOS A PARTIR DE ÁGUAS
RESIDUÁRIAS: COMPREENDENDO O PAPEL DO LEITO FIXO E SUA INFLUÊNCIA NA
MICROBIOTA ACIDOGÊNICA

São Carlos, SP

2022

MATHEUS NEVES DE ARAUJO

PRODUÇÃO DE BIOHIDROGÊNIO EM REATORES ANAERÓBIOS A PARTIR DE ÁGUAS
RESIDUÁRIAS: COMPREENDENDO O PAPEL DO LEITO FIXO E SUA INFLUÊNCIA NA
MICROBIOTA ACIDOGÊNICA

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, com ênfase em Ciências da Engenharia Ambiental.

Orientador: Prof. Tit. Marcelo Zaiat

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos, SP

2022

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).

N658p Neves de Araujo, Matheus
Produção de biohidrogênio em reatores anaeróbios a partir de águas residuárias: compreendendo o papel do leito fixo e sua influência na microbiota acidogênica / Matheus Neves de Araujo; orientador Marcelo Zaiat. São Carlos, 2022.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação e Área de Concentração em Ciências da Engenharia Ambiental -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2022.

1. Distribuição de biomassa. 2. Carga orgânica volumétrica específica convertida. 3. Fermentação láctica capnofílica. 4. Fermentação láctica. 5. Homoacetogênese. 6. PCR/DGGE. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Bacharel **MATHEUS NEVES DE ARAUJO**.

Título da dissertação: "Produção de biohidrogênio em reatores anaeróbios a partir de águas residuárias: compreendendo o papel do leito fixo e sua influência na microbiota acidogênica".

Data da defesa: 12/01/2022.

Comissão Julgadora

Resultado

Prof. Titular **Marcelo Zaiat**

Aprovado

(Orientador)

(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC-USP)

Profa. Associada **Valeria Reginatto Spiller**

Aprovado

(FFCLRP-USP)

Prof. Dr. **Guilherme Peixoto**

Aprovado

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

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental:

Prof. Titular **Marcelo Zaiat**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:

Prof. Titular **Murilo Araujo Romero**

Aos meus pais, Deusimar e Lairson, pilares fundamentais de amor e incentivo.

Aos meus professores, por todos os ensinamentos.

Aos meus queridos amigos, pelos brindes à vida.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Somente eu sei o quão árduo e prazeroso foram esses anos de mestrado. Como disse Caetano Veloso, “Cada um sabe a dor e a delícia de ser o que é”. Inicialmente, agradeço a mim, pela perseverança, pela incessável busca por melhorias, por superar desafios e medos, pela incansável busca de ser menos ignorante e alheio às mazelas e aos mistérios do mundo. Contudo, destaco enfaticamente que nada disso seria possível sem o apoio e a contribuição de muitos.

Agradeço aos meus pais, Deusimar e Lairson, pelas incontáveis privações que fizeram para poder proporcionar a mim condições que muitos não puderem se quer almejar. Amor, incentivo, apoio, reconhecimento, moradia, alimento, vestimentas, lazeres e um núcleo familiar, que apesar de rompido no papel, é sem dúvidas o meu porto seguro e uma fonte imensurável de amor e respeito. Sou muito feliz pela família que somos hoje. Eu amo muito vocês e serei eternamente grato por todas os sacrifícios realizados por mim, principalmente aqueles que visaram garantir minha formação.

A toda a minha grande família! Os momentos perto de vocês foram fundamentais para acalantar o coração e renovar as forças para seguir em frente. Amo todos vocês.

Agradeço ao Professor Marcelo Zaiat (o Tio nos bastidores), por todos os ensinamentos, que transcendem o contexto acadêmico e permeiam pelas mais variadas lições de vida. Agradeço pela paciência (que eu sei que não foi pouca, rs), pela confiança no trabalho (mesmo com ‘devorteios’ aqui e acolá), pelos exemplos de humanidade e competência e por todos os momentos descontraídos e divertidos vivenciados ao longo desses três anos (eita mestrado longo). Professor, você sem dúvidas é fonte de exemplo a admiração. Meus mais sinceros agradecimentos. Obrigado!

Agradeço às professoras e os professores que tive a oportunidade de conviver ao longo de toda a minha formação. Sem vocês nada disso seria possível. Em especial, deixo aqui meus sinceros e cordiais agradecimentos aos professores Júlio César de Souza Ignácio Gonçalves, Guilherme Barbosa e Vinicius Carvalho Rocha, responsáveis por incentivar meu ingresso na ‘vida’ acadêmica. Quantas saudades eu tenho de passar bons momentos ao lado de vocês. Espero poder reencontrá-los em breve.

Um agradecimento mais que especial ao Professor Rogers Ribeiro (o primeiro das ‘capivaras’, para não dizer a atrocidade que o Zaiat disse) e à Professora Giovana Tommaso. Os aprendizados acadêmicos e os momentos vivenciados com vocês foram fundamentais para minha permanência e continuidade no curso de mestrado. Serei eternamente grato. Vocês são pessoas admiráveis!

Aos professores Eugenio Foresti, Márcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic e Frederico Fabio Mauad pelos ensinamentos adquiridos nas disciplinas da pós-graduação.

Às queridas Carol, Janja, Bel e Elô que integram o corpo técnico do Laboratório de Processos Biológicos. Obrigado pelas vivências tão prazerosas e por todo o apoio ao longo destes anos, eu adoro vocês.

Ao Nelson e José Luiz, sempre solícitos e muito competentes com relação aos assuntos relacionados ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental. Obrigado por facilitarem a vida dos alunos!

Aos amigos que fiz durante estes anos de mestrado, com quem pude compartilhar muitos momentos de alegria (e de conflitos e de tristezas, porque a vida para ser boa, precisa ser verdadeira, e uma vida verdadeira contempla esses aspectos), muitos cafés (haja café), muitos ensinamentos e também muitas conversas de temáticas das mais variadas: Dudu (o amigo que todo mundo quer ter), Renanzinho (amizade ímpar e do techno 🎵) Lili (sempre receptiva e solícita, dedicada ao extremo e, claro, trevosa, rs), Mariê (não existe coração mais bonito), Rafa (tão curiosa que chega a doer), Luciana (oi, LUUUUU!) Carol Tavares (simpática, divertida, justa e PRONTO), Henrique (crush eterno), Frã (fala demônio, RÍDICULO!), naCarla (oi, MATHEUXXXX!!! queridaaaaa!!!) Rhayssinha (sentimentos genuínos e alegria de viver em pessoa, aaaa e vinho), Jean (racional que só!), Thitizinho (apesar dos pesares, aprendi muito com você, obrigado), Francisco (el Chico Loco, do ódio ao amor), Pâmela (uma grande amiga, muito obrigado por toda a ajuda!) Pilar (Chigui!), Drica (oiiii!), Guilherme (vulgo Monstrão, gente fina que só), Camilita (vou te matar capivara!), Alex (fala capivaraaaaa véia), Williane (a guerra das geladeiras! Brincadeiras à parte, muito respeito e admiração!), Nath (energia lá em cima), Alana (Math mano, tira esse fone), Felipe (tranquilo!), Luana (oi irmão!), Amanda (Amandinha, rs), Sami (hey, Matheus!), Rodrigão (fala mano!), GHDO (inteligência e competência a gente vê por aqui), Fabrício (gente boníssima!) e tantos outros amigos, Cris, Jaque, Mayara, Rafael (o do Zaiat), Chel, Paulinha, Lucas Maroubo, Bia (IC da Drica), Danilo, Thiago (autóctone), Cebola, Fabrício, Mirian, Bruno (Giz), Jenny, Marina, André, Juliana, Moema, Lauro(n), Fany, Stella, Nayara, Julias (Dedini e Shot!), Zé, Phelipe, Rhennan, Isabele (me perdoem se minha memória não me ajudou a lembrar de todos).

Em especial, meus sinceros agradecimentos ao VILÂME (“sua capivara morfética”). Obrigado pela paciência, amizade e ensinamentos. Você sempre estará em meu coração, Willame, seu lindo! Eu te admiro demais, lazarento. E lembre-se, meu quarto sempre estará à disposição... (“sai pra lá, macho”).

Mais um agradecimento muito especial ao Elias (para os mais íntimos, Zezé, Dad, Paizinho, Cabelinho). Obrigado por compartilhar e brindar a vida comigo, meu amigo. Conviver com você durante esses últimos 9 anos é uma experiência ímpar e carregada de amor, histórias, vivências e muitas ‘loucuras’ (rs). Sua chegada em São Carlos trouxe forças e esperanças para continuar nessa

saga insana da pós-graduação. Conte comigo, sempre, que eu sei que sempre poderei contar com você! Te amo!

Certamente não poderiam faltar sinceros agradecimentos ao Lucas Tadeu (meu pai científico, sim eu tenho dois pais). Obrigado por todos os ensinamentos, macetes, técnicas e atalhos. Se hoje eu tenho capacidade de conduzir uma pesquisa de forma mais independente, com certeza você tem papel fundamental nisso. Os seus ensinamentos e auxílios foram cruciais para o êxito deste trabalho. Muito obrigado! Agradeço também pelo acolhimento, confiança, amizade ímpar, conversas, vivências e aprendizados. Eu admiro muito você (lazarento)!

Aos meus amigos de Ribeirão Preto, irmãos que carregarei sempre em memória e no coração! Vic M, Pedrob, Gui Mendes, Fafa, Tassi, Xistão, Jojo, Vic B, Luque, Romano, Arturito e Xaxá, obrigado pela amizade de longa data e por sempre me incentivar na busca da realização dos meus sonhos.

A todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a conclusão desta etapa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento complementar necessário para realização da pesquisa.

À Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processos 2015/06246-7 e 2019/11012-6, pelo financiamento da bolsa e auxílio financeiro complementar necessário para realização da pesquisa.

À Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), a qual me forneceu às bases para ingressar no Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental.

Por fim, meus agradecimentos à Escola de Engenharia de São Carlos (EESC) e à Universidade de São Paulo (USP), por proporcionar condições para realização de um grande sonho, me tornar mestre.

Muito obrigado!

“Nossa tarefa não é penetrar na essência das coisas, cujo significado de qualquer forma desconhecemos, mas sim desenvolver conceitos que nos permitam falar de modo produtivo sobre os fenômenos da natureza”

Niels Böhr (1885 – 1962) – Físico

“Se quer ir rápido, vá sozinho. Se quer ir longe, vá em grupo. ”

Provérbio Afriacno.

“A melhor coisa a fazer quando se está triste é aprender alguma coisa. Essa é a única coisa que nunca falha. Você pode ficar velho e trêmulo em sua anatomia, pode passar a noite acordado escutando a desordem de suas veias, pode sentir saudades de seu único amor, pode ver o mundo ao seu redor ser devastado por lunáticos malvados ou saber que sua honra foi pisoteada no esgoto das mentes baixas. Só há uma coisa para isso: aprender. Aprender porque o mundo gira e o que o faz girar. Essa é a única coisa da qual a mente não pode jamais se cansar, nem se alienar, nem se torturar, nem temer ou descer, e nunca sonhar em se arrepender. Aprender é o que lhe resta.”

A locução de Merlin ao menino Wart, futuro Rei Arthur, em A espada na Pedra, de T.H. White (1906 – 1964) – Escritor

RESUMO

ARAUJO, M. N. **Produção de biohidrogênio em reatores anaeróbios a partir de águas residuárias: compreendendo o papel do leito fixo e sua influência na microbiota acidogênica.** 2022. 151 p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2022.

A busca por fontes alternativas de combustíveis visando substituir as matrizes energéticas não-renováveis é um tópico altamente relevante e amplamente abordado em pesquisas científicas recentes. A produção biológica de hidrogênio (biohidrogênio-bioH₂) a partir de águas residuárias via processos fermentativos é considerada uma estratégia promissora para substituir as matrizes fósseis nas próximas décadas, além de consistir em um carreador energético renovável capaz de amenizar o aquecimento global. Por mais que a capacidade dos processos fermentativos voltados para a produção de hidrogênio a partir de resíduos orgânicos esteja amplamente relatada na literatura científica, é possível acessar lacunas relacionadas à dinâmica de crescimento e retenção de biomassa em reatores de leito fixo, os quais são fatores fundamentais para o sucesso ou falha do processo. Estudos recentes revelaram lacunas relacionadas à finalidade do leito em reatores de filme-fixo e sua influência na produção de hidrogênio via processos fermentativos, dado o papel pivotante da porção basal do reator na conversão de substrato fresco e no estabelecimento de rotas metabólicas precursoras de bioH₂. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência de diferentes arranjos de imobilização de células (bem como sua ausência) na retenção e lavagem da biomassa e seus efeitos na evolução do bioH₂ e nos perfis metabólicos de um reator anaeróbio tubular (AnTR, o qual não inclui material de suporte), um reator anaeróbio de leito-fixo estruturado (AnSTBR, que inclui material de suporte disposto em um padrão ordenado) e um reator anaeróbio de leito-fixo empacotado (AnPBR, o qual considerou material suporte disposto em um padrão desordenado) operados em condições operacionais equivalentes na câmara de alimentação. A maior produção de bioH₂ foi alcançada no AnSTBR (743,25 mL-H₂ L⁻¹ d⁻¹) em comparação com o AnPBR (662,04 mL-H₂ L⁻¹ d⁻¹) e o AnTR (586,22 mL-H₂ L⁻¹ d⁻¹). No caso do AnSTBR, ocorreu um consumo maciço de carboidratos na câmara de alimentação e no início da zona de leito, ambos compreendendo uma intensa atividade metabólica em comparação com as regiões superiores. Por outro lado, esse padrão foi restrito à câmara de alimentação do AnPBR, enquanto uma fonte alternativa de atividade láctica ocorreu na zona do leito. De modo geral, a presença de material suporte na zona do leito demonstrou ser imperativa para garantir uma retenção adequada de biomassa em termos quanti-qualitativos em oposição à ausência de leito fixo, influenciando a distribuição de biomassa, a conversão específica de substrato, a produção de bioH₂ e as rotas metabólicas estabelecidas.

Palavras-chave: Distribuição de biomassa, Carga orgânica volumétrica específica convertida, Fermentação láctica capnofílica, Fermentação láctica, Homoacetogênese, PCR/DGGE.

ABSTRACT

ARAUJO, M. N. **Biohydrogen production in anaerobic reactors from wastewater: understanding the role of the fixed-bed and its influence on the acidogenic microbiota.** 2022. 151 p. Dissertation (Master's degree) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2022.

The search for alternative sources of fuels aiming to replace non-renewable energy matrices is a highly relevant topic extensively addressed in recent scientific research. The biological production of hydrogen (biohydrogen-bioH₂) from wastewater from fermentative processes is considered a promising strategy to substitute fossil matrices in the coming decades, besides being a renewable energy carrier capable of mitigating global warming. Despite the widely reported capacity of fermentative processes for hydrogen production from organic waste in scientific literature, there are still gaps concerning the dynamics of biomass growth and retention in fixed-film reactors, which are key factors for the success or failure of the process. Recent studies have revealed gaps related to the bed purpose in fixed-film reactors and its influence on biohydrogen (bioH₂) evolution via dark fermentation, given the pivotal role of the basal portion (i.e., feeding chamber) in converting fresh substrate and establishing bioH₂ precursor metabolic pathways, which is opposed to that observed in the bed zone. This study aimed to assess the influence of different cell immobilization arrangements (as well as its absence) on biomass retention and washout and their effects on bioH₂ evolution and metabolic profiles of an anaerobic tubular reactor (AnTR, which does not include support material), an anaerobic structured-bed reactor (AnSTBR, which includes support material laid out in an orderly pattern) and an anaerobic packed-bed reactor (AnPBR, which considers support material laid out in a disorderly pattern) operated under equivalent operating conditions in the feeding chamber. Higher bioH₂ evolution was achieved in the AnSTBR (743.25 mL-H₂ L⁻¹ d⁻¹) compared to the AnPBR (662.04 mL-H₂ L⁻¹ d⁻¹) and AnTR (586.22 mL-H₂ L⁻¹ d⁻¹). For the former, a massive carbohydrate-uptake occurred in the feeding chamber and at the beginning of the bed zone, both comprising an intense metabolic activity versus the upper regions. Conversely, this pattern was restricted to the AnPBR feeding chamber, while an alternative source of lactic activity occurred in the bed zone. Overall, the presence of media in the bed zone proved to be imperative to ensure suitable biomass retention in quanti-qualitative terms in opposition to no-bed, influencing biomass distribution, specific substrate conversion, bioH₂ evolution and metabolic pathways.

Keywords: Biomass distribution, Specific organic conversion rate, Capnophilic lactic fermentation, Lactic acid fermentation, Homoacetogenesis, PCR/DGGE.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Vias biológicas de produção de hidrogênio..... | 40 |
| Figura 2. Rotas metabólicas simplificadas envolvidas na fermentação da glicose..... | 43 |
| Figura 3. Desenho esquemático do aparato experimental..... | 64 |
| Figura 4. Desenho esquemático das características construtivas dos reatores..... | 66 |
| Figura 5. Avaliação de desempenho temporal: (a) eficiência de conversão de carboidratos totais (EC_{CH_4}), (b) produção volumétrica de hidrogênio calculada usando o volume útil (PVH_{VU}), (c) vazão de biogás (VBG), (d) fração de hidrogênio no biogás ($f-H_2$), (e) vazão molar de hidrogênio (MFH), (f) produção volumétrica de hidrogênio calculada usando o volume total (PVH_{VT}), (g) rendimento de hidrogênio (HY), (h) pH e (i) carga orgânica volumétrica removida específica ($COVRe$)..... | 77 |
| Figura 6. Ensaios hidrodinâmicos: (a) curvas de resposta de saída de traçador normalizadas $F(t)$ e (b) curvas de distribuição de tempo de residência $E(t)$ | 79 |
| Figura 7. Retenção de biomassa e conversão de substrato fresco: (a) evolução da biomassa dentro dos reatores e taxas de retenção e (b) variação da carga orgânica volumétrica removida específica ($COVRe$) (período de quase-estado estacionário, dias 22-68)..... | 81 |
| Figura 8. Perfis espaciais: (a, b, c) distribuição de CH_4 e SMP e (d, f, g) padrões de conversão de DQO entre compartimentos. | 85 |
| Figura 9. Perfil temporal dos produtos metabólicos solúveis no (a) AnTR, (b) AnSTBR e (c) AnPBR e avaliação metabólica comparativa em termos de (d) ácido acético-HAc, (e) ácido butírico-HBu, (f) ácido propiônico-HPr, (g) ácido lático-HLa, (h) etanol-EtOH e (f) homoacetogênese..... | 90 |
| Figura 10. Ensaios comparativos de biologia molecular: (a) Dendrograma calculado a partir dos perfis de banda do DGGE para o Domínio <i>Bacteria</i> (correlação de Pearson) e (b) índices de dominância (D), diversidade de Shannon (H') e riqueza relativa (Chao-1)..... | 97 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Produção de bioH ₂ a partir de águas residuárias reais em reatores de leito fixo, com diferentes configurações de leito..... | 59 |
| Tabela 2. Características intrínsecas dos reatores de acordo com os diferentes arranjos de material suporte..... | 65 |
| Tabela 3. Equacionamento empregado no protocolo de cálculo utilizado no monitoramento dos reatores..... | 69 |
| Tabela 4. Métodos analíticos e frequência de análises | 71 |
| Tabela 5. Ensaio de biologia molecular (PCR/DGGE): detalhamento passo a passo..... | 73 |
| Tabela 6. Características hidrodinâmicas: número de reatores de tanque agitado contínuo em série (N-CSTR), tempo médio de retenção hidráulica (θh) e tempo experimental de retenção hidráulica (HRT)..... | 80 |
| Tabela 7. Níveis de distribuição de biomassa e coeficientes de rendimento de crescimento para diferentes configurações de reatores de leito fixo..... | 82 |
| Tabela 8. Balanços de massa: balanço de massa da fase solúvel (BMFS) e balanço de massa global (BMG)..... | 96 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AnFBR:** *anaerobic fluidized-bed reactor* (reator anaeróbio de leito fluidizado)
- AnMBR:** *anaerobic membrane reactor* (reator anaeróbio de membrana)
- AnPBR:** *anaerobic packed-bed reactor* (reator anaeróbio de leito empacotado)
- AnSTBR:** *anaerobic structured-bed reactor* (reator anaeróbio de leito estruturado)
- AnTR:** *anaerobic tubular reactor* (reator anaeróbio tubular)
- AOV:** ácidos orgânicos voláteis
- bioH₂:** biohidrogênio
- BMFL:** balanço de massa da fase líquida
- BMG:** balanço de massa global
- BTU:** *British Thermal Unit* (Unidade Térmica Britânica)
- BY:** *biogas yield* (rendimento de biogás)
- CAPES:** Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- CH_t:** concentração de carboidratos totais
- CNPQ:** Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- COVa:** carga orgânica volumétrica aplicada
- COVe:** carga orgânica volumétrica específica
- COVRe:** carga orgânica volumétrica removida específica
- CV:** coeficiente de variação
- DGGE:** *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* (Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante)
- DQO:** demanda química de oxigênio
- DQO_s:** demanda química de oxigênio solúvel
- DQO_t:** demanda química de oxigênio total
- EESC:** Escola de Engenharia de São Carlos
- EGSB:** *expanded granular sludge-bed reactor* (reator de leito expandido granular)
- FAPESP:** Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- H₂:** hidrogênio
- HAc:** ácido acético
- HBu:** ácido butírico
- HLa:** ácido láctico
- HPr:** ácido propiônico
- HY:** *hydrogen yield* (rendimento de hidrogênio)
- IAE:** *International Agency Energy* (Agência Internacional de Energia)

LPB: Laboratório de Processos Biológicos

PCR: *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

PEBD: polietileno de baixa densidade

PU: poliuretano

PVH: produção volumétrica de hidrogênio

SSV: sólidos suspensos voláteis

UASB: *upflow anaerobic sludge blanket reactor* (reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo)

USP: Universidade de São Paulo

VMH: vazão molar de hidrogênio

VVH: vazão volumétrica de hidrogênio

LISTA DE SÍMBOLOS

f-CO₂: fração de gás carbônico no biogás

f-H₂: fração de hidrogênio no biogás

C/N: relação carbono nitrogênio

CH₀: concentração de carboidratos inicial

CH_{af}: concentração de carboidratos afluente

CH_{ef}: concentração de carboidratos efluente

CO₂: gás carbônico

H₂: hidrogênio molecular

nCO₂: número de mols de gás carbônico

nH₂: número de mols de hidrogênio

Q, Q_{af}: vazão, vazão afluente

Q_{biogás}: vazão de biogás

pH: potencial hidrogeniônico

pH₂: pressão parcial de hidrogênio

T: temperatura

Y_{X/S}: coeficiente de rendimento de crescimento de biomassa

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 31 |
| 2 | PREMISSAS, HIPÓTESE E OBJETIVO DE PESQUISA | 33 |
| 3 | REVISÃO DE LITERATURA | 35 |
| 3.1 | O CONCEITO DE BIORREFINARIA APLICADO AO TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS | 35 |
| 3.2 | ÁGUAS RESIDUÁRIAS COMO MATÉRIA-PRIMA PARA PRODUÇÃO DE BIOH ₂ VIA PROCESSOS FERMENTATIVOS | 36 |
| 3.3 | FUNDAMENTOS DA PRODUÇÃO DE (BIO) HIDROGÊNIO VIA PROCESSOS FERMENTATIVOS | 38 |
| 3.4 | CONFIGURAÇÕES DE REATORES CONTÍNUOS COMUMENTE ADOTADOS PARA A PRODUÇÃO DE BIOHIDROGÊNIO VIA PROCESSOS FERMENTATIVOS | 44 |
| 3.4.1 | Reator Anaeróbico de Mistura Completa (AnCSTR) | 46 |
| 3.4.2 | Reator Anaeróbico de Membrana (AnMBR)..... | 48 |
| 3.4.3 | Reator Anaeróbico de Manta de Lodo e Escoamento Ascendente (UASB) | 49 |
| 3.4.4 | Reator Anaeróbico de Manta de Lodo Expandida (EGSB)..... | 50 |
| 3.4.5 | Reator Anaeróbico de Leito Fluidizado (AnFBR) | 51 |
| 3.4.6 | Reator Anaeróbico de Leito Fixo Empacotado (AnPBR) | 51 |
| 3.4.7 | Reator Anaeróbico de Leito Fixo Estruturado (AnSTBR) | 53 |
| 3.5 | O PAPEL DO ACÚMULO DE BIOMASSA NA PRODUÇÃO DE BIOHIDROGÊNIO | 55 |
| 3.6 | CONSIDERAÇÕES FINAIS DA REVISÃO DE LITERATURA..... | 57 |
| 4 | MÉTODOS E ETAPAS DE PESQUISA | 61 |
| 4.1 | APROXIMAÇÃO EXPERIMENTAL: ENSAIOS HIDRODINÂMICOS, PROJETO DOS REATORES E CONDIÇÕES OPERACIONAIS | 61 |
| 4.2 | PROTOCOLO DE INOCULAÇÃO E ÁGUA RESIDUÁRIA À BASE DE SACAROSE. | 63 |
| 4.3 | MONITORAMENTO DOS REATORES, MÉTODOS ANALÍTICOS E AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO | 66 |
| 4.4 | DESMONTAGEM COMPARTIMENTADA DOS REATORES E ANÁLISES MOLECULARES | 71 |
| 4.5 | ANÁLISES ESTATÍSTICA | 72 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 75 |

| | | |
|-----|---|-----|
| 5.1 | AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO: CONVERSÃO DE SUBSTRATO E PRODUÇÃO DE BIOH ₂ | 75 |
| 5.2 | DISTRIBUIÇÃO DE BIOMASSA E PERFIS ESPACIAIS DE CARBOIDRATOS E PRODUTOS METABÓLICOS SOLÚVEIS | 79 |
| 5.3 | PERSPECTIVAS SOBRE AS ROTAS METABÓLICAS PREDOMINANTES | 89 |
| 5.4 | ENSAIOS COMPARATIVOS DE BIOLOGIA MOLECULAR: PCR/DGGE | 96 |
| 6 | CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS | 101 |
| 7 | RECOMENDAÇÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS | 103 |
| | REFERÊNCIAS | 105 |
| | APÊNDICE A: RESULTADOS DOS TESTES ESTATÍSTICOS DE NORMALIDADE (SHAPIRO-WILK) E HOMOCEDASTICIDADE (LEVENE)..... | 121 |
| | APÊNDICE B: RESULTADOS DO TESTE ESTATÍSTICO DE COMPARAÇÃO PARA VARIÁVEIS QUANTITATIVAS COM DISTRIBUIÇÃO NORMAL (ANOVA), TESTE DE COMPARAÇÃO MÚLTIPLA (TESTE DE TUCKEY OU GAMES-HOWELL)..... | 135 |
| | APÊNDICE C: PERFIS ESPACIAIS DE CARBOIDRATOS TOTAIS E PRODUTOS METABÓLICOS SOLÚVEIS | 145 |
| | APÊNDICE D: BALANÇOS DE MASSA GLOBAL E DA FASE SOLÚVEL..... | 149 |

1 INTRODUÇÃO

Os efeitos sinérgicos das mudanças climáticas aliados às ações antropogênicas e a redução das matrizes de combustíveis fósseis vêm intensificando a busca por fontes alternativas e sustentáveis de energia. Desde a crise do petróleo de 1973, recursos energéticos baseados em biomassas vêm se destacando no cenário nacional devido ao seu caráter renovável. Matérias-primas como a cana-de-açúcar e oleaginosas são amplamente utilizadas como base para produção de biocombustíveis (etanol e biodiesel), além de outros produtos de valor agregado, como o açúcar e óleos vegetais, os quais podem ser associados de forma paralela à cadeia produtiva primária destas commodities. Essa versatilidade produtiva associada à utilização de matérias primas renováveis caracteriza às indústrias que manufaturam produtos baseados em biomassa como biorrefinarias, bem como as qualifica como peças fundamentais dentro da busca por sustentabilidade.

Nas últimas duas décadas, a possibilidade de produção de recursos energéticos e de outras matérias primas de valor agregado a partir de resíduos ricos em matéria orgânica, anteriormente vistos apenas como passivos ambientais, trouxe à tona o conceito de biorrefinarias aplicado ao processamento de biomassas residuais. Dentre a gama de biomassas residuais existentes nas mais diversas cadeias produtivas agroindustriais, as águas residuárias ricas em carboidratos apresentam-se como um potencial recurso para geração de energia e matérias primas de valor agregado a partir de processos biotecnológicos.

O processamento biológico de águas residuárias ricas em carboidratos via processos fermentativos é capaz de produzir biohidrogênio (bioH_2), um carreador energético limpo com elevada densidade energética e versatilidade de aplicações industriais. Os processos fermentativos também podem gerar matérias primas de valor agregado no meio líquido, como ácidos orgânicos e solventes, paralelamente à produção de bioH_2 . Portanto, a produção de bioH_2 via processos fermentativos apresenta grande atratividade por ser capaz de aliar potencial energético à mitigação de impactos ambientais associados às águas residuárias de diversas cadeias produtivas agroindustriais.

Em meio às diferentes configurações de reatores utilizados para a produção de bioH_2 via processos fermentativos, os do tipo leito fixo são considerados promissores, pois promovem o crescimento microbiano aderido e apresentam uma maior capacidade de retenção de biomassa quando comparados às tecnologias de crescimento suspenso. Entretanto, existem relatos de problemas relacionados aos baixos rendimentos e instabilidades dos processos associados a

dinâmica de retenção de biomassa. O acúmulo de biomassa, associado a seleção de determinadas comunidades microbianas, podem ocasionar rotas metabólicas indesejáveis (i.e., rotas que não produzem ou que consomem H_2) e, conseqüentemente, afetar o desempenho dos processos hidrogenogênicos.

Embora os conceitos e aplicações de reatores de leito fixo para produção de $bioH_2$ não sejam temáticas inéditas na literatura científica (BLANCO; OLIVEIRA; ZAIAT, 2019a; FUESS; ZAIAT; NASCIMENTO, 2020; LUCAS et al., 2015; PEIXOTO et al., 2011), estudos vêm demonstrando lacunas sobre qual é o papel fundamental do leito fixo sobre a dinâmica de retenção de biomassa e do desempenho na produção de $bioH_2$ a partir de diferentes arranjos do material suporte (estruturado ou empacotado) (BRAGA, 2014; FUESS et al., 2021a).

Fuess et al. (2021a) demonstraram, ao término da operação de um reator de leito fixo estruturado, que a conversão de substrato fresco (carboidratos) e, conseqüentemente, as rotas primárias de produção de $bioH_2$ ocorreram majoritariamente no compartimento inicial (i.e., na câmara de alimentação), o que proporcionou uma distribuição qualitativa e compartimentada da biomassa retida devido às diferentes disponibilidades de substrato ao longo do reator. Essas observações podem induzir ao seguinte questionamento: se os processos primários de conversão de substrato fresco e produção de $bioH_2$ ocorrem majoritariamente na câmara de alimentação dos reatores, o leito fixo pode ser descartado sem prejuízos ao processo como um todo?

Apesar de Braga (2014) ter demonstrado que a ausência de leito fixo empacotado impactou na dinâmica de retenção de biomassa, na conversão de carboidratos e, conseqüentemente, na produtividade de $bioH_2$ em reatores anaeróbios tubulares, uma comparação direta, com uma visão compartimentada e com uma base comparativa entre diferentes arranjos de leito ainda não foi realizada.

Frente à lacuna e ao questionamento supracitados, a presente pesquisa buscou compreender o papel do leito-fixo a partir da avaliação dos impactos de diferentes arranjos de material suporte (empacotado e estruturado) e ausência de leito-fixo sobre a dinâmica de retenção de biomassa e da produção de $bioH_2$ em diferentes configurações de reatores. Para tanto, os experimentos foram conduzidos por meio da aplicação de condições operacionais semelhantes na câmara de alimentação dos reatores com o intuito de manter uma base comparativa entre os sistemas.

2 PREMISSAS, HIPÓTESE E OBJETIVO DE PESQUISA

Baseando-se nas premissas de que [i] a conversão de substrato (e a consequente produção primária de hidrogênio) ocorre na câmara de alimentação em reatores anaeróbios de leito fixo estruturado, bem como [ii] o tipo de arranjo leito fixo empregado ou a ausência de meio suporte pode impactar negativamente a conversão de substrato e a produção de hidrogênio, coletam-se evidências de que a operação de reatores anaeróbios de leito fixo acidogênicos, em particular o de leito fixo estruturado, têm sido abordada de forma a não levar em consideração a distribuição de biomassa nestes sistemas. Além disso, uma comparação direta que envolva os impactos do arranjo de leito fixo empregado, bem como sua ausência, associada a um protocolo de análise espacial em reatores acidogênicos podem ser capazes de promover uma melhor compreensão dos processos de distribuição de biomassa e os caminhos metabólicos que ocorrem nestes sistemas.

Nesse contexto, formulou-se a seguinte hipótese central na qual a presente pesquisa está pautada, que afirma: **“tanto a ausência quanto diferentes arranjos de leito fixo são fatores capazes de alterar a dinâmica de retenção de biomassa, as rotas metabólicas, os rendimentos e a produção de hidrogênio, além de selecionar diferentes comunidades microbianas em reatores acidogênicos, ainda que as condições operacionais na câmara de alimentação sejam mantidas semelhantes entre si”**.

Desta forma, para confirmar ou refutar tal hipótese foi avaliado **“o papel do leito fixo e do tipo de arranjo (ordenado ou estruturado)”** em sistemas acidogênicos hidrogenogênicos em condição termofílica de temperatura, baseando-se na perspectiva de que a câmara de alimentação dos reatores é responsável pela conversão majoritária de substrato fresco e, consequentemente, pela produção primária de bioH₂ (FUESS et al., 2021a).

3 REVISÃO DE LITERATURA

A seguir são apresentadas informações obtidas a partir de consultas na literatura de referência e que são relacionadas com a temática central de pesquisa. A fim de elucidar a problemática envolvida com a temática central de pesquisa e prover bases conceituais para comparação e discussão dos resultados e formulação das conclusões, foram compiladas informações relacionadas ao [i] conceito de biorrefinaria aplicado ao tratamento de águas residuárias, [ii] à utilização de águas residuárias como matéria prima para a produção de hidrogênio via processos fermentativos, [iii] às diferentes tecnologias de reatores contínuos de alta taxa comumente adotados em sistemas acidogênicos produtores de hidrogênio e [iv] ao papel do acúmulo de biomassa na produção de bioH₂.

3.1 O CONCEITO DE BIORREFINARIA APLICADO AO TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS

O consumo global primário de energia relatado em 2010 foi de $524 \cdot 10^{15}$ BTU. Estima-se que esse consumo crescerá cerca de 50% até o ano de 2050 devido à crescente demanda de nações emergente como p.ex. a Índia, China e Brasil. O uso excessivo de combustíveis fósseis (os quais representam mais 85% das demandas energéticas mundiais), tem sido associado a várias problemáticas ambientais, principalmente com relação a emissão de gases do efeito estufa (GEE) e degradação da qualidade do ar local e regional. De acordo com a Agência Internacional de Energia (IAE – do inglês *International Agency Energy*), a combustão de recursos fósseis é responsável por mais de 90% das emissões de GEE relacionadas à energia (ENERGY INFORMATION ADMINISTRATION (U.S. EIA), 2013; INTERNATIONAL ENERGY AGENCY (IEA), 2011).

Nesse contexto, o desenvolvimento de tecnologias baseadas em fontes renováveis de energia (eólica, solar, hídrica e biomassa) são incentivadas como soluções para lidar com questões como às mudanças climáticas, degradação da qualidade do ar e insegurança energética. Estimativas levantadas pela IAE demonstram que a geração de energia a partir de fontes renováveis em 2014 foi cerca de 40% maior em comparação com 2010, bem como apresentam a maior taxa de crescimento anual dentro do setor energético, contribuindo com cerca de 20% do consumo total de energia gerada no globo. Essa contribuição deve-se em grande parte aos investimentos em pesquisa em biotecnologia combinados com a pressão das políticas globais de energia e ambientais (FALKNER, 2014; SAWATDEENARUNAT et al., 2016).

O conceito de biorrefinaria, definido pela IAE em 2008, consiste no processamento sustentável de biomassas visando a transformação desta matéria prima em um largo espectro de produtos de valor agregado (CHERUBINI, 2010); (FAVA et al., 2013). A aplicação deste conceito em unidades industriais de transformação de matérias primas de origem orgânica, principalmente as que possuem elevado teor de carboidratos, torna possível a produção de diversos bioprodutos, como bioplásticos, fármacos, agroquímicos, biocombustíveis e biogás (CHERUBINI; ULGIATI, 2010; GAIROLA; SMIRNOVA, 2012; MAMMAN et al., 2008).

Nas últimas duas décadas, o conceito de biorrefinaria vem sendo abordado de forma a utilizar como matéria prima biomassas residuais de diversas cadeias produtivas agroindustriais para produção de energia (BLANCO; OLIVEIRA; ZAIAT, 2019a; CORBARI et al., 2019; LUCAS et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2020; PEIXOTO et al., 2011) e de produtos de valor agregado (AGLER et al., 2011; ALBUQUERQUE et al., 2011; DE OLIVEIRA et al., 2019; DIAS et al., 2006; ENG SÁNCHEZ et al., 2021). Nessa abordagem, a utilização da digestão anaeróbia (DA) como processo central de processamento de matérias primas de baixo valor agregado apresenta elevado potencial de conciliar a solução de problemas ambientais relacionados a diversos resíduos orgânicos com cadeias produtivas mais sustentáveis e economicamente atrativas (MORAES; ZAIAT; BONOMI, 2015; POGGI-VARALDO et al., 2014; SURENDRA et al., 2015).

Por mais que os fundamentos e aplicações dos processos anaeróbios estejam consolidados na literatura (ANGELIDAKI; ELLEGAARD; AHRING, 2003; FORESTI; ZAIAT; VALLERO, 2006; LETTINGA, 1995; MCCARTY, 2001; MOSEY, 1983; PALMA et al., 2018), a continuidade de pesquisas que visem o desenvolvimento e melhoria de desempenho de sistemas baseados na digestão anaeróbia (DA) faz-se necessária quando se busca a otimização e maximização do potencial de produção de biogás (hidrogênio e metano) e matérias primas de valor agregado (ácidos orgânicos, solventes, polímeros, enzimas, etc.) a partir de águas residuárias (POGGI-VARALDO et al., 2014).

3.2 ÁGUAS RESIDUÁRIAS COMO MATÉRIA-PRIMA PARA PRODUÇÃO DE BIOH₂ VIA PROCESSOS FERMENTATIVOS

Com o desenvolvimento tecnológico vivenciado nas últimas décadas, a demanda energética vem sendo acrescida com o passar dos anos, o que torna a busca por fontes alternativas e renováveis de energia um pilar fundamental para sustentação das sociedades modernas e para manutenção e preservação do meio ambiente. Nesse contexto, atualmente

existem diversos carreadores de energia cotados para cumprir o papel de fonte sustentável de energia, sendo o hidrogênio considerado uma das chaves fundamentais para solução dos problemas relacionados às mudanças climáticas devido às suas propriedades termodinâmicas associadas a uma combustão limpa e versatilidade de aplicações (JAIN, 2009; MOMIRLAN; VEZIROGLU, 2005).

Além de ser uma alternativa aos combustíveis baseados em carbono, sua atratividade está relacionada a capacidade de ser produzido a partir de fontes renováveis e não renováveis de energia, o que caracteriza um cenário de diversidade de matérias primas para sua produção e garante uma maior segurança energética. Além disso, o hidrogênio pode ser utilizado em sistemas modernos de geração de energia de alta eficiência, como p.ex. as células combustíveis, bem como servir de reagente em variadas indústrias químicas para produção de fertilizantes, para o refino de petróleo e na síntese industrial de amônia (EDWARDS et al., 2008; GUO et al., 2010).

Entretanto, o maior desafio para utilização de hidrogênio como fonte energética reside no desenvolvimento de processos de produção sustentáveis e baseados em viabilidade técnico-econômica, além de otimizações das tecnologias de armazenamento. Atualmente, a maior parte do hidrogênio utilizado em atividades antrópicas é obtido a partir de métodos convencionais de produção que são baseados na utilização de matérias primas fósseis, i.e., não renováveis (GHIMIRE et al., 2015; KHAN et al., 2018).

De acordo com Balat (2008), o hidrogênio utilizado em aplicações comerciais vem sendo produzido a partir de reforma a vapor do gás natural (48%) e do petróleo (30%), além de outros métodos industriais como gaseificação do carvão (18%) e eletrólise da água (4%). Esses métodos produtivos envolvem, de forma direta ou indireta, a utilização de combustíveis fósseis para produção de hidrogênio, o que descaracteriza o H_2 produzido como uma fonte de energia sustentável, renovável e ambientalmente adequada.

A produção de H_2 a partir de processos biológicos ($bioH_2$) que utilizam fontes renováveis ou até mesmo resíduos como matéria prima, é considerada uma abordagem promissora para enquadrá-lo como uma matriz energética sustentável. Nesse contexto, a produção de $bioH_2$ a partir de resíduos orgânicos oriundos das mais diversas cadeias produtivas agroindustriais é capaz de associar a produção de energia com a mitigação dos impactos ambientais relacionados aos diversos compostos orgânicos que compõem essas matérias primas, conferindo um caráter sustentável e até mesmo renovável aos processos produtivos (BATISTA et al., 2015; DHAR et al., 2015).

Sistemas produtores de bioH₂ por meio de processos fermentativos são capazes de utilizar diversas fontes de carbono como matéria prima devido a ampla versatilidade enzimática dos microrganismos envolvidos nesses processos (DAS, 2009). Devido à natureza bioquímica dos processos fermentativos, as águas residuárias ricas em carboidratos são notoriamente favoráveis para produção de bioH₂, bem como para produção de ácidos orgânicos voláteis e até mesmo degradação de compostos por meio de processos de co-metabolismo, o que as tornam fontes promissoras para a recuperação energética associada a mitigação de possíveis impactos ambientais (CARNEIRO et al., 2020a; DAS; VEZIROĞLU, 2001; NIKOLAIDIS; POULLIKKAS, 2017).

O tipo de substrato utilizado desempenha um importante papel sobre as taxas de produção e na viabilidade econômica do processo. Substratos ricos em carboidratos como glicose, sacarose e misturas de amido vem sendo amplamente utilizados em estudos para produção de bioH₂ via processos fermentativos. Esta abordagem é compreendida no contexto científico devido a maior facilidade de análise e entendimento dos processos bioquímicos envolvidos quando comparado a substratos complexos, como é o caso das águas residuárias reais compostas por fontes de carbono diversas. Contudo, vale destacar que uma produção sustentável e ambientalmente adequada de hidrogênio necessariamente requer a utilização de matérias primas oriundos de fontes renováveis (GHIMIRE et al., 2015; HAWKES et al., 2007; REN et al., 2011; WANG; WAN, 2009).

Atualmente, existem diversos estudos apresentados na literatura que abordam a utilização de água residuárias complexas para produção de bioH₂ e apresentam faixas de produtividade e rendimentos que demonstram o elevado potencial dos processos fermentativos para esta finalidade. Além disso, a viabilidade produtiva de bioH₂ para diversas águas residuárias reais vem sendo avaliada juntamente a diferentes configurações de biorreatores (CORBARI et al., 2019; FERRAZ JÚNIOR; ETCHEBEHERE; ZAIAT, 2015; FUESS; ZAIAT; NASCIMENTO, 2020; LUO et al., 2010).

3.3 FUNDAMENTOS DA PRODUÇÃO DE (BIO) HIDROGÊNIO VIA PROCESSOS FERMENTATIVOS

O hidrogênio obtido por meio de processos biológicos (biohidrogênio-bioH₂) pode ser produzido a partir de duas rotas distintas, sendo elas [i] a rota dos processos foto-dependentes (biofotólise da água e foto-fermentação) e [ii] a rota dos processos foto-independentes (processos fermentativos e células de eletrólise microbiana). Além das diferenças entre os

grupos de microrganismos envolvidos e da necessidade de radiação luminosa, essas rotas podem ser distinguidas de acordo com a necessidade de diferentes fontes de carbono de origem orgânica ou inorgânica (GHIMIRE et al., 2015; HALLENBECK; BENEMANN, 2002).

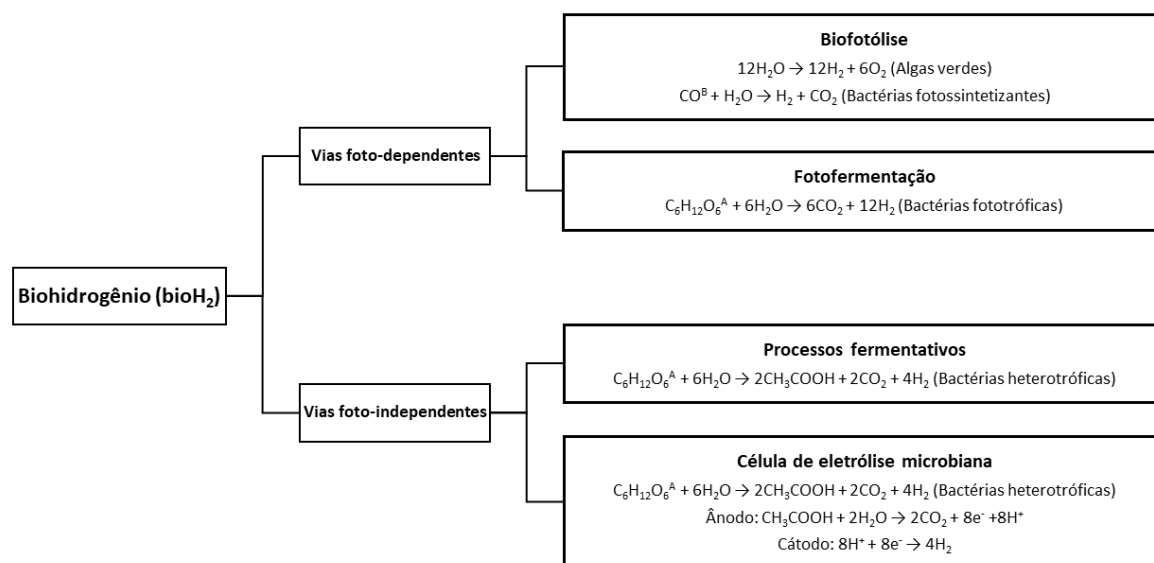
A Figura 1 apresenta um fluxograma das vias biológicas de produção de hidrogênio e suas respectivas particularidades com relação a dependência de fontes luminosas e necessidades de fontes de carbono de acordo com suas origens. Em geral, todas as vias biológicas de produção de bioH₂ apresentam aspectos favoráveis que sugerem a utilização destes processos como métodos para superar os desafios relacionados aos impactos ambientais decorrentes da utilização de fontes fósseis de energia. Contudo, aspectos tecnológicos e econômicos configuram cenários desfavoráveis para utilização desses processos em contrapartida aos combustíveis fósseis (DAS; VEZIROĞLU, 2008; GHIMIRE et al., 2015; HALLENBECK; BENEMANN, 2002).

Aspectos como baixas de produção de bioH₂, baixas eficiências de utilização de substrato (i.e., baixos rendimentos), necessidade e sensibilidade de faixas estreitas de oxigênio, fontes específicas de carbono, necessidade de ciclos claro-escuro e a baixa disponibilidade de luz no interior dos sistemas em grande escala, resultam em dificuldades de integrar os processos foto-dependentes em sistemas de tratamento de águas residuárias baseados no conceito de biorrefinarias (HALLENBECK; ABO-HASHESH; GHOSH, 2012).

Em contrapartida, os processos foto-independentes, em particular os processos fermentativos, demonstram maior factibilidade quando se almeja uma produção de bioH₂ em grande escala devido a aspectos como produções contínuas associadas a elevadas taxas de produção, capacidade de conversão de frações orgânicas presentes em diversos substratos orgânicos (principalmente as biomassas residuais ricas em carboidratos), produção de produtos metabólitos de elevado valor agregado, ausência da necessidade de aeração e independência luminosa (BOBOESCU et al., 2016; GUO et al., 2010; KUMAR et al., 2016; SIVAGURUNATHAN et al., 2016).

De acordo com Holladay et al. (2009) e Nikolaidis e Poullikkas (2017), os processos fermentativos podem apresentar taxas de produção de bioH₂ cerca de 23 a 1728 vezes maiores quando comparado com os processos foto-dependentes, além de exigirem volumes reacionais cerca de 22 a 1707 vezes menores. Esses aspectos imprimem o elevado potencial de viabilidade técnica e econômica para a aplicação dos processos fermentativos em cadeia produtoras de energia e de materiais de valor agregado. Em outras palavras, a utilização dos processos fermentativos pode ser considerada uma via biotecnológica notoriamente adequada para aplicação do conceito de biorrefinarias em sistemas de tratamento de águas residuárias.

Figura 1. Vias biológicas de produção de hidrogênio.



Fonte: Adaptado de Ghimire et al. (2015). Legenda: ^Acarbono orgânico; ^Bcarbono inorgânico.

As principais barreiras dos processos fermentativos são relacionadas a temas como a compreensão e seleção das comunidades microbianas envolvidas e o entendimento da conversibilidade das biomassas adotadas como matérias primas associada a um efetivo direcionamento do metabolismo microbiano. Contudo, essas barreiras demonstram maior capacidade de serem superadas com as ferramentas técnico-científicas já desenvolvidas quando comparadas com as barreiras dos processos foto-dependentes e de sistemas de células de eletrólise microbiana, tendo em vista a necessidade intrínseca de desenvolvimento de sistemas tecnologicamente mais complexos. Além disso, estas barreiras são associadas de forma direta ou indireta à configuração de reator adotado, fundamental para o desenvolvimento e aplicação de tecnologias em grande escala (BABU; MOHAN; SARMA, 2009; BOBOESCU et al., 2016; GHIMIRE et al., 2015).

Além das vantagens supracitadas, os processos fermentativos desempenham um papel fundamental no processo de digestão anaeróbia (DA). Mais especificamente, integram a primeira etapa da DA, frequentemente denominada de acidogênese (MOSEY, 1983; STAMS; PLUGGE, 2009). Em linhas gerais, aprofundar os conhecimentos relacionados aos processos fermentativos pode auxiliar na melhoria de desempenho de sistemas que visam a utilização de substratos fermentados em sistemas baseados em dois estágios, como p.ex. a recuperação de energia via reatores metanogênicos (FUESS et al., 2017a; MOTA; ZAIAT, 2018; WANG et al., 2013), ou na otimização da produção de ácidos orgânicos

de elevado valor agregado (i.e.: ácido lático, ácido capróico, ácido butírico) (AGLER et al., 2011; CAVALCANTE et al., 2020; ENG SÁNCHEZ et al., 2021).

A produção de H₂ em ambientes anaeróbios a partir da conversão de substratos ricos em carboidratos decorre da redução de prótons (H⁺) em paralelo à oxidação de carbono presente na estrutura molecular da matéria orgânica devido a ação das enzimas hidrogênase e ferredoxina oxirredutase, as quais são responsáveis pelo transporte de elétrons no meio reacional (DAS; VEZIROĞLU, 2001, 2008; GHIMIRE et al., 2015; LI; FANG, 2007; WANG; WAN, 2009).

Partindo da glicose como monossacarídeo base e preferencial para produção de bioH₂, os microrganismos acidogênicos a convertem em piruvato a fim de produzir adenosina trifosfato (ATP – biomolécula responsável pela manutenção energética celular) por meio do processo de glicólise. Esse processo é mediado pela ação da espécie reduzida da nicotinamida adenina dinucleotídeo sobre os prótons de hidrogênio (NAD⁺ + H⁺ → NADH) e pela fosforilação da adenosina difosfato (ADP + P_i → ATP) (Figura 2). Em termos bioquímicos, a produção de bioH₂ a partir de processos fermentativos está diretamente relacionada ao balanço de NAD⁺/NADH no meio reacional. Assim dizendo, a regeneração de NAD⁺ é um fator fundamental para manter o equilíbrio do fluxo de elétrons durante os processos fermentativos. Em situações de desequilíbrio, i.e., acúmulo de NADH no meio reacional, podem ocorrer desvios das rotas metabólicas no sentido de buscar o reestabelecimento do fluxo de elétrons, o que pode acarretar prejuízos na produção de bioH₂ (HALLENBECK; BENEMANN, 2002; LI; FANG, 2007; SAADY, 2013).

Nesse contexto, pode-se distinguir os caminhos metabólicos recorrentes nos processos fermentativos como: rotas produtoras de hidrogênio (redução de NAD), rotas consumidoras de hidrogênio (oxidação de NADH) e rotas que não geram hidrogênio (redução de NAD seguida da oxidação de NADH previamente gerado). Outra classificação pertinente para compreensão e análise de sistemas produtores de hidrogênio é a diferenciação entre fermentação primária e secundária (AGLER et al., 2011; HARPER; POHLAND, 1986; MCCARTY, 2001).

Após o processo de glicólise, existem duas rotas metabólicas capazes de produzir hidrogênio quando há um balanço favorável das espécies reduzidas e oxidadas de NAD, sendo elas a rota do ácido acético (HAc) e do ácido butírico (HBu). Ambas ocorrem a partir da oxidação das moléculas de piruvato em acetil coenzima A (acetil-CoA), o que gera dióxido de carbono (CO₂) e bioH₂ por meio da ação das enzimas hidrogenase e ferredoxina oxirredutase (Figura 2) (AGLER et al., 2011; GHIMIRE et al., 2015; LI; FANG, 2007).

No caso da rota de produção de HAc, acetil-CoA é convertida em acetato sem o intermédio de espécies de NADH com a finalidade de gerar ATP (fosforilação a nível de substrato), o que não restabelece um balanço favorável de NAD^+ previamente oxidado na etapa de glicólise, e acaba por proporcionar um rendimento de hidrogênio (HY) teórico máximo de $4 \text{ molH}_2 \text{ mol}^{-1} \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ¹. Na rota do HBU, butiril-CoA é utilizado como precursor para geração de ATP mediado pela fosforilação a nível de substrato. Devido a este mecanismo de oxidação de NADH, a rota do HBU proporciona uma reposição de NAD^+ no ambiente. Em outras palavras, a rota do HBU é capaz de restabelecer NAD^+ para o meio reacional celular associado à produção de bioH_2 , bem como apresenta um HY teórico máximo de $2 \text{ mol-H}_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$.

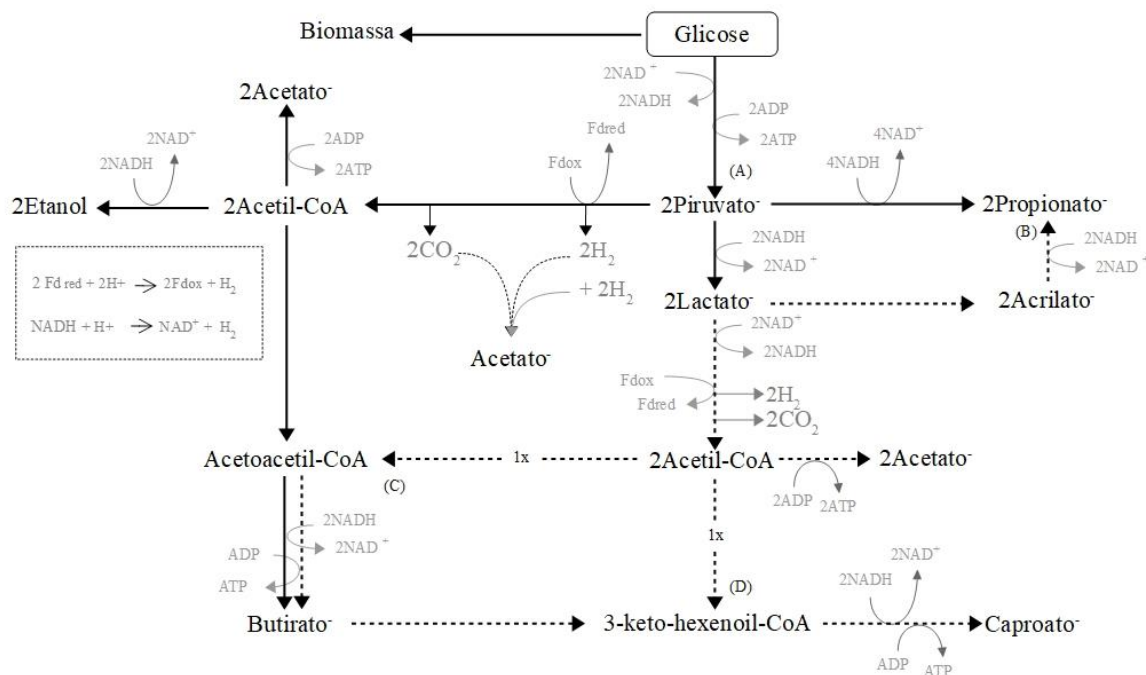
Produtos metabólicos como etanol (EtOH) e ácido láctico (HLA) produzidos pela via do piruvato decorrem do desbalanceamento das espécies de NAD^+ e NADH associado a presença de microrganismos capazes de seguir estes caminhos metabólicos. Neste contexto, as espécies reduzidas NADH são oxidadas a fim de promover o restabelecimento de NAD^+ para o meio celular. Portanto, devido ao consumo de NADH, as rotas metabólicas associadas a geração de EtOH e HLa não são capazes de promover geração de bioH_2 (AGLER et al., 2011; GHIMIRE et al., 2015; LI; FANG, 2007).

Em casos extremos de desequilíbrio de NAD^+/NADH (i.e., acúmulo excessivo de NADH, o que implica em uma razão NAD^+/NADH muito próxima a zero) em associação a determinados grupos de microrganismos presentes no meio reacional, rotas metabólicas capazes de oxidar NADH podem ocorrer a fim de promover o reestabelecimento do equilíbrio de elétrons. As rotas produtoras de ácido propiônico (HPr) pela via do piruvato e pela via do acrilato promovem um decréscimo nos rendimentos de hidrogênio em processos fermentativos devido a este consumo de NADH e, conseqüentemente, de bioH_2 .

Outros produtos metabólicos como os solventes gerados a partir do acetoacetil-CoA, denominados de produtos metabólicos secundários, promovem a oxidação de NADH e, conseqüentemente, reduções nos rendimentos de hidrogênio. Além disso, metabólitos como HAc, HPr, HBU e ácido capróico (HCp) podem ser formados a partir da utilização de produtos primários por meio da ação de microrganismos capazes de realizar rotas metabólicas específicas (Figura 2), denominadas de fermentação secundária. Desta forma, a geração de HAc, HPr, HBU e HCp e as respectivas rotas produtoras são intrinsecamente relacionadas às condições ambientais e à disponibilidade de substratos específicos no meio reacional (AGLER et al., 2011; GHIMIRE et al., 2015).

¹ No decorrer do texto, a notação $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ será atribuída a molécula de glicose. Outras moléculas de mesma fórmula molecular serão referidas a partir de seus respectivos nomes (p.ex.: frutose).

Figura 2. Rotas metabólicas simplificadas envolvidas na fermentação da glicose.



Fonte: Adaptado de Saady (2013) and Stams and Plugge (2009). Legenda: fermentação primária (setas contínuas); fermentação secundária (setas serrilhadas); glicólise (A); rota do acrilato para propionato (B); β -oxidação reversa para butirato (C) e β -oxidação reversa para caproato (D).

A dinâmica metabólica envolvida no processo de produção e consumo de hidrogênio nos processos fermentativos está relacionada diretamente com a autorregulação sintrófica das comunidades microbianas, que pode ser influenciada por fatores que condicionam as características do meio reacional, como p.ex.: pH, temperatura, pressão parcial de hidrogênio (P_{H_2}), comunidades microbianas envolvidas e disponibilidade de substratos. Desta forma, a sensibilidade das rotas metabólicas a estes fatores associada a uma complexa dinâmica de crescimento e retenção celular podem explicar as variações dos rendimentos de hidrogênio observadas em sistemas acidogênicos hidrogenogênicos que utilizam culturas mistas como biocatalisadores (CHAGANTI; KIM; LALMAN, 2011; NATH; DAS, 2004; RODRÍGUEZ et al., 2006).

A produção de bioH₂ em sistemas baseados nos processos fermentativos depende de diversos fatores como como: pH (DE GIOANNIS et al., 2014; LEE; MIYAHARA; NOIKE, 2002), tempo de detenção hidráulica (TDH) (KUMAR et al., 2014; SIVAGURUNATHAN et al., 2017), carga orgânica volumétrica aplicada (COV_a) (FERRAZ JÚNIOR et al., 2014; FERRAZ JÚNIOR; ETCHEBEHERE; ZAIAT, 2015), carga orgânica volumétrica específica (COV_e) (ANZOLA-ROJAS et al., 2015; FUESS et al., 2016), temperatura (T)

(GADOW et al., 2013; SIVAGURUNATHAN; SEN; LIN, 2014), origem e concentração das fontes de carbono (GORGEC; KARAPINAR, 2019; LUCAS et al., 2015), P_{H_2} , concentração de íons metálicos, além das configurações dos biorreatores (BLANCO; FUESS; ZAIAT, 2017; GHIMIRE et al., 2015).

3.4 CONFIGURAÇÕES DE REATORES CONTÍNUOS COMUMENTE ADOTADOS PARA A PRODUÇÃO DE BIOHIDROGÊNIO VIA PROCESSOS FERMENTATIVOS

Antes da década de 1960, a utilização dos processos anaeróbios para tratamento de águas residuárias enfrentava problemas como baixas taxas de crescimento microbiano e dificuldades no controle dos processos. Estes problemas estavam relacionados a dificuldade das unidades operacionais em promover um grau de mistura capaz de garantir um contato efetivo entre substratos e microrganismos, o que implicava em elevados tempos de detenção hidráulica (TDH) e baixos desempenhos. Esse baixo desempenho associado a elevados TDH inviabilizavam a aplicação da DA nas unidades centrais de tratamento de águas residuárias de elevada carga orgânica na época (FIELD; SIERRA; LETTINGA, 1988; MARAGNO; CAMPOS, 1992).

Esses problemas foram sendo superados conforme o entendimento dos processos metabólicos dos microrganismos envolvidos no processo foi aprofundado em conjunto com a concepção de reatores mais modernos. Tecnologias de alta taxa como os reatores de manta de lodo, os reatores de leito fixo, os reatores de leito fluidizado e os reatores de leito expandido foram capazes de contornar os problemas por meio de mecanismos de imobilização da biomassa, o que possibilitou a desvincular o tempo de retenção celular (TRC) do TDH. A capacidade de desvincular o TRC do TDH possibilitou melhores desempenhos aos processos de tratamento baseados na DA devido a uma maior eficiência de contato entre os microrganismos e os substratos passíveis de serem metabolizados, bem como um maior controle e manutenção de quantidades adequadas de biomassa nos sistemas (FORESTI; ZAIAT; VALLERO, 2006; HICKEY et al., 1991; LETTINGA et al., 1980; SCHINK, 2002).

Todos os processos modernos de tratamento biológico de águas residuárias são baseados no conceito de um tempo de contato efetivo entre os microrganismos e substratos, o que viabiliza a aplicação de elevadas cargas orgânicas e um processamento mais efetivo das águas residuárias em contrapartida aos primeiros digestores anaeróbios (tanques de contato). A capacidade de aplicação de elevadas cargas orgânicas nas unidades de tratamento biológico de

águas residuárias caracteriza essas unidades como reatores de alta taxa. As diversas tecnologias de reatores de alta taxa se baseiam em mecanismos de retenção de biomassa, como p.ex.: [i] recirculação da biomassa lavada pela corrente efluente dos sistemas, [ii] formação de grânulos sedimentáveis e gerados por mecanismos de autoimobilização; [iii] retenção de agregados de biomassa associada a formação de biofilme em meio suporte fixado ao corpo do reator (RAJESHWARI et al., 2000).

De acordo com Stazi e Tomei (2018), uma efetiva dinâmica de retenção de biomassa pode compensar as baixas taxas de crescimento microbiano das comunidades anaeróbias e, portanto, favorecer a aplicação dos processos anaeróbios para uma grande variedade de condições ambientais e de águas residuárias.

Em linhas gerais, as tecnologias de biorreatores utilizadas para produção de bioH₂ via processos fermentativos ainda podem ser divididas em dois grupos de acordo com o tipo de crescimento microbiano recorrente, sendo: [i] os reatores de crescimento suspenso e [ii] os reatores de crescimento aderido. Apesar destes diferentes tipos de crescimento microbiano serem observados simultaneamente nos processos baseados na DA, diferentes configurações de biorreatores são capazes de promover de forma mais expressiva um tipo de crescimento em detrimento do outro.

Dentre os sistemas de crescimento suspenso desatacam-se o reator de mistura completa (AnCSTR – do inglês *Anaerobic Continuous Stirred Tank Reactor*) e o reator anaeróbio de membrana (AnMBR – do inglês *Anaerobic Membrane Bio Reactor*). Para os sistemas de crescimento imobilizado/aderido destacam-se o reator anaeróbio de manta de lodo e escoamento ascendente (UASB – do inglês *Upflow Anaerobic Sludge Blanket*), o reator anaeróbio de manta de lodo expandido (EGSB – do inglês *Expanded Granular Sludge-Bed*), o reator anaeróbio de leito fluidizado (AnFBR – do inglês *Anaerobic Fluidized-Bed Reactor*), o reator anaeróbio de leito fixo empacotado (AnPBR – do inglês *Anaerobic Packed-Bed Reactor*) e o reator anaeróbio de leito fixo estruturado (AnSTBR – do inglês *Anaerobic Structured-Bed Reactor*) (ANZOLA-ROJAS et al., 2015; JUNG et al., 2011a; LEITE et al., 2008).

Outra classificação relevante que engloba os pontos de vista tecnológico, econômico e ambiental sobre as diferentes tecnologias de biorreatores disponíveis, refere-se à necessidade de utilização de recursos energéticos intrínsecos para o funcionamento de determinadas configurações. Tecnologias que utilizam como unidades centrais de bioprocessamento reatores CSTR, AnMBR, EGSB e AnFBR, exigem a utilização de equipamentos indispensáveis para que possam funcionar de acordo com as suas concepções de projeto, como p.ex., bombas de

recirculação e misturadores mecânicos, o que, naturalmente, emprega necessidades energéticas intrínsecas aos processos de tratamento.

A utilização de equipamentos que exigem recursos energéticos para o devido funcionamento das tecnologias supracitadas está relacionada às peculiaridades conceptivas de cada um dos sistemas, como p.ex.: a mistura do meio reacional (CSTR), a necessidade de elevadas cargas hidráulicas para permeabilidade do efluente pela membrana (AnMBR), a expansão da manta de lodo (EGSB) e a fluidificação do meio suporte (AnFBR).

No caso das tecnologias de leito fixo (AnPBR e AnSTBR) e na tecnologia baseada em autoimobilização de biomassa (UASB), uma menor demanda energética é requerida devido a concepção destas tecnologias que não exigem a utilização de equipamentos para as devidas funcionalidades operacionais. Consequentemente, essas configurações de biorreatores sugerem apresentar melhores rendimentos energéticos globais em relação as tecnologias que requerem uma demanda energética intrínseca (AnCSTR, AnMBR, EGSB e AnFBR).

A seguir as configurações de reatores supracitadas serão abordadas com enfoque para a relação da dinâmica de biomassa e a produção de hidrogênio a partir de processos fermentativos, bem como particularidades de cada uma das configurações tecnológicas.

3.4.1 Reator Anaeróbio de Mistura Completa (AnCSTR)

O AnCSTR basicamente consiste em um tanque agitado e operado continuamente sob condições de anaerobiose. Em teoria, o AnCSTR garante um contato efetivo entre substrato e microrganismos devido ao elevado grau de mistura do meio reacional associado a um crescimento microbiano suspenso (células livres), o que facilita a liberação de hidrogênio do meio reacional.

Devido ao crescimento suspenso e ao elevado grau de agitação, características como a liberação facilitada de hidrogênio, redução dos efeitos de inibição causado por compostos tóxicos e facilidades de projeto, operação e análise, tornam o AnCSTR uma configuração de reator amplamente abordada em estudos que envolvem a produção de bioH₂. Entretanto, por mais que esta tecnologia tenha sido idealizada e analisada sob a perspectiva de um crescimento microbiano suspenso, em sistemas acidogênicos, as bactérias produtoras de hidrogênio podem rapidamente flocular e granular (FANG; LIU; ZHANG, 2002; JUNG et al., 2011b), o que destoa das bases de concepção e projeto da tecnologia AnCSTR e pode impactar os processos de produção de bioH₂.

A retenção de biomassa em reatores de mistura completa está estritamente relacionada ao TDH. Desta forma, o TDH torna-se um parâmetro operacional fundamental para o controle e manutenção da quantidade de biomassa retida em reatores AnCSTR, sendo capaz de afetar a eficiência de consumo de substrato, a população microbiana e as rotas metabólicas recorrentes (NUALSRI; KONGJAN; REUNGSANG, 2016; WANG et al., 2013).

Devido ao acoplamento entre TDH e TRC em reatores do tipo AnCSTR e ao metabolismo inerente aos microrganismos hidrogenogênicos e hidrogenotróficos, processos que visam a produção de bioH_2 podem ser menos efetivos em relação a sistemas que adotam configurações de reatores que desvinculam estes parâmetros operacionais. Desvincular o TDH do TRC pode proporcionar maiores COVa e maiores produções de hidrogênio devido a um menor TDH associado a uma maior retenção de microrganismos produtores de hidrogênio (JUNG et al., 2011b). Além disso, de acordo com (CHANG; LEE; LIN, 2002), TRC muito elevados podem ocasionar o estabelecimento de microrganismos consumidores de hidrogênio ou até mesmo microrganismos competidores em relação às cepas hidrogenogênicas, em outras palavras, cepas que utilizam o substrato primário e não produzem hidrogênio.

Existem duas maneiras de se desvincular o TDH do TRC em reatores contínuos de mistura completa, sendo elas: [i] o reciclo da biomassa lavada e adensada em um sedimentador, o mesmo método amplamente utilizado em sistemas aeróbios de tratamento de águas residuárias, o qual é comumente conhecido como lodos ativados; e/ou [ii] por meio da adição de material suporte no meio reacional.

O método de reciclo de biomassa pode configurar um ambiente inviável para produção de bioH_2 em sistemas fermentativos hidrogenogênicos quando utilizada a fim de controlar a retenção de biomassa. Devido aos parâmetros operacionais e fatores ambientais como comportamento hidrodinâmico, pH, TDH, disponibilidade de substrato fresco, alcalinidade e T serem diferentes na unidade de separação de sólidos em relação a unidade central de processamento (i.e., o próprio AnCSTR), podem ocorrer alterações e desbalanceamentos nas comunidades microbianas pré-estabelecida no reator durante o processo de reciclo da biomassa concentrada na unidade de adensamento (sedimentador). Em adição, uma separação efetiva da biomassa pode ser onerosa em termos operacionais e energéticos, o que acaba dificultando as estratégias operacionais para produção contínua e estável de bioH_2 e pode até mesmo inviabilizar o processo devido ao elevado custo energético em relação à geração de energia via bioH_2 .

3.4.2 Reator Anaeróbio de Membrana (AnMBR)

O AnMBR surgiu como uma tecnologia potencial para garantir melhores desempenhos em sistemas de tratamento biológico de águas residuárias pela via anaeróbia devido a sua elevada capacidade de separar a fase líquida dos componentes sólidos e, conseqüentemente, desvincular o TRC do TDH. Essa tecnologia tem potencial de gerar um efluente de alta qualidade devido a sua elevada capacidade de separação de sólidos. A separação de sólidos em reatores do tipo AnMBR pode ser realizada a partir de duas formas distintas de operação, as quais são definidas pela forma de integração entre os tipos de membranas adotadas e o reator (LEE; LI; NOIKE, 2010; ROBLES et al., 2018).

A membrana de fluxo cruzado externo (também denominada de fluxo lateral) opera externamente a unidade principal (reator), e é onde a água residuária processada é separada da biomassa antes de sair na corrente efluentes do sistema. Além disso, a membrana de fluxo cruzado externo é acoplada a um circuito de recirculação responsável por retornar a biomassa retida ao reator, sendo este aspecto a maior vantagem deste tipo de membrana. Devido ao elevado grau de mistura na superfície da membrana de fluxo cruzado, uma limpeza física das superfícies ocorre de forma natural, o que acaba por mitigar processos de obstrução. Contudo, devido à necessidade inerente de recirculação de biomassa, a membrana de fluxo cruzado externo requer maiores recursos energéticos quando comparada com a membrana submersa (JUNG et al., 2011a; ROBLES et al., 2018). Em contrapartida, a membrana submersa opera internamente a unidade principal de processamento (reator), não havendo necessidade da recirculação dos sólidos retidos. Além disso, como consequência de seu modo de permeação (vácuo ou gravidade), a membrana submersa caracteriza-se como uma tecnologia que requer menos recursos energéticos, porém, é mais suscetível aos processos de obstrução/colmatação (*fouling*) (JUNG et al., 2011a; ROBLES et al., 2018).

Independentemente da tecnologia de membrana empregada, problemas relacionados aos processos de colmatação e os elevados requisitos energéticos são considerados como barreiras fundamentais para otimização da viabilidade técnico-econômica da configuração AnMBR (ASLAM et al., 2017; JUNG et al., 2011b). Sistemas que adotam a configuração AnMBR como unidades centrais para produção de bioH₂ via processos fermentativos, demonstram haver uma correlação entre elevados TRC, empregados para maiores taxas de produção de hidrogênio, e uma redução do crescimento microbiano. Esse comportamento vem sendo associado com a acumulação de exopolissacarídeos (do inglês, *extracellular polymeric substances*-EPS) (LEE; LI; NOIKE, 2010). Diversos trabalhos têm demonstrado que estas substâncias afetam

negativamente a permeabilidade das membranas, e assim acabam comprometendo a produção de bioH₂ (AL-HALBOUNI et al., 2008; LEE et al., 2008; SHEN et al., 2010).

Devido a susceptibilidade aos processos de obstrução, pode-se levantar o questionamento de que os custos energéticos e demandas operacionais acabam sendo redirecionados para o gerenciamento adequado deste tipo de membrana, como p.ex. sistemas de lavagem assistida por biogás, os mais utilizados nos processos descritos na literatura. Trabalhos associam um melhor desempenho na utilização da tecnologia de membranas quando são associados a outras configurações de reatores como UASB, EGSB e AnFBR. Entretanto, essas associações ainda geram questionamentos quanto ao consumo energético intrínseco e a um possível balanço energético desfavorável (DERELI et al., 2012; JUNG et al., 2011b; OZGUN et al., 2013; SHIN; BAE, 2018).

3.4.3 Reator Anaeróbio de Manta de Lodo e Escoamento Ascendente (UASB)

O desenvolvimento de reatores do tipo UASB para a produção de metano (CH₄) teve início em meados da década de 1970 e, desde então, é a configuração tecnológica mais popular para o processamento anaeróbio de diversas águas residuárias devido a elevadas eficiências de tratamento associadas a uma relativa estabilidade do processo (JUNG et al., 2011b; LETTINGA et al., 1980). O sucesso dos reatores do tipo UASB está relacionado a sua capacidade de retenção de biomassa (i.e., elevados TRC) associada a aplicação de elevadas cargas orgânicas e produção de biogás frente aos processos tradicionais da época (p.ex., tanques de contato) (LETTINGA et al., 1980; SCHMIDT; AHRING, 1996).

A retenção de biomassa em reatores UASB ocorre por meio da formação de agregados granulares de microrganismos com elevada atividade metabólica e grande capacidade de sedimentação. O mecanismo mais aceito para a formação de grânulos é denominado de autoimobilização. Sistemas que contêm biomassa autoimobilizada dispensam da necessidade de material suporte para adesão microbiana, o que pode acarretar menores custos de implementação. De acordo com (LETTINGA et al., 1980), a formação estrutural e composicional associada a estabilidade dos grânulos é determinante para o sucesso dos processos anaeróbios metanogênicos em reatores UASB.

O uso da configuração UASB para a produção de hidrogênio vem sendo abordada em diversos trabalhos desde o primeiro relato apresentado por (FANG; LIU; ZHANG, 2002; JUNG et al., 2011) sobre a capacidade de formação de grânulos compostos por comunidades microbianas acidogênicas produtoras de hidrogênio. Entretanto, (JUNG et al., 2011) relataram

que a maioria dos trabalhos que adotaram a tecnologia UASB para produção de bioH₂ foram conduzidos a partir do processamento de águas residuárias sintéticas compostas majoritariamente por substratos simples e que a principal limitação dessa configuração está relacionada aos longos períodos de partida² observados. Os autores identificaram períodos de partida e uma formação efetiva de grânulos contendo comunidades produtoras de bioH₂ variando entre 150 e 300 dias de operação. Os longos períodos de partida são comumente associados aos diferentes tipos de inóculos e pré-tratamento aplicados para seleção das comunidades acidogênicas e inibição das comunidades metanogênicas (CHANG; LIN, 2004; MU; YU; WANG, 2006; MU; YU, 2006; WANG; MU; YU, 2007).

3.4.4 Reator Anaeróbio de Manta de Lodo Expandida (EGSB)

O EGSB foi concebido com a finalidade de superar problemas recorrentes nos reatores do tipo UASB, principalmente os relacionados a hidrodinâmica destes sistemas, como p.ex.: caminhos preferenciais, curtos-circuitos hidráulicos e zonas de estagnação (mortas). Para isto, cargas hidráulicas são aplicadas a fim de se atingir altas velocidades superficiais (acima de 4 m·h⁻¹, cerca de 5 a 8 vezes maior em relação as velocidades superficiais comumente aplicadas em reatores UASB (0,5 a 0,7 m·h⁻¹) de acordo com Lettinga e Hulshoff, (1995) capazes realizar a expansão da manta de lodo granular e assim, promover um melhor contato entre substrato e microrganismos (VAN DER LAST; LETTINGA, 1992). Contudo, de acordo com Seghezze (1997), não existem relações diretas entre velocidade superficial e consumo de substrato verificados em reatores do tipo EGSB. O autor ainda afirma que características composicionais e estruturais dos grânulos desempenham maior relevância para o sucesso do processo em reatores EGSB, comportamento similar ao relatado para a configuração UASB.

De acordo com Jung et al. (2011), alguns estudos foram conduzidos para elevar o desempenho da produção de bioH₂ em sistemas EGSB. Entretanto, as taxas de produção de hidrogênio nestes estudos não foram substancialmente maiores quando comparadas com reatores do tipo UASB, o que reforça a hipótese apresentada por (SEGHEZZO, 1997).

² Entende-se por período de partida aquele cujo a estabilidade do sistema não esteve bem definida em termos das variáveis respostas relacionadas a produção de bioH₂. Em alguns dos estudos referenciados, este período também englobou a formação efetiva dos grânulos em termos estruturais e composicionais.

3.4.5 Reator Anaeróbio de Leito Fluidizado (AnFBR)

O AnFBR foi concebido sob a perspectiva de minimizar as resistências à transferência de massa recorrentes em sistemas de crescimento microbiano aderido. Nesta configuração, o crescimento microbiano ocorre pela adesão dos microrganismos em material suporte capaz de ser fluidificado por meio da aplicação de elevadas cargas hidráulicas via recirculação interna no reator. Devido às elevadas velocidades superficiais, a resistência à transferência de massa entre o biofilme e o meio líquido são minimizadas e, conseqüentemente, elevadas taxas das reações bioquímicas podem ser alcançadas (BARCA et al., 2015; FERREIRA et al., 2018; MENEZES; PARANHOS; SILVA, 2020). Nesse contexto, o AnFBR apresenta capacidade de reter elevadas quantidades de biomassa associada a uma excelente capacidade de mistura, caracterizando sistemas capazes de operar com elevadas COV_a e curtos TDH (BARROS et al., 2010).

Em relação à produção de bioH₂, o elevado grau de mistura no reator proporciona um efetivo desprendimento do gás do meio líquido, prevenindo o aumento da pressão parcial de hidrogênio no meio líquido e, conseqüentemente, a estabilidade do processo (MENEZES; PARANHOS; SILVA, 2020; PREETHI et al., 2019). Contudo, o elevado grau de mistura do meio pode resultar na destruição da biomassa. Além disso, o requerimento energético associado a pouca compreensão do comportamento mecânico do leito fluidificado são fatores que afetam a viabilidade técnico-econômica desta configuração em grande escala (SINHAROY; KUMAR; PAKSHIRAJAN, 2020; ZHANG et al., 2007).

3.4.6 Reator Anaeróbio de Leito Fixo Empacotado (AnPBR)

Sistemas baseados na imobilização de biomassa, especialmente os reatores de leito fixo empacotado (AnPBR – do inglês *anaerobic packed bed reactor*), vêm sendo objeto de estudo em diversas pesquisas que visam a produção biológica de hidrogênio devido a sua capacidade de operar com elevados TRC aliado ao fato destes reatores conseguirem atingir elevadas concentrações de biomassa no sistema, mesmo com a aplicação de elevadas velocidades superficiais, características interessante quando pensado na aplicação deste processo em grande escala (FERNANDES et al., 2013; KUMAR et al., 2016).

Estudos avaliaram a aplicação de reatores do tipo AnPBR em sistemas acidogênicos a partir da análise de diferentes parâmetros operacionais e estruturais dos reatores capazes de influenciar a produção de hidrogênio, sendo eles: a relação carbono/nitrogênio

(ANZOLA-ROJAS et al., 2015), razão de recirculação (FONTES LIMA; ZAIAT, 2012), tipo de material suporte e porosidade do leito (FERNANDES et al., 2013), suplementação nutricional (BLANCO; FUESS; ZAIAT, 2017; PEIXOTO et al., 2011), relação DQO/cálcio (BLANCO; FUESS; ZAIAT, 2017), origem e tipo de pré-tratamento do inóculo (PENTEADO et al., 2013).

Por mais que os estudos supracitados tenham contribuído para o aprimoramento do desempenho de sistemas que empregam o AnPBR, problemas na estabilidade de produção de hidrogênio podem ser observados em longos tempos de operação (ANZOLA-ROJAS et al., 2015; ANZOLA-ROJAS; ZAIAT, 2016; FERRAZ JÚNIOR; ETCHEBEHERE; ZAIAT, 2015; GOMES et al., 2015).

Mesmo que a capacidade de operar com elevados tempos de retenção celular seja, teoricamente, uma característica interessante para os reatores biológicos, alguns trabalhos têm associado a performance indesejável dos sistemas AnPBR a elevada concentração de biomassa no leito como o fator responsável pela instabilidade e baixos desempenhos da produção de hidrogênio devido a colmatagem e entupimento do leito (ANZOLA-ROJAS et al., 2015; FERRAZ JÚNIOR; ETCHEBEHERE; ZAIAT, 2015; PEIXOTO et al., 2011). Tais premissas levantam a suposição da existência de uma relação ótima entre a concentração de microrganismos em um reator acidogênico e a produtividade de bioH₂.

Braga (2014) avaliou três configurações de reatores acidogênicos alimentados com água residuária sintética a base de sacarose em condição termofílica para produção de bioH₂ em escala de bancada. As operações foram compostas por um reator do tipo UASB e dois reatores tubulares de fluxo ascendente, sendo estes, distintos pela presença ou não de um leito fixo empacotado. Em relação aos reatores tubulares, foi possível avaliar a influência do leito fixo empacotado a partir de duas condições operacionais distintas (TDH de 2 e 0,5 h) sobre as seguintes variáveis respostas: produtos metabólicos solúveis (AOV e solventes); rendimentos de hidrogênio (HY); produção volumétrica de hidrogênio (PVH); eficiência de conversão de sacarose (%EC_s); concentração de biomassa (SSV) na corrente efluente. Entre as variáveis avaliadas, as eficiências de conversão de sacarose observadas apresentaram diferenças significativas entre os sistemas com e sem leito fixo. Os reatores com leito fixo empacotado apresentaram diferenças significativas dos valores de eficiência de conversão de sacarose quando operados em TDH de 2 e 0,5 h, respectivamente. Para o sistema com TDH de 2 h, foi observada uma estabilidade na conversão de sacarose após 86 dias de operação, atingindo valores na faixa de 99% durante os últimos 50 dias de operação, enquanto o sistema com TDH de 0,5 h, a estabilidade na faixa de 40,4 ± 7,6% ocorreram após 31 dias de operação e se manteve

até o final da operação. Por outro lado, os reatores sem leito, operados com TDH de 2 e 0,5 h, não apresentaram diferença estatística com relação às eficiências de conversão de sacarose, $34,58 \pm 4,87\%$ e $37,00 \pm 2,42\%$, respectivamente. Mesmo com eficiências de conversão de sacarose similares, a lavagem de biomassa aferida no sistema com TDH de 0,5 h foi duas vezes maior quando comparada com o sistema operado com TDH de 2 h. Portanto, de acordo com Braga (2014), a existência ou não do leito fixo empacotado nos reatores impacta diretamente na eficiência de conversão de sacarose e, conseqüentemente, nas rotas metabólicas e na produção de bioH_2 .

3.4.7 Reator Anaeróbico de Leito Fixo Estruturado (AnSTBR)

Fundamentado na hipótese de ser uma alternativa eficiente para o controle e manutenção da concentração de biomassa em sistemas anaeróbios de leito fixo, quando comparado aos sistemas que empregam reatores do tipo AnPBR, foi desenvolvido no LPB/EESC/USP, a configuração do reator anaeróbico de leito fixo e estruturado (AnSTBR). Destaca-se que o AnSTBR não foi desenvolvido exclusivamente como alternativa ao AnPBR na produção de bioH_2 , mas sim como uma alternativa aos sistemas de leito fixo empacotado convencionais em geral, independentemente do objetivo do bioprocessamento.

A configuração AnSTBR já foi avaliada para remoção de sulfato (CAMILOTI et al., 2014; CUNHA et al., 2020), degradação de poluentes emergentes (CARNEIRO et al., 2019, 2020b; ROMEIRO et al., 2019), produção de metano (ARAUJO JUNIOR et al., 2016; FUESS et al., 2017b; MOCKAITIS et al., 2014) e produção de bioH_2 (BLANCO; OLIVEIRA; ZAIAT, 2019a; FERRAZ JÚNIOR; ETCHEBEHERE; ZAIAT, 2015; FUESS; ZAIAT; DO NASCIMENTO, 2019; FUESS; ZAIAT; NASCIMENTO, 2020; NIZ et al., 2019).

O AnSTBR combina o crescimento imobilizado da biomassa em meios de elevada porosidade, o que garante um contato efetivo entre os microrganismos e substrato, além de possibilitar a aplicação de elevada carga orgânica volumétrica e garantir uma adequada retenção de biomassa no sistema, possibilitando um melhor controle e manutenção da COVe (ANZOLA-ROJAS; ZAIAT, 2016; CAMILOTI et al., 2014).

Os trabalhos descritos a seguir visaram à aplicação de reatores anaeróbios de leito fixo estruturado para produção biológica de hidrogênio. Pode-se notar a existência de poucos trabalhos voltados para a temática supracitada. Contudo, vale ressaltar a importância dos

estudos relatados a seguir para o desenvolvimento e aprimoramento do processo de produção biológica de hidrogênio a partir de processos fermentativos em reatores do tipo AnSTBR.

Blanco, Fuess e Zaiat (2017) avaliaram o efeito do íon cálcio (Ca^{2+}) no controle da COVe por meio de variações na razão $\text{DQO}/[\text{Ca}^{2+}]$ em um sistema AnSTBR em condição mesofílica (25°C) visando a produção de bioH_2 . O reator foi operado com fluxo ascendente e alimentado continuamente com água residuária sintética contendo sacarose e ureia como fontes de carbono e nitrogênio. O sistema foi operado a uma COVa de $24 \text{ kg-DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ e TDH de 2 h. De acordo com os autores, dosagens de cálcio podem efetivar a retenção de biomassa no sistema AnSTBR e, conseqüentemente, melhorar a produção biológica de hidrogênio por meio da manutenção da COVe. Entretanto, notou-se a existência de uma razão ótima entre DQO e concentrações de cálcio ($\text{DQO}/[\text{Ca}^{2+}] = 1360$). Valores abaixo do valor ótimo favorecem a lavagem de biomassa, o que resulta em uma baixa concentração de microrganismos capazes de produzir hidrogênio.

Blanco, Oliveira e Zaiat (2019a) avaliaram o AnSTBR para produção de bioH_2 a partir de soro do leite reconstituído. A pesquisa foi dividida em três etapas: operação do sistema AnSTBR para avaliação do processo de produção de hidrogênio e geração de biomassa acidogênica; ensaios em batelada com a biomassa retida no sistema após operação para aferimento de parâmetros cinéticos da comunidade microbiana estabelecida e modelagem matemática dos dados cinéticos obtidos. O AnSTBR foi operado em condições acidogênicas mesofílica com uma COVa de $24 \text{ kg-DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ e TDH 24 h durante um período de 32 dias. O desempenho máximo de produção de hidrogênio foi aferido após 24 dias de operação e correspondeu a um pico de HY de $2,4 \text{ molH}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ lactose}$. De acordo com os autores, este rendimento foi superior a pesquisas realizadas com parâmetros e condições operacionais similares em sistemas APBR. Em relação a estabilidade do sistema, após o pico de produção de bioH_2 , o rendimento caiu para $1,4 \text{ molH}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ lactose}$ e manteve-se constante até o final da operação de 32 dias. Os autores concluíram que o AnSTBR se mostra promissor para produção de bioH_2 a partir de água residuária da indústria do soro do leite principalmente se comparado com o AnPBR, o que reforça novamente a ideia já apresentada no decorrer do presente texto, de que os AnSTBR são mais eficientes para controle e manutenção da biomassa em relação aos reatores de leito fixo empacotado.

Anzola-Rojas e Zaiat (2016) avaliaram a produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo estruturado com escoamento descendente (AnDSBR – do inglês *anaerobic down-flow structured-bed reactor*). Os autores se embasaram na hipótese de que a inversão do fluxo seria capaz de promover o desprendimento do hidrogênio formado no processo fermentativo do

meio líquido ao contrário do que ocorre nos reatores de fluxo ascendente (no caso em comparação ao AnSTBR), devido a contracorrente gás (naturalmente ascensional) -líquido (neste caso, descensional). Também foram avaliados diferentes materiais suportes para confecção dos leitos (PEBD – polietileno de baixa densidade, PU – espuma de poliuretano e CERA – material cerâmico). Além disso, foi realizada manobra operacional de descarte de biomassa ao longo das operações, com operação paralela comparativa de seis sistemas AnDSBR (ANZOLA-ROJAS; ZAIAT, 2016). Os resultados revelaram uma produção contínua de hidrogênio durante 120 dias de operação, os quais foram comparados com os de um reator de leito fixo empacotado empregando polietileno de baixa densidade (PEBD) como material suporte, sendo o AnDSBR capaz de elevar em 10% a lavagem de biomassa induzida na corrente efluente ao sistema e de diminuir em 15% o acúmulo de biomassa no leito. Os autores concluíram que o sistema possui capacidade de manter uma constante renovação de biomassa e um melhor controle sobre COVe quando comparado ao AnPBR, o que garante uma produção contínua de hidrogênio, mais efetivamente quando aliado ao descarte de biomassa.

Buscando otimizar o processo fermentativo para produção de hidrogênio no AnDSBR, Anzola-Rojas, Zaiat e Wever (2016) avaliaram a produção volumétrica de hidrogênio e o rendimento de hidrogênio a partir da variação da COVa (12, 24, 12, 24, 48 e 96 g-DQO L⁻¹ d⁻¹, respectivamente, por um período de 30 dias para cada COVa, perfazendo seis fases de operação em 180 dias) por meio de mudanças no TDH (entre 2 e 4 h) e na concentração de substrato (entre 1 e 16 g-DQO L⁻¹), sendo sacarose e ureia as fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente. Além disso, os produtos solúveis referentes à fermentação foram avaliados com intuito de verificar o tipo de fermentação predominante no sistema e a eficiência energética total foi estimada. Entre os resultados obtidos no trabalho em questão, observações referentes às variações na PVH e RH para os mesmos valores de COVa durante a operação do sistema sugere, de acordo com os autores, influência majoritária do parâmetro COVe no processo de produção de hidrogênio em relação a COVa. Com o aumento da COVa (especificamente para os valores de 48 e 96 g-DQO L⁻¹ d⁻¹) foi verificado um aumento nos valores de PVH e RH, associados a um melhor controle da COVe.

3.5 O PAPEL DO ACÚMULO DE BIOMASSA NA PRODUÇÃO DE BIOHIDROGÊNIO

A configuração de reator é capaz de influenciar a produção de bioH₂ por meio da capacidade de retenção de biomassa em processos fermentativos. Como já apresentado anteriormente, em geral, biorreatores de leito fixo apresentam elevada capacidade de retenção

de biomassa e, teoricamente, devido a capacidade de desacoplar o TDH do TRC, estas configurações são capazes de prevenir a lavagem de biomassa mesmo com a aplicação de elevadas COVa e assim garantir elevados níveis de produção de bioH₂ (GHIMIRE et al., 2015; KUMAR et al., 2016).

Entretanto, diversos autores vêm associando o acúmulo excessivo de biomassa em sistemas fermentativos como um fator negativo sobre a produção de bioH₂ em longos períodos de operação, devido ao desbalanceamento da relação alimento-microrganismos (A/M). Além disso, estratégias baseadas no controle do acúmulo de biomassa em sistemas fermentativos demonstram ser capazes de garantir condições de disponibilidade adequadas de substrato, o que pode direcionar o metabolismo microbiano para rotas produtoras de bioH₂ em detrimento de rotas não produtoras ou consumidoras de bioH₂ (ANZOLA-ROJAS et al., 2015; BLANCO; FUESS; ZAIAT, 2017; FUESS et al., 2016; GOMES et al., 2015; HAFEZ et al., 2010).

A baixa disponibilidade de substrato é comumente associada ao estabelecimento de condições homoacetogênicas, o que diminui as taxas de produção de bioH₂. O aumento da COVa em sistemas acidogênicos hidrogenogênicos pode ser uma alternativa para evitar o estabelecimento de condições homoacetogênicas. Entretanto, elevadas COVa podem promover rotas não produtoras de bioH₂, levando ao acúmulo de HPr e HLa nos sistemas (FERRAZ JÚNIOR; ETCHEBEHERE; ZAIAT, 2015; FONTES LIMA; MOREIRA; ZAIAT, 2013; SAADY, 2013).

O acúmulo de biomassa impacta diretamente a carga orgânica volumétrica específica (COVe), que pode ser comparada por analogia à relação alimento-microrganismo (A/M) para sistemas operados em modo contínuo. Para baixos valores de COVe, tende-se a estimular a homoacetogênese, uma rota metabólica responsável por diminuir a produção de hidrogênio mesmo com a continuidade da conversão dos substratos primário e geração de HAc no meio reacional (ANZOLA-ROJAS et al., 2015). Estudos têm demonstrado que valores de COVe na faixa de 4-6 g-DQO g⁻¹SSV d⁻¹ proporcionam uma relação favorável entre alimento e microrganismos para uma efetiva produção de hidrogênio em diferentes configurações de reatores a partir de águas residuárias sintéticas (ANZOLA-ROJAS et al., 2015; HAFEZ et al., 2010). Estudos conduzidos com águas residuárias complexas ricas em carboidratos, como é o caso da vinhaça de cana-de-açúcar, também demonstraram os melhores desempenhos em termos de produção de bioH₂ para valores de COVe em faixas similares às encontradas em estudos conduzidos com águas residuárias sintéticas (FUESS et al., 2016; FUESS; ZAIAT; DO NASCIMENTO, 2019).

Outro parâmetro capaz de impacatar no processo de acúmulo de biomassa em reatores anaeróbios é a COVa. A COVa é um importante parâmetro para otimização da produção de bioH₂ nos processos fermentativos em reatores contínuos, sendo essencial a definição de faixas que promovam o máximo rendimento de hidrogênio possível. A relação entre a COVa e o HY ainda não está claramente explicada na literatura científica. Alguns estudos demonstram que elevados valores de COVa podem reduzir ou aumentar o HY, a depender do tipo de substrato e microrganismos envolvidos no processo (HAFEZ et al., 2010; VAN GINKEL; LOGAN, 2005; ZHANG et al., 2004). Hoelzle et al., (2020) demonstraram que a expressão proteica dos microrganismos envolvidos em culturas mistas fermentativos pode ser influenciada pelo tipo e concentração de substrato presentes no ambiente, podendo direcionar ou inibir determinados caminhos metabólicos em sistemas acidogênicos. Por mais que este estudo tenha sido conduzido sob a ótica de produção de ácidos orgânicos de valor agregado, os mesmos caminhos metabólicos verificados podem ocorrer em sistemas acidogênicos hidrogenogênicos, o que pode sugerir uma relação entre a COVa e o HY.

Em estudo recente, Fuess et al. (2021a) pormenorizaram a dinâmica de retenção de biomassa e a disponibilidade de substrato a partir de um protocolo experimental de desmonte compartimentado para um AnSTBR acidogênico hidrogenogênico. Este protocolo permitiu aferir a distribuição quali-quantitativa da biomassa e dos produtos metabólicos solúveis (PMS) recorrentes nos diferentes compartimentos reacionais. A distribuição de PMS observada demonstrou que as rotas metabólicas primárias de produção de bioH₂ ocorreram no compartimento inicial do biorreator (i.e., câmara de alimentação-CA), mesmo com uma similar distribuição quantitativa de biomassa entre a CA e a zona de leito (aproximadamente 10 g-SSV em cada). Em outras palavras, por mais que a biomassa total aderida estivesse distribuída em quantidades similares na câmara de alimentação e na zona do leito fixo estruturado, a biomassa presente na CA foi responsável por cerca de 90% da conversão de substrato primário (carboidratos totais), o que demonstra que essa parcela da biomassa total retida foi responsável pelas rotas primárias de produção de bioH₂. Por fim, ensaios de atividade hidrogenogênica associaram um potencial de produção de bioH₂ duas vezes superior à biomassa coletada na CA em comparação à coletada na zona de leito.

3.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS DA REVISÃO DE LITERATURA

As informações apresentadas no Capítulo 3 demonstram o potencial da produção de bioH₂ por meio de processos fermentativos em integrar, de maneira isolada ou acoplada,

sistemas biotecnológicos baseados na aplicação do conceito de biorrefinarias ao tratamento de águas residuárias de diversas cadeias produtivas. Também foi possível coletar informações que evidenciam uma melhor adequabilidade de tecnologias de reatores de leito fixo com relação a requisitos energéticos e operacionais quando comparados às outras configurações apresentadas.

Frente ao contexto de heterogeneidade na distribuição quali-quantitativa de biomassa relatado por Fuess et al. (2021a), pode-se levantar o questionamento de qual é o papel do leito fixo estruturado na produção de bioH_2 , já que praticamente toda a conversão de substrato fresco (primário) esteve relacionado com a biomassa suspensa retida na CA. Em paralelo às observações relatadas por Fuess et al. (2021a), às observações relatadas por Braga (2014), as quais dizem respeito aos impactos negativos da ausência de leito fixo empacotado, também levantam questionamentos sobre quais são os impactos da existência de diferentes arranjos de leito fixo sobre a dinâmica de retenção de biomassa em reatores anaeróbios acidogênicos hidrogenogênicos.

Comumente a comparação entre diferentes configurações de biorreatores é realizada a partir da aplicação de condições operacionais equivalentes em termos globais sem levar em consideração características específicas, como p.ex. a distribuição heterogênea de biomassa em diferentes compartimentos reacionais ao longo de reatores tubulares que tendem ao fluxo pistonado, sendo este um fator capaz de impactar a produção de bioH_2 e, provavelmente, a dinâmica de biomassa nos diferentes compartimentos reacionais. Em outras palavras, as comparações realizadas entre diferentes configurações de reatores não levam em consideração as observações apresentadas por Fuess et al. (2021a), e acabam por adotar bases comparativas que não consideram as diferentes características que ocorrem de maneira compartimentada nas diferentes configurações de reatores, principalmente com relação a CA e a zona de leito.

A fim de apresentar uma comparação sucinta e direta, a Tabela 1 exhibe o desempenho de produção de bioH_2 para diferentes águas residuárias e em diferentes configurações de reatores de leito fixo estimados de forma global, i.e., de forma não compartimentada.

Tabela 1. Produção de bioH₂ a partir de águas residuárias reais em reatores de leito fixo, com diferentes configurações de leito.

| Substrato | Inóculo | Reator | Temperatura [°C] | pH | TDH [h] | COVa [kg-DQO m ⁻³ ·d ⁻¹] | HY [molH ₂ ·mol ⁻¹ CH] | PVH [L-H ₂ ·L ⁻¹ ·d ⁻¹] | H ₂ [%] | Referência |
|---------------------------------|-------------------------------|---------------------|------------------|------|----------------|---|--|---|-----------------------|---|
| Soro de leite | F.N. | AnSTBR ^a | 25 | 5,13 | 24 | 24 | 1,4 (2,4) | 1,6 (2,5) | - | (BLANCO; OLIVEIRA; ZAIAT, 2019a) |
| Vinhaça de cana-de-açúcar | F.N. | AnPBR ^a | 55 | 5,15 | 7,5 | 84,2 | 1,5 (5,6) | 0,79 (2,10) | 19,6 (46,2) | (FUESS et al., 2016) |
| Água residuária de refrigerante | F.N. | AnPBR ^a | 25 | 6,0 | 0,5 | 78,99 | 3,47 | - | 15,8 | (PEIXOTO et al., 2011) ^c |
| Vinhaça de cana-de-açúcar | F.N. | AnPBR ^a | 55 | 5,5 | 10,2 | 84,2 | 1,6 (3,7) | 0,76 (2,28) | 38,7 (71,1) | (FERRAZ JÚNIOR; ETCHEBEHERE; ZAIAT, 2015) |
| Melaço de cana-de-açúcar | F.N. | AnSTBR ^b | 55 | 3,8 | 4 | 60 | 1,18 | 2,12 | 51 | (OLIVEIRA et al., 2020) |
| Soro de leite e glicerina | Lodo (pré-tratamento térmico) | AnSBBR ^a | 30 | 4,3 | 3 ¹ | 24 | 1,4 | 3,21 | 62 | (LOVATO et al., 2017) ^c |
| Manipueira | F.N. | AnSTBR | 36 | 5,2 | 2 | 22,4 | 0,3 (1,3) | 0,55 (1,64) | 40,5 (69) | (CORBARI et al., 2019) |

Notas: ^aMaterial suporte de PEBD, ^bMaterial suporte de poliuretano, ^cResultado referente ao reator ou condição com o melhor desempenho em termos de produção de bioH₂, ¹Tempo de clico. Os dados em (**negrito**) representam os valores máximos observados.

4 MÉTODOS E ETAPAS DE PESQUISA

A seguir está apresentado o protocolo experimental definido para o cumprimento do objetivo e verificação da hipótese de pesquisa previamente apresentada. De modo geral, o protocolo experimental adotado consistiu na operação de três diferentes configurações de reatores anaeróbios acidogênicos alimentados com água residuária sintética e em condição termofílica de temperatura (55°C). Com esse protocolo, buscou-se compreender os efeitos do tipo leito fixo sobre a dinâmica de biomassa e na produção de bioH₂ a partir do pressuposto de que a câmara de alimentação é majoritariamente responsável pelos processos hidrogenogênicos. Para tal, foram impostas as mesmas condições operacionais como COV_a e TDH na câmara de alimentação dos reatores a partir da aplicação da mesma vazão de entrada, tendo em vista a homogeneidade construtiva dos sistemas.

4.1 APROXIMAÇÃO EXPERIMENTAL: ENSAIOS HIDRODINÂMICOS, PROJETO DOS REATORES E CONDIÇÕES OPERACIONAIS

Inicialmente, ensaios hidrodinâmicos de estímulo-resposta utilizando cloreto de sódio a uma concentração de 10 g L⁻¹ como traçador visando uma perturbação do tipo degrau foram realizados para acessar o padrão hidrodinâmico estabelecido nas diferentes configurações de reatores. Os reatores foram preenchidos com água de torneira e posteriormente alimentados com a solução traçadora (também preparada com água de torneira). Uma calculadora gráfica *Texas Instruments TI-89 (Texas Instruments, EUA)* e um sistema de aquisição de dados *Calculator-Based Laboratory™ (Texas Instruments, EUA)* acoplados a uma sonda de condutividade (*Vernier Software and Technology, EUA*) foram usados para medir as concentrações do traçador na corrente efluente dos sistemas. Os dados obtidos foram analisados de acordo com o protocolo de cálculo apresentado por Levenspiel (1998), o qual permitiu determinar o padrão de fluxo estabelecido nos reatores a partir do número de reatores contínuos de tanque agitado de igual volume em série, bem como avaliar o tempo médio de detenção hidráulica a partir da distribuição do tempo de detenção hidráulica. As equações utilizadas para analisar os dados coletados nos ensaios hidrodinâmicos são apresentadas a seguir (Equações 1-6).

$$F(t) = C(t)/C_{max} \quad \text{Equação 1}$$

$$F(t) = \int_0^t E(t) \cdot dt \rightarrow E(t) = \frac{dF(t)}{dt} \quad \text{Equação 2}$$

$$\bar{\theta}_h = \frac{\int_0^\infty t \cdot E(t) \cdot dt}{\int_0^\infty E(t) \cdot dt} = \int_0^\infty t \cdot E(t) \cdot dt \quad \text{Equação 3}$$

$$\sigma^2 = \frac{\int_0^\infty (t - \bar{\theta}_h) \cdot C(t) \cdot dt}{\int_0^\infty C(t) \cdot dt} \quad \text{Equação 4}$$

$$\sigma_\theta^2 = \frac{\sigma^2}{\theta_h^2} \quad \text{Equação 5}$$

$$N - CSTR = \frac{1}{\int_0^\infty C(t) \cdot dt} \quad \text{Equação 6}$$

sendo $F(t)$ função das concentrações de traçador medidas durante o período de teste $C(t)$ e normalizadas pela concentração máxima de traçador medida C_{max} ; $E(t)$ representa a função da curva de distribuição normalizada dos tempos de detenção hidráulica; $\bar{\theta}_h$ é o tempo médio de detenção hidráulica; t é o tempo em um determinado momento do ensaio; σ^2 é a variância das curvas, a qual indica a dispersão da distribuição dos tempo de detenção hidráulica; σ_θ^2 é a variância adimensional; e $N - CSTR$ representa o número de reatores contínuos de tanque agitado de igual volume em série.

Dado os achados relacionados à conversão majoritária de substrato fresco na porção basal de um AnSTBR relatados por Fuess et al. (2021a), três reatores construídos em acrílico e com características construtivas idênticas foram operados em paralelo por 68 dias sob condições equivalentes aplicada na câmara de alimentação e condição termofílica de temperatura (55°C). Os reatores consistiram em [i] um reator anaeróbio tubular (AnTR, o qual não era preenchido com material suporte), [ii] um AnSTBR (usando cilindros ocos de polietileno de baixa densidade (LDPE, do inglês *low-density polyethylene*) dispostos verticalmente na zona de leito como material suporte) e [iii] um AnPBR (usando aparas de LDPE dispostos aleatoriamente na zona de leito como material suporte). Sempre que presente, o material suporte foi disposto em telas de aço inoxidável. Os reatores foram alimentados na mesma faixa de vazão (cerca de

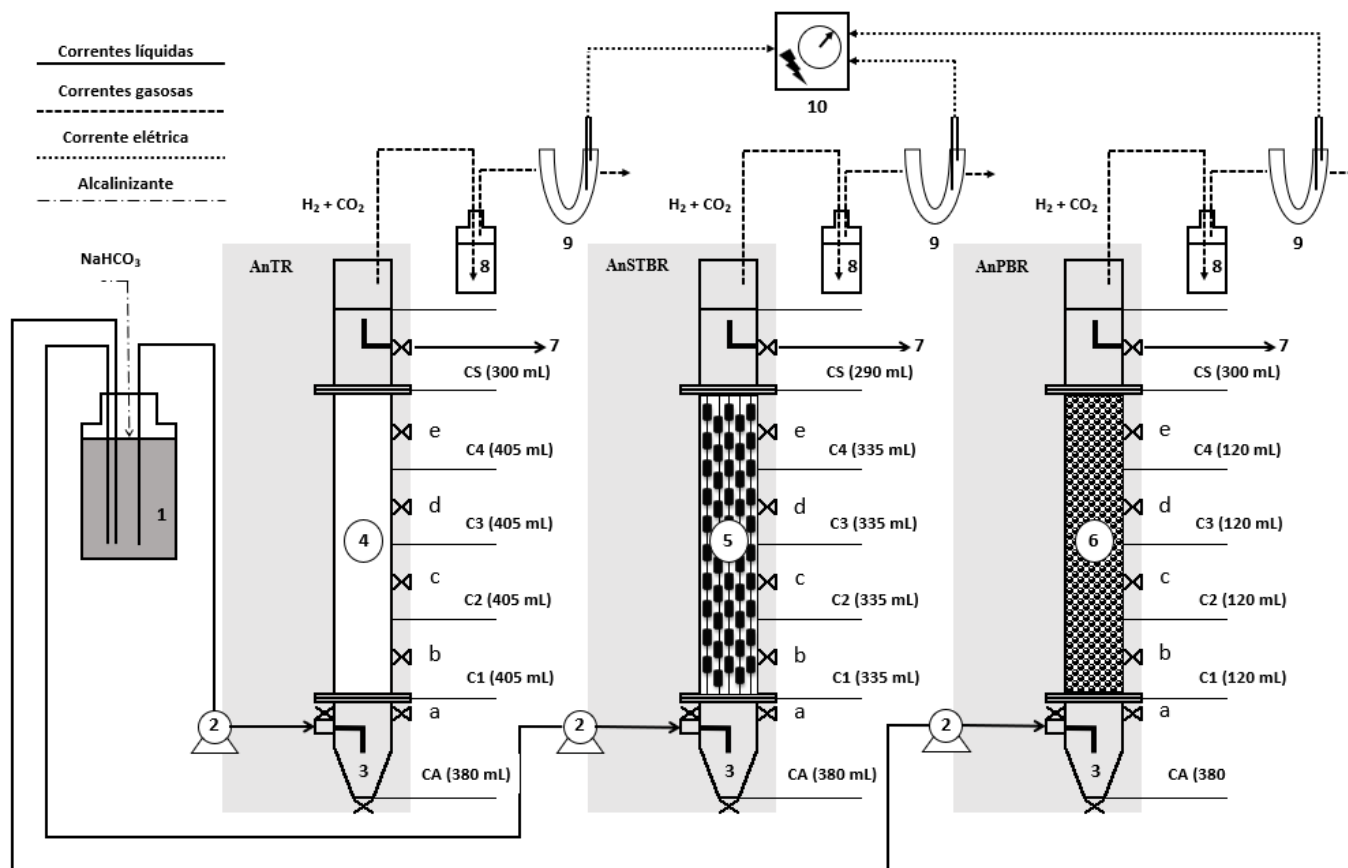
333 mL h⁻¹) usando bombas peristálticas, tendo como base as condições utilizadas por Fuess et al. (2021a) e objetivando manter uma COVa nas camaras de alimentação de 100 kg-DQOt m⁻³ d⁻¹. Apesar do mesmo volume total, manter condições equivalentes nas CA levou a diferentes níveis gerais de COVa e TDH devido aos diferentes volumes úteis nos reatores, os quais são resultado dos arranjos de material suporte dispostos na zona de leito do AnSTBR e AnPBR. A área superficial disponível para fixação de biomassa também variou de acordo com a ausência/presença do leito e a disposição dos materiais suporte. As características intrínsecas dos materiais de suporte e as condições de operação dos reatores são apresentadas na Tabela 2.

Selos hídricos foram colocados entre o *headspace* e o sistema de medição e aquisição de dados de vazão de biogás para estabilizar a superfície do líquido nos reatores e preservar os dispositivos de medição em casos de quedas extremas de pressão. O desenho esquemático detalhado do aparato experimental está representado na Figura 3. As características construtivas (dimensões) dos reatores são apresentadas na Figura 4.

4.2 PROTOCOLO DE INOCULAÇÃO E ÁGUA RESIDUÁRIA À BASE DE SACAROSE

A inoculação dos reatores foi realizada de acordo com o protocolo de fermentação natural usando vinhaça de cana-de-açúcar conforme descrito por outros trabalhos (FERRAZ JÚNIOR et al., 2014; FERRAZ JÚNIOR; ETCHEBEHERE; ZAIAT, 2015; FUESS et al., 2021a, 2021b; FUESS; ZAIAT; DO NASCIMENTO, 2019). Após a etapa de inoculação, os reatores foram operados em modo contínuo e fluxo ascendente e alimentados com água residuária sintética à base de sacarose com uma demanda química de oxigênio total de 5 g-DQOt L⁻¹. A ureia foi usada como fonte de nitrogênio para mandar uma relação C/N de 140 (ANZOLA-ROJAS et al., 2015). A suplementação de nutrientes seguiu os mesmos passos de estudos anteriores (ANZOLA-ROJAS et al., 2015; FONTES LIMA; ZAIAT, 2012). Bicarbonato de sódio (NaHCO₃) foi dosado no tanque de alimentação para tamponar a água residuária sintética, com valores de 0,25 (até o dia 22) e 0,28 (após o dia 22) g-NaHCO₃ g⁻¹DQOt. O aumento da dosagem de NaHCO₃ após o dia 22 teve como objetivo manter o pH do processo em uma faixa favorável para a produção de bioH₂ (FUESS; ZAIAT; NASCIMENTO, 2020).

Figura 3. Desenho esquemático do aparato experimental.



Legenda: (1) tanque de alimentação, (2) bomba peristáltica, (3) câmara de alimentação, (4) zona de leito do AnTR (zona tubular), (5) zona de leito do AnSTBR (leito estruturado), (6) zona de leito do AnPBR (leito compactado), (7) corrente efluente, (8) selo hídrico, (9) tubo em forma de J, (10) sistema de aquisição de dados (placa de desenvolvimento Arduino Nano Atmega328). Abreviaturas: CA-câmara de alimentação, compartimentos C1/C2/C3/C4 da zona de leito, CS-câmara de saída, a/b/c/d/e-pontos de amostragem espacial, NaHCO_3 -bicarbonato de sódio, H_2 -hidrogênio, CO_2 -dióxido de carbono, AnTR-reator anaeróbio tubular, AnSTBR-reator anaeróbio de leito estruturado, AnPBR-reator anaeróbio de leito empacotado.

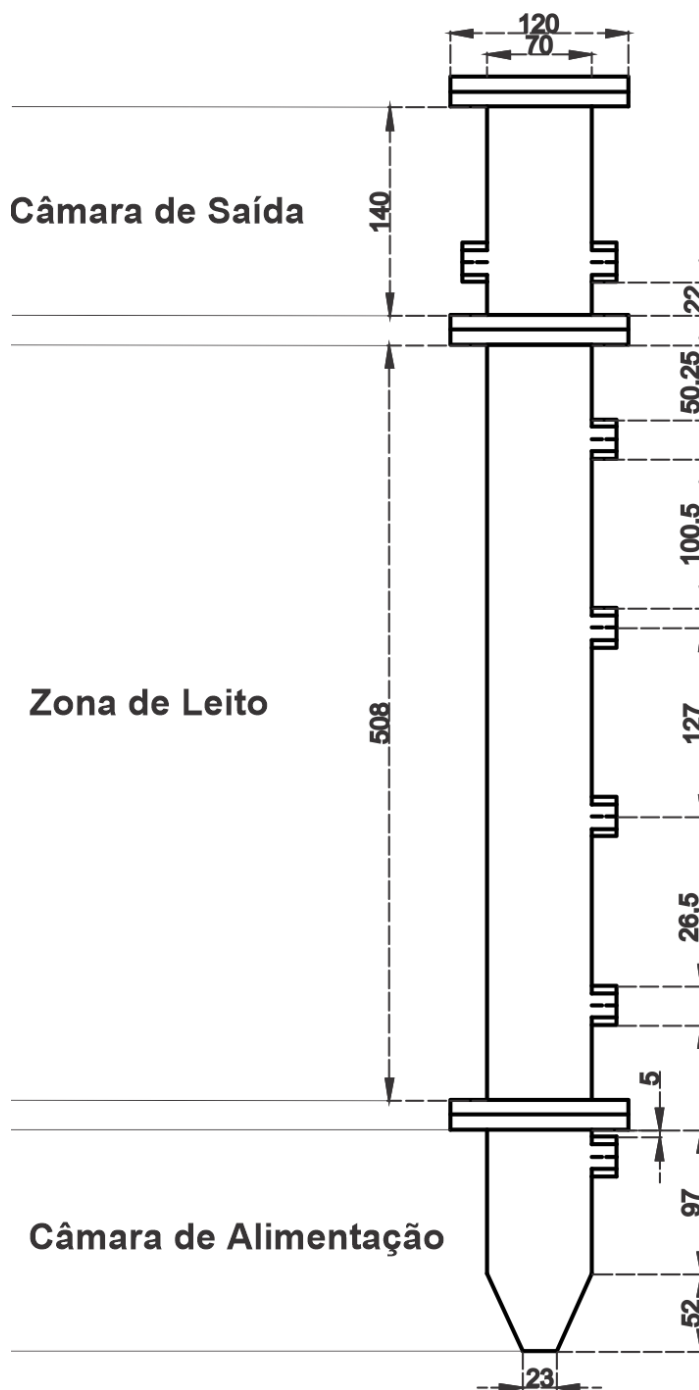
Tabela 2. Características intrínsecas dos reatores de acordo com os diferentes arranjos de material suporte.

| Reatores | Material suporte | | | | | | | Condições operacionais | | | | |
|----------|------------------------|------------------------|---|--------------|---------------------------|-----------|-----------|------------------------|---|---|--------------------------|------------|
| | L ¹ [mm] | D ¹ [mm] | ASE [cm ² g ⁻¹] | Massa [g] | ASD [cm ²] | VT [L] | VU [L] | Porosidade [%] | COVa(CA) [kg-DQO m ⁻³ d ⁻¹] | COVa [kg-DQO m ⁻³ d ⁻¹] | TDH _{CA} [h] | TDH [h] |
| AnTR | - | - | - | | 1016,61* | 2,30 | 2,30 | 100 | 101,98±3,82 | 16,85±0,63 | 1,17±0,04 | 7,07±0,22 |
| AnSTBR | 25 | 20 | 7,945 | 203,3 | 1615,02 | 2,30 | 2,02 | 87 | 100,73±2,79 | 19,14±0,53 | 1,18±0,02 | 6,22±0,13 |
| AnPBR | 5 | 4,5 | 7,940 | 819,9 | 6510,48 | 2,30 | 1,16 | 50 | 101,35±3,03 | 33,20±0,99 | 1,17±0,03 | 3,58±0,09 |

Notas: *Área superficial das paredes internas da zona de leito do AnTR, 1Relativo à conformação da estrutura do material.

Abreviaturas: ASD-área superficial disponível, D-diâmetro, TDH-tempo de detenção hidráulica, TDH_{CA}- tempo de detenção hidráulica na câmara de alimentação, L-comprimento, COVa-carga orgânica volumétrica aplicada, COVa(CA)-carga orgânica volumétrica aplicada na câmara de alimentação, ASE-área superficial específica, VT-volume total, VU-volume útil, AnTR-reator anaeróbio tubular, AnSTBR-reator anaeróbio de leito estruturado, AnPBR-reator anaeróbio de leito empacotado.

Figura 4. Desenho esquemático das características construtivas dos reatores.



Fonte: Elaboração própria no *software* AutoCAD (Autodesk®) versão 2021 para estudantes. Nota: as dimensões dos elementos que compõem a estrutura de cada um dos reatores são apresentadas em milímetros.

4.3 MONITORAMENTO DOS REATORES, MÉTODOS ANALÍTICOS E AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO

O monitoramento da fase líquida (incluindo a caracterização dos perfis espaciais e temporais) baseou-se nas seguintes variáveis de processo: pH; DQOt, demanda química de

oxigênio solúvel (DQOs); carboidratos totais (CHt); e produtos metabólicos solúveis (PMS), que consistem em ácido lático (HLa), ácido butírico (HBu), ácido acético (HAc), ácido propiônico (HPr) e etanol (EtOH). Os sólidos suspensos voláteis (SSV) foram quantificados apenas nas correntes efluentes. As determinações de DQOt e DQOs (colorimetria), pH (potenciometria) e SSV (gravimetria) foram realizadas de acordo com os protocolos descritos no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2017). A determinação de HLa (colorimetria) foi baseada em Taylor (1996).

Técnicas cromatográficas foram utilizadas para análises de CHt e PMS. Para as determinações de HAc, HPr, HBu e EtOH, foi utilizado um cromatógrafo gasoso (GC, do inglês *gas chromatography*) (GC-2010, Shimadzu Scientific Instruments, Japão) equipado com um detector de ionização de chama (FID, do inglês *flame ionization detector*) e um amostrador automático COMBI-PAL (Shimadzu). Hidrogênio, ar sintético e nitrogênio foram utilizados como gás de arraste, gases de chama e gás de reposição, respectivamente (ADORNO; HIRASAWA; VARESCHE, 2014).

A determinação de CHt (sacarose, glicose, xilose, arabinose, galactose, manose e frutose) foi realizada em um cromatógrafo líquido de alto desempenho (CTO-20A COLUMN OVEN prominence, Shimadzu) equipado com uma bomba de injeção (LC-10 AD-VP, Shimadzu), amostrador automático (SIL-20A-HT prominence, Shimadzu), controlador (SCL-10 A-VP, Shimadzu), coluna Aminex® HPX-87P e um detector de índice de refração (RID, do inglês *refractive index detector*) (RID 10A, Shimadzu). Água ultra purificada (MilliPore, Estados Unidos da América, Direct-Q® 3 UV) foi usada como eluente a uma taxa de fluxo de 0,4 mL min⁻¹ (modo isocrático) e a temperatura do forno foi ajustada para 55°C. As amostras foram filtradas usando filtros de seringa descartáveis com tamanhos de poros de 1,0 e 0,20 µm (MACHEREY-NAGEL, Alemanha, CHROMAFIL® GF/PET-20/25) e, sempre que necessário, o pH foi ajustado para uma faixa de 5-9 com a adição de uma solução de hidróxido de sódio a 50% (p/v) e o volume adicionado foi considerado no cálculo dos fatores de diluição.

As amostragens espaciais foram realizadas nos dias 22, 36, 52 e 68 (escolhidos com o objetivo de obter uma distribuição temporal uniforme durante o período operacional e considerando o estabelecimento de um estado quase-estacionário durante o período de operação adotado) em modo descendente para compreensão da dinâmica do consumo de CHt e a geração/consumo de PMS ao longo da altura dos reatores sem causar grandes distúrbios hidrodinâmicos. As amostras líquidas foram coletadas a partir de septos de borracha localizados em cada compartimento (Figura 3) usando seringas de 5 mL.

A fase gasosa foi monitorada pela medição da vazão de biogás (VBG) e pela determinação da composição do biogás. A VBG foi quantificada por medidores de gás conectados ao *headspace* dos reatores com base em uma técnica de pulsometria, conforme descrito por Veiga et al. (1990), enquanto a composição do biogás (H_2 , N_2 , CH_4 e CO_2) foi avaliada por GC usando um detector de condutividade térmica (GC/TCD; modelo GC-2010, Shimadzu Scientific Instruments, Japão) e argônio como gás de arraste (PERNA et al., 2013).

O desempenho dos reatores foi avaliado pelas seguintes variáveis-resposta: eficiência de conversão de CHt (EC_{CHt} ; %), VBG ($mL\ d^{-1}$), teor de $bioH_2$ no biogás ($f-H_2$; %), taxa de produção volumétrica de hidrogênio calculada a partir do volume total dos reatores (PVH_{VT} , $mL-H_2\ L^{-1}\ d^{-1}$), produção volumétrica de hidrogênio calculada a partir do volume útil dos reatores (PVH_{VU} , $mL-H_2\ L^{-1}\ d^{-1}$), vazão molar de hidrogênio (VMH ; $mmol-H_2\ h^{-1}$) e rendimento de hidrogênio (HY , do inglês *hydrogen yield*; $mol-H_2\ mol^{-1}CHt$). A VBG, a PVH_{VT} e a PVH_{VU} expressam o volume de $bioH_2$ considerando a pressão local média da cidade de São Carlos, a qual está situada na região Centro-Leste do Estado de São Paulo (0,91 atm), e a temperatura na qual as reações bioquímicas ocorreram ($55^\circ C$). Os números de moles de $bioH_2$ expressos em VMH e HY também consideraram as mesmas condições de temperatura e pressão para fins de cálculo.

O protocolo descrito por Anzola-Rojas et al. (2015) foi adotado para estimar o coeficiente de rendimento do crescimento da biomassa ($Y_{X/S}$; $g-VSS\ g^{-1}CHt$), a evolução da retenção de biomassa e a taxa de carga orgânica específica ($COVe$; $g-CHt_{aplicado}\ g^{-1}SSV\ d^{-1}$). Uma nova abordagem baseada nesse protocolo foi utilizada para estimar a taxa de conversão orgânica específica ($COVRe$; $g-CHt_{convertido}\ g^{-1}SSV\ d^{-1}$), que representa a quantidade de substrato convertido pela quantidade de biomassa retida durante todo o período operacional em sistemas contínuos. As equações utilizadas para avaliação de desempenho são apresentadas na Tabela 3 e as frequências de análise com os respectivos métodos analíticos na Tabela 4.

Tabela 3. Equacionamento empregado no protocolo de cálculo utilizado no monitoramento dos reatores.

| Variável-resposta | Unidade | Equações | Parâmetros de cálculo |
|---|-------------------------------------|--|---|
| Eficiência de conversão de carboidratos totais (EC _{CHt}) | % | $EC_{CHt} = \left(\frac{CH_{af} - CH_{ef}}{CH_{af}} \right) \times 100$ | CH _{af} : concentração de carboidratos totais afluente ao reator [mg·L ⁻¹] CH _{ef} : concentração de carboidratos totais efluente ao reator [mg·L ⁻¹] |
| Vazão de biogás (VBG) | mL·d ⁻¹ | $VBG = N^{\circ}_{pulsos\ diários} \times V_{pulso}$ | N ^o _{pulsos diários} : quantidade de pulsos diários [pulso·d ⁻¹] V _{pulso} : volume do pulso [mL·pulso ⁻¹] |
| Fração de hidrogênio (f-H ₂) e gás carbônico (f-CO ₂) no biogás | % | $f - H_2 = \frac{nH_2}{n_{total}}$ $f - CO_2 = \frac{nCO_2}{n_{total}}$ | nH ₂ : número de mols de H ₂ [m-mol] nCO ₂ : número de mols de CO ₂ [m-mol] n _{total} : nH ₂ + nCO ₂ |
| Vazão volumétrica de hidrogênio (VVH) | mL-H ₂ ·d ⁻¹ | $VVH = VBG \times f - H_2$ | VBG: vazão de biogás [mL·d ⁻¹] f - H ₂ : fração de hidrogênio no biogás [%] |
| Vazão molar de hidrogênio (VMH) | mol-H ₂ ·d ⁻¹ | $VMH = \frac{P \times VVH}{R \times T}$ | P: 0,91-atmosfera média em São Carlos [atm] VVH: vazão volumétrica de hidrogênio [mL-H ₂ ·d ⁻¹] R: 0,08205746-constante universal dos gases perfeitos [L·atm·K ⁻¹ ·mol ⁻¹] T: 55+273,15-temperatura do biogás [°K] |

Tabela 3. Equacionamento empregado no protocolo de cálculo utilizado no monitoramento dos reatores (continuação).

| Variável-resposta | Unidade | Equações | Parâmetros de cálculo |
|--|--|---|--|
| Produção volumétrica de hidrogênio calculada a partir do volume útil (PVH _{VU}) | mL-H ₂ ·L ⁻¹ d ⁻¹ | $PVH_{VU} = \frac{VVH}{V_u}$ | <p>VVH: vazão volumétrica de hidrogênio [mL-H₂·d⁻¹] V_u: volume útil dos reatores [L]</p> |
| Produção volumétrica de hidrogênio calculada a partir do volume total (PVH _{VT}) | mL-H ₂ ·L ⁻¹ d ⁻¹ | $PVH_{VT} = \frac{VVH}{V_t}$ | <p>VVH: vazão volumétrica de hidrogênio [mL-H₂·d⁻¹] V_t: volume total dos reatores [L]</p> |
| Rendimento de hidrogênio (HY) | mol-H ₂ ·mol ⁻¹ CH | $HY = \frac{VMH}{Q_{af} \times (CH_{af} - CH_{ef}) M_{sacarose}}$ | <p>VMH: vazão molar de hidrogênio [mol-H₂·d⁻¹] Q_{af}: vazão afluenta aos reatores [L d⁻¹] CH_{af}: concentração de carboidratos totais afluenta ao reator [mg·L⁻¹] CH_{ef}: concentração de carboidratos totais efluenta ao reator [mg·L⁻¹] M_{sacarose}: 342-massa molar da sacarose [g·mol⁻¹]</p> |

Nota: o cálculo do rendimento de hidrogênio (HY) dos reatores levou em consideração a massa molar da sacarose devido a composição da água residuária sintética utilizada na alimentação dos reatores (Seção 4.3).

Tabela 4. Métodos analíticos e frequência de análises

| Variáveis | Frequência Semanal | Método | Referência |
|-------------------------------------|--------------------|--|------------------------------------|
| pH | 3x | Potenciometria | (APHA; AWWA; WEF, 2017) |
| DQO _t , DQO _s | 3x | Digestão/Espectrofotometria | (APHA; AWWA; WEF, 2017) |
| SSV | 3x | Gravimetria/Calcinação | (APHA; AWWA; WEF, 2017) |
| AOV e Solventes | 3x | Cromatografia gasosa | (ADORNO; HIRASAWA; VARESCHE, 2014) |
| Vazão de Biogás | Diária | Deslocamento de líquido | Adaptado de Veiga et al. (1990) |
| Composição de Biogás | 3x | Cromatografia gasosa | (PERNA et al., 2013) |
| Carboidratos totais | 3x | Cromatografia líquida de alta eficiência | - |
| Ácido láctico | 3x | Digestão/Espectrofotometria | (TAYLOR, 1996) |

4.4 DESMONTAGEM COMPARTIMENTADA DOS REATORES E ANÁLISES MOLECULARES

Ao final do período operacional, o meio líquido foi drenado em cada compartimento de cima para baixo (i.e., câmara de saída (CS), compartimentos da zona de leito (C4, C3, C2 e C1) e câmara de alimentação (CA), respectivamente), o que permitiu determinação a distribuição da biomassa suspensa. A biomassa aderida foi coletada a partir da lavagem das paredes da zona de leito, dos materiais suporte do AnSTBR (anéis de PEBD) e AnPBR (aparas de PEBD) e das telas usadas para segurar o leito-fixo, enquanto a biomassa aderida no AnTR foi coletada apenas pela lavagem das paredes internas da zona de leito e das telas. As quantidades de biomassa suspensa e aderida foram quantificadas como SSV.

A caracterização das comunidades microbianas foi realizada para as amostras de biomassa coletadas dos inóculos (vinhaça de cana-de-açúcar fermentada), das câmaras de alimentação (biomassa suspensa) e das zonas de leito (biomassa aderida) dos reatores. As amostras das câmaras de alimentação e das zonas de leito foram coletadas ao final da operação. Essa abordagem, associada às técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*) e eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE, do inglês *denaturing gradient gel electrophoresis*), foi utilizada para avaliar a influência dos diferentes

arranjos de leito, bem como sua ausência, na estrutura e na diversidade das comunidades microbianas estabelecidas ao longo dos reatores. As amostras de biomassa foram lavadas com uma solução salina tamponada com fosfato (PBS, do inglês *phosphate-buffered saline*) para remoção de impurezas e manutenção de condições adequadas de armazenamento. Aproximadamente 0,5g de biomassa úmida de cada amostras foi armazenada a -20°C. Em seguida, as amostras foram submetidas à PCR usando o conjunto de *primers* 968FGC - 1401R referente ao domínio *Bacteria* (NÜBEL et al., 1996) e seu produto usado na técnica DGGE (MUYZER; WAAL; UITIERLINDEN, 1993). As etapas detalhadas dos ensaios de biologia molecular são ilustradas na Tabela 5.

4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICA

As variáveis de monitoramento (pH, f-H₂, HAc, HPr, HLa, HBu e EtOH), as variáveis-resposta (EC_{CH₆}, PVH_{VT}, PVH_{VU} e HY) e a COV_{a(CA)} foram submetidas a testes estatísticos de análise de variância unidirecional (*One-Way* ANOVA). Os testes estatísticos visavam verificar diferenças significativas entre os reatores (variável independente) para determinadas variáveis dependentes. Em geral, os dados foram submetidos aos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (Levene) para verificar os pressupostos necessários para o uso da *One-Way* ANOVA emparelhada com o teste post-hoc de Tukey (FIELD, 2018; HAUKOOS; LEWIS, 2005). Para dados com distribuição não gaussiana, foram realizados procedimentos de *bootstrapping* (1.000 reamostragens; intervalo de confiança (IC) de 95% BCa) para corrigir desvios da normalidade e garantir um IC de 95% entre as médias para maior confiabilidade estatística (HAUKOOS; LEWIS, 2005). Os dados que apresentaram heterogeneidade de variância foram submetidos à correção de Welch e as médias foram comparadas pela técnica post-hoc de Games-Howell (FIELD, 2018).

Tabela 5. Ensaio de biologia molecular (PCR/DGGE): detalhamento passo a passo.

| Passos | | |
|--|---|--|
| Extração do DNA | Kit de extração | Fabricante |
| | <i>FastDNA™ SPIN Kit for Soil DNA Extraction</i> | MP Biomedicals, Irvine, CA, USA |
| PCR | Instrumento | Conjunto de <i>primers</i> |
| | <i>Thermocycler Eppendorf AG - 22331 Hamburg, Germany</i> <i>Eppendorf AG - 22331 Hamburg, Germany</i> | 968FGC - 1401R (referente ao Domínio <i>Bacteria</i>) |
| DGGE | Instrumento | Condições de operação |
| | <i>DCode™ Universal Mutation Detection System (Bio-Rad)</i> | Gradiente de desnaturação de 45 a 65%, 75V sob temperatura constante (60°C) por 16 horas |
| Processamento do resultado do DGGE | Instrumento | Condição de processamento |
| | <i>Photodocumentation System (L. PixTpuch - Loccus Biotechnology)</i> | Exposição à radiação UV (254 nm) |
| Cálculo do coeficiente de similaridade e elaboração do dendrograma | <i>Software</i> | Versão |
| | <i>BioNumerics</i> | 7.0 |
| Cálculo dos índices ecológicos: D, H' e Chao-1 | <i>Software</i> | Versão |
| | <i>Past</i> | 4.03 |

Abreviaturas: D-dominância, H'-índice de diversidade de Shannon, Chao-1-riqueza relativa.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo, são apresentados os resultados obtidos a partir da realização das etapas experimentais do presente projeto de pesquisa. Os resultados ora apresentados foram fundamentalmente estruturados tendo em vista as hipóteses e objetivos previamente definidos, bem como foram discutidos com base nos conceitos elencados a partir da pesquisa bibliográfica referente às temáticas de pesquisa.

Inicialmente, aspectos relacionados ao comportamento hidrodinâmico são apresentados a fim de caracterizar diferenças nos padrões de escoamento relacionadas aos diferentes tipos de leito fixo empregados em cada configuração de reator, tendo em vista a sua relação intrínseca com o desempenho dos sistemas.

Características composicionais da água residuária utilizada durante a etapa de inoculação são apresentadas a fim de verificar o impacto das diferentes configurações reacionais sobre a conversão de substratos e as rotas metabólicas estabelecidas.

Os desempenhos dos reatores são apresentados em termos da distribuição de biomassa, dinâmica de retenção de biomassa, produção de bioH_2 e produtos metabólicos solúveis. Os balanços de massa da fase solúvel e global são apresentados a fim de avaliar a confiabilidade e a representatividade dos métodos analíticos empregados, bem como promover uma visualização geral dos caminhos metabólicos estabelecidos.

Por fim, são apresentados aspectos relacionados à diversidade e similaridade das comunidades microbianas selecionadas ao término das operações por meio de técnicas de biologia molecular. Tais resultados são discutidos de forma comparativa entre si e a outros trabalhos relacionados à produção de bioH_2 a partir de configurações de reatores semelhantes aos adotados no presente estudo.

5.1 AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO: CONVERSÃO DE SUBSTRATO E PRODUÇÃO DE BIOH_2

Considerando que a conversão de substrato fresco (i.e., CH_t) é o processo primário de produção de bioH_2 em sistemas fermentativos, os coeficientes de variação (CV) das EC_{CH_t} foram utilizados como medida estatística para definição do período de estabilidade visando garantir uma base temporal comparativa entre os reatores. Um CV por volta de 20% foi adotado como referência para determinação do período de estabilidade. Deve-se notar que o período de estado quase-estacionário foi utilizado como base comparativa para os perfis temporais das

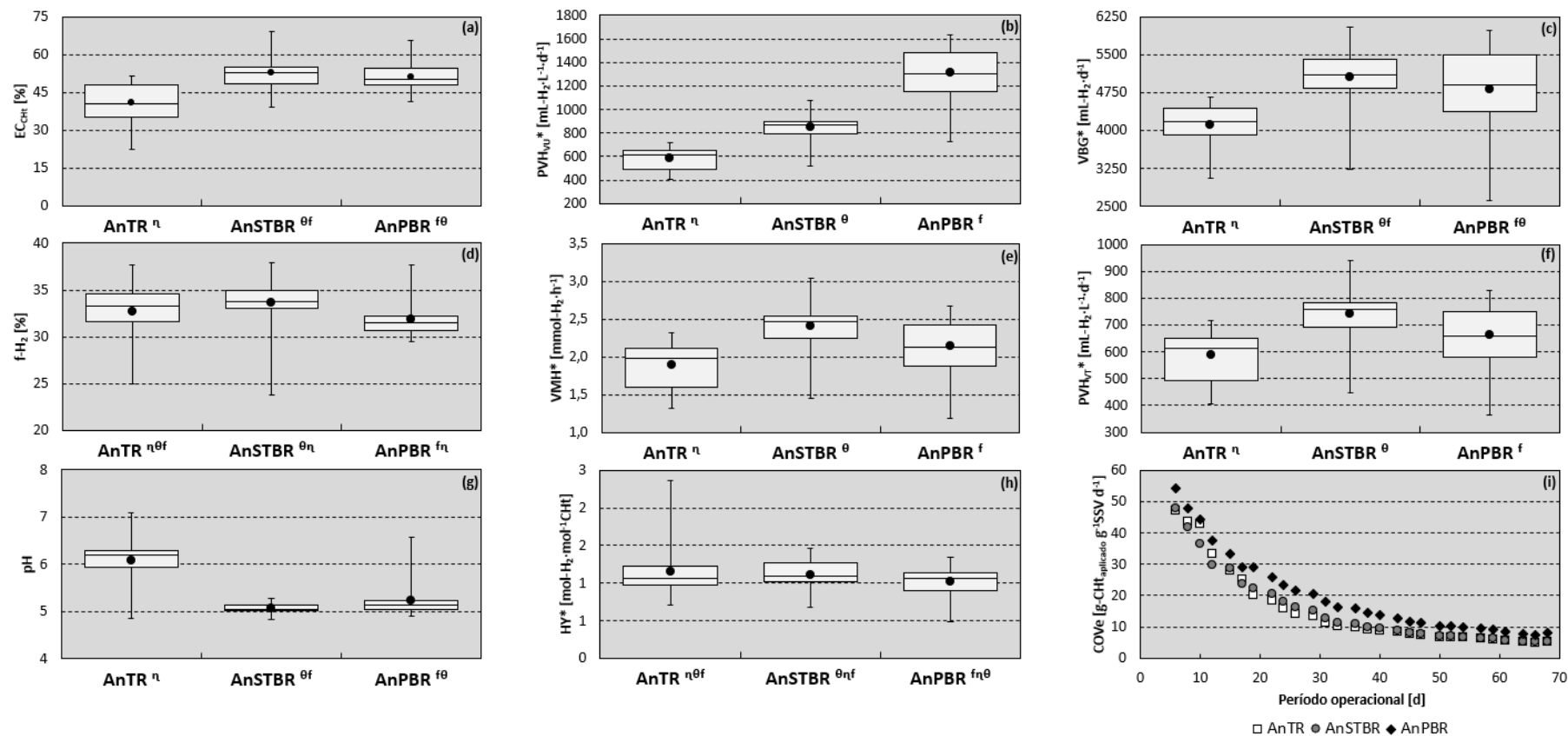
variáveis-resposta dos reatores. As variáveis-resposta utilizadas para análise de desempenho dos reatores no período de estado quase-estacionário são apresentadas na Figura 5. Uma apresentação mais detalhada incluindo os períodos de instabilidade, estado quase-estacionário e todo o período de operação com valores médios, máximos e de desvio padrão é apresentada no Apêndice C.

Apesar de uma quantidade de biomassa total retida cerca de 2 vezes menor em comparação ao AnTR e ao AnSTBR (padrão mais detalhado e discutido na Seção 5.2), o AnPBR apresentou uma EC_{CHt} média de $51,04 \pm 5,71\%$, a qual provou ser estatisticamente equivalente ao observado no AnSTBR ($52,55 \pm 6,66\%$) e cerca de 10% maior em comparação ao observado no AnTR ($40,95 \pm 8,23\%$) (Figura 5a). A EC_{CHt} média calculada para o AnTR apresentou diferenças significativas em comparação ao demais reatores. No geral, estes resultados indicam que a ausência de material suporte no AnTR afetou negativamente a capacidade de conversão de substrato da biomassa retida em comparação com os reatores que forneceram material suporte para o crescimento de biomassa aderida (AnSTBR e AnPBR).

Uma produção contínua de $bioH_2$ foi observada em todos os reatores. Diversos estudos utilizam a PVH_{VU} como uma variável-resposta chave para avaliar o desempenho de sistemas fermentativos voltados para a produção de $bioH_2$. Sob esta perspectiva, o desempenho do AnPBR ($1312,66 \pm 230,40 \text{ mL-H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) foi cerca de 2,2 e 1,5 vezes maior em relação ao AnTR ($586,22 \pm 98,12 \text{ mL-H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) e ao AnSTBR ($854,74 \pm 139,77 \text{ mL-H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), respectivamente (Figura 5b). Outro aspecto a ser considera é que apesar da equivalência entre as EC_{CHt} do AnSTBR e AnPBR, o último apresentou um desempenho muito superior em termos de produção de $bioH_2$ sob esta perspectiva de avaliação. Entretanto, a VBG (Figura 5c), a $f-H_2$ (Figura 5d) e a VMH (Figura 5e) determinadas no AnSTBR ($5057.65 \pm 601.69 \text{ mL d}^{-1}$; $33.70 \pm 2.75 \%$; $2.41 \pm 0.39 \text{ mmol-H}_2 \text{ h}^{-1}$) superam aquelas determinadas no AnTR ($4100,91 \pm 403,28 \text{ mL d}^{-1}$; $32,73 \pm 3,25 \%$; $1,90 \pm 0,32 \text{ mmol-H}_2 \text{ h}^{-1}$) e AnPBR ($4812,28 \pm 918,68 \text{ mL d}^{-1}$; $31,82 \pm 1,95 \%$; $2,14 \pm 0,38 \text{ mmol-H}_2 \text{ h}^{-1}$). Vale destacar que a VMH do AnSTBR foi 12,6% maior comparada ao AnPBR, enquanto o último demonstrou ser 53,6% maior do que o primeiro em termos de PVH_{VT} .

Em vista dos resultados supracitados, a maior PVH_{VU} observada no AnPBR está intrinsecamente relacionada ao seu volume útil (1,16 L), o qual corresponde a 50 e 57% do volume útil do AnTR (2,30 L) e AnSTBR (2,02 L), respectivamente. Neste contexto, uma abordagem alternativa para avaliação de desempenho em termos de produção de $bioH_2$ foi utilizada.

Figura 5. Avaliação de desempenho temporal: (a) eficiência de conversão de carboidratos totais (EC_{CH}), (b) produção volumétrica de hidrogênio calculada usando o volume útil (PVH_{VU}), (c) vazão de biogás (VBG), (d) fração de hidrogênio no biogás ($f-H_2$), (e) vazão molar de hidrogênio (MFH), (f) produção volumétrica de hidrogênio calculada usando o volume total (PVH_{VT}), (g) rendimento de hidrogênio (HY), (h) pH e (i) carga orgânica volumétrica removida específica (COVRe).



Notas: os índices n , θ e f representam o AnTR, o AnSTBR e o AnPBR, respectivamente. O reator que apresenta o índice dos demais indica que os valores médios da variável de resposta ou do parâmetro analisado apresentaram similaridade estatisticamente significativa. Os box-plots foram elaborados a partir dos dados referentes ao período de quase-estado estacionário (dias 22 a 68). *O volume e o número de moles de bio H_2 foram estimados considerando a pressão atmosférica média da cidade de São Carlos (0,91 atm) e a temperatura em que ocorreram as reações bioquímicas (55°C). Abreviaturas: AnTR-reator anaeróbico tubular, AnSTBR-reator anaeróbico de leito estruturado, AnPBR-reator anaeróbico de leito empacotado.

No caso específico deste estudo, no qual as bases comparativas entre os sistemas foram estritamente baseadas na aplicação das mesmas condições operacionais na CA e na equidade do volume total dos reatores, o PVH_{VT} provou ser a variável-resposta mais adequada para avaliação de desempenho. Seguindo esta abordagem, uma maior produtividade média baseada na PVH_{VT} (Figura 5f) foi observada no AnSTBR ($743,25 \pm 121,54 \text{ mL-H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), seguido pelo AnPBR ($662,04 \pm 116,20 \text{ mL-H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) e AnTR ($586,22 \pm 98,12 \text{ mL-H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) (todos estatisticamente diferentes entre si), respectivamente. Desta forma, as PVH_{TV} determinadas em cada um dos reatores passam a corroborar as VBG, as $f\text{-H}_2$ e as VMH.

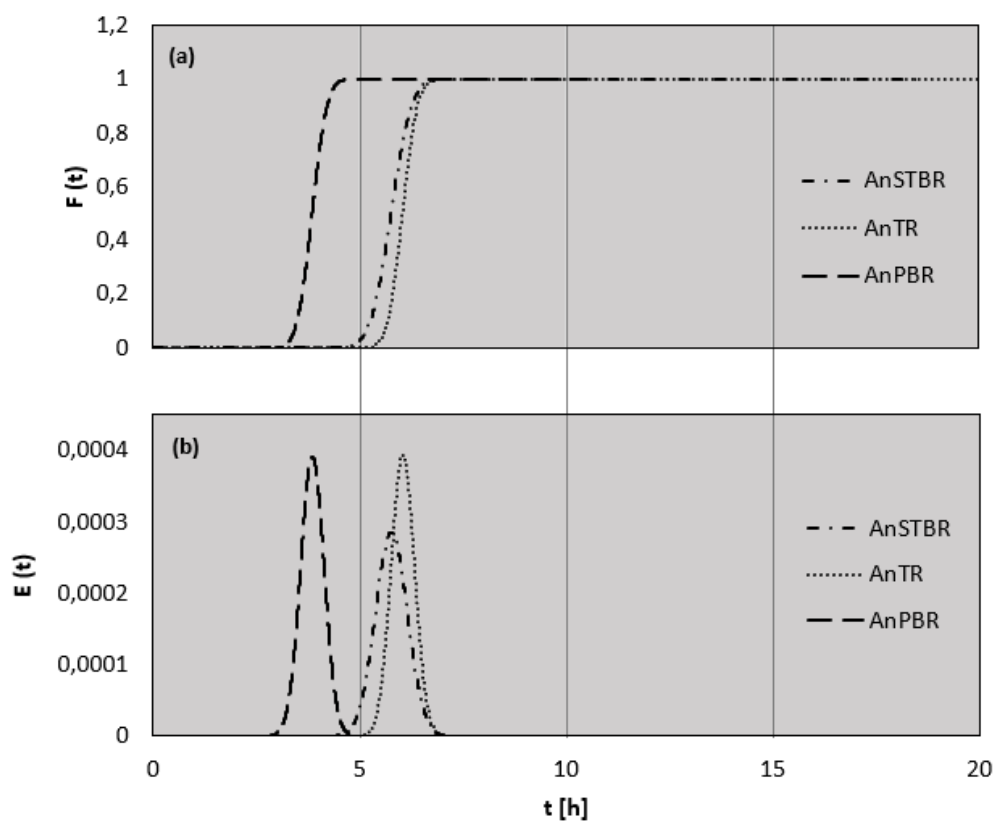
Além disso, esta abordagem permite inferir que a PVH_{TV} consiste em uma variável-resposta mais adequada para comparar configurações de reatores com porosidades distintas, como p.ex. AnSTBR (alta porosidade) comparado com o AnPBR (baixa porosidade), gerando resultados mais confiáveis sobre a ‘real’ produção de bioH_2 de uma dada tecnologia. Em outras palavras, a PVH_{VT} não permite que o volume útil de uma determinada configuração de reator, muitas vezes afetada pelo arranjo do material suporte disposto na zona de leito, mascare a avaliação de desempenho. Alternativamente, o projeto de reatores com foco na comparação de sistemas com volumes úteis equivalente pode levar a um uso mais adequado da PVH_{VU} , independentemente de diferenças na porosidade.

Os valores de pH medidos nos substratos fermentados (Figura 5g) indicou que tanto o AnSTBR ($5,06 \pm 0,1$) quanto o AnPBR ($5,23 \pm 0,37$) alcançaram uma faixa mais favorável à produção de bioH_2 (5,0-5,2 (FUESS et al., 2021b; FUESS; ZAIAT; DO NASCIMENTO, 2019)), enquanto o AnTR ($6,08 \pm 0,56$) apresentou valores fora desta faixa, o que corrobora a produção de bioH_2 observada. Embora valores de pH que excedem 5,0-5,5 nem sempre sejam deletérios para a produção de bioH_2 , rotas metabólicas específicas, tais como a sulfetogênese (ROGERI et al., 2023) e a fermentação propiônica (FUESS; ZAIAT; DO NASCIMENTO, 2019; SAADY, 2013) são favorecidas sob tais condições, impactando negativamente a atividade hidrogenogênica. Além disso, a maior estabilidade do AnSTBR em comparação aos demais reatores é um fator a ser destacado, considerando a relevância do potencial hidrogeniônico na produção de bioH_2 . Por fim, apesar das diferentes produtividades de bioH_2 , os reatores apresentaram níveis equivalentes de HY (Figura 5h) e faixas similares de COVe durante o período operacional (Figura 5i).

5.2 DISTRIBUIÇÃO DE BIOMASSA E PERFIS ESPACIAIS DE CARBOIDRATOS E PRODUTOS METABÓLICOS SOLÚVEIS

O protocolo de desmontagem associado à amostragem especial permitiu avaliar a distribuição quanti-qualitativa da biomassa, o consumo de substrato fresco e a granação/consumo de PMS ao longo da altura dos reatores. Os detalhes da distribuição quantitativa de biomassa são apresentados na Tabela 2 e exibem diferentes quantidades de biomassa retida entre os reatores e seus diferentes compartimentos ao final do período operacional. Embora a $COV_{a(CA)}$ e o tempo de detenção hidráulica na CA (TDH_{CA}) tenham permanecido em níveis equivalentes (sem diferenças significativas estatisticamente validadas), diferentes quantidades de biomassa foram medidas na CA, bem como foram notados diferentes padrões de distribuição. Vale notar que os resultados dos ensaios hidrodinâmicos (Figura 6 e Tabela 6) demonstraram o estabelecimento de padrão de fluxo pistonado em todos as configurações de reatores investigadas, o que garante a confiabilidade na abordagem de avaliação compartimentada utilizada.

Figura 6. Ensaios hidrodinâmicos: (a) curvas de resposta de saída de traçador normalizadas $F(t)$ e (b) curvas de distribuição de tempo de residência $E(t)$.



Abreviaturas: AnTR-reator anaeróbico tubular, AnSTBR-reator anaeróbico de leito estruturado, AnPBR-reator anaeróbico de leito empacotado.

Tabela 6. Características hidrodinâmicas: número de reatores de tanque agitado contínuo em série (N-CSTR), tempo médio de retenção hidráulica ($\bar{\theta}_h$) e tempo experimental de retenção hidráulica (HRT)

| Reator | N-CSTR | $\bar{\theta}_h$ [h] | HRT ^a [h] |
|--------|--------|----------------------|----------------------|
| AnTR | 459 | 6.05 | 7.07±0.22 |
| AnSTBR | 221 | 5.75 | 6.22±0.13 |
| AnPBR | 185 | 3.87 | 3.58±0.09 |

Nota: ^avalores médios e desvios padrão obtidos durante a operação a partir do monitoramento da vazão aplicada nos reatores.

Abreviaturas: AnTR-reator anaeróbio tubular, AnSTBR-reator anaeróbio de leito estruturado, AnPBR-reator anaeróbio de leito empacotado, N-CSTR-número de reatores contínuos de tanque agitado de igual volume em série.

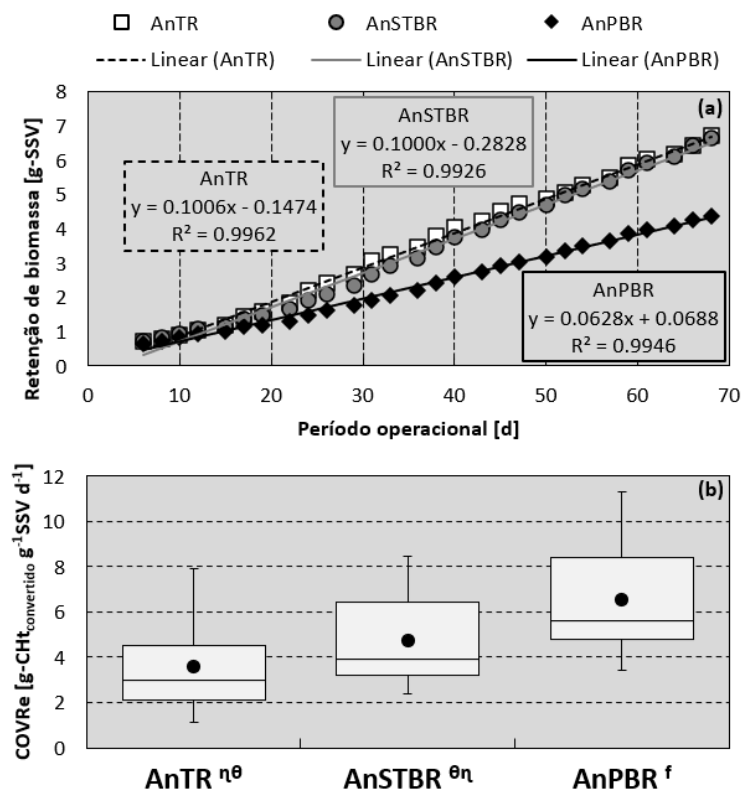
Os perfis de distribuição de biomassa revelaram que as maiores frações de biomassa retida ocorreram na CA de todos os reatores (77,22%-AnTR, 89,37%-AnSTBR e 71,46%-AnPBR). Em termos quantitativos, a biomassa retida na CA do AnSTBR (5,48 g-VSS) foi cerca de duas vezes maior em comparação com o AnPBR (2,76 g-VSS), assim como 16,6% maior em comparação com o AnTR (4,70 g-SSV). Apesar das quantidades relativamente similares de biomassa total retida no AnTR (6,08 g-SSV) e AnSTBR (6,13 g-VSS), o primeiro apresentou quantidades mais elevadas de biomassa aderida (1,07g-VSS) e suspensa (0.31g-VSS) na zona de leito, as quais juntas representam mais do dobro da quantidade de biomassa total retida na zona de leito do AnSTBR (0,49 g-SSV aderida e 0,16 g-VSS suspensa) e cerca de 25% mais em comparação com o AnPBR (0,96 g-SSV aderida e 0,14 g- VSS suspensa) para o mesmo compartimento.

A partir de modelos de regressão linear e a subsequente derivação das equações ajustadas para as retenções de biomassa estimadas (Figura 7a), foram obtidas as taxas de retenção de biomassa: o AnTR (100,6 mg-SSV d⁻¹) apresentou uma taxa de retenção equivalente ao AnSTBR (100 mg-SSV d⁻¹), enquanto no AnPBR (62,8 mg-SSV d⁻¹) uma taxa cerca de 48% menor foi observada. Apesar da menor área superficial disponível para o crescimento aderido de biomassa (Tabela 2, Seção 4.1), o AnTR alcançou uma maior capacidade de retenção de biomassa, especialmente em comparação com o AnPBR.

Analisar os valores de $Y_{X/S}$ para consórcios microbianos anaeróbios tem sido uma abordagem amplamente utilizada para entender os padrões de retenção de biomassa em diferentes configurações de reatores (ANZOLA-ROJAS et al., 2015; ANZOLA-ROJAS; ZAIAT, 2016; AQUINO; FUESS; PIRES, 2017; FUESS et al., 2021a; GOMES et al., 2015). Os valores de $Y_{X/S}$ estimados (Figura 7) podem ser considerados representativos para avaliação da capacidade de retenção e crescimento de biomassa dada a equivalência entre as quantidades

medidas (ao final do período operacional) e estimadas (a partir do protocolo de cálculo da COVe) de biomassa retida nos sistemas. Em uma primeira perspectiva, baseada em argumentos comumente relatados na literatura (AQUINO; FUESS; PIRES, 2017; FUESS et al., 2021a; GOMES et al., 2015), a disposição aleatória e a baixa porosidade associada à alta disponibilidade de área superficial em reatores de leito fixo empacotado geralmente levam a uma maior capacidade de retenção de biomassa e, conseqüentemente, a níveis mais baixos de lavagem de biomassa em comparação com outras configurações de reatores (p.ex., AnSTBR e reator contínuo de tubos múltiplos (CMTR, do inglês *continuous multiple tube reactor*). Estes estudos correlacionam maiores densidades celulares com uma menor demanda de energia metabólica direcionada para o crescimento, o que sustenta os valores relativamente baixos de $Y_{X/S}$ observados em tais casos. No entanto, os resultados aqui obtidos contradizem a hipótese de que níveis mais altos de retenção de biomassa deveriam estar associados à uma maior disponibilidade de área superficial.

Figura 7. Retenção de biomassa e conversão de substrato fresco: (a) evolução da biomassa dentro dos reatores e taxas de retenção e (b) variação da carga orgânica volumétrica removida específica (COVRe) (período de quase-estado estacionário, dias 22-68).



Notas: os índices ^g, ^h e ^f representam o AnTR, o AnSTBR e o AnPBR, respectivamente. O reator que apresenta o índice dos demais indica que os valores médios da variável de resposta ou do parâmetro analisado apresentaram similaridade estatisticamente significativa. Abreviaturas: y-retenção de biomassa, x-período de operação (tempo), R²-coeficiente de determinação, AnTR-reator anaeróbico tubular, AnSTBR-reator anaeróbico de leito estruturado, AnPBR-reator anaeróbico de leito empacotado.

Tabela 7. Níveis de distribuição de biomassa e coeficientes de rendimento de crescimento para diferentes configurações de reatores de leito fixo.

| Distribuição de biomassa [g-SSV] e fração relativa (^a , ^b) | | | | | | | | Y _{x/s} ^D | Reator | Referência |
|--|--|--|---|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|--------|-------------------------------|------------------|--|
| CA | Suspensa ^A | Suspensa ^B | Aderida (zona de leito) | Retida medida | Retida estimada ^C | Lavada | Total | | | |
| 4,70 (9,7% ^a ;77,2% ^b) | 0,31 (0,6% ^a ;5,2% ^b) | 5,01 (10,3% ^a ;82,4% ^b) | 1,07* (2,2% ^a ;17,6% ^b) | 6,08 (12,5% ^a) | 6,81 | 42,6 (87,5% ^a) | 48,68 | 0,055 | AnTR | Este estudo |
| 5,48 (9,9% ^a ;89,3% ^b) | 0,16 (0,3% ^a ;2,7% ^b) | 5,64 (10,2% ^a ;92% ^b) | 0,49 (0,9% ^a ;8% ^b) | 6,13 (11,1% ^a) | 6,83 | 49,5 (88,9% ^a) | 55,63 | 0,051 | AnSTBR | Este estudo |
| 2,76 (5,8% ^a ;71,5% ^b) | 0,14 (0,3% ^a ;3,17% ^b) | 2,90 (6,1% ^a ;75,1% ^b) | 0,96 (2% ^a ;24,9% ^b) | 3,86 (8,1% ^a) | 4,50 | 44,0 (91,9% ^a) | 47,86 | 0,046 | AnPBR | Este estudo |
| 10,28 (3,9% ^a ;44,62% ^b) | 0,47 (0,2% ^a ;2% ^b) | 10,75 (4,1% ^a ;46,7% ^b) | 12,29 (4,8% ^a ;53,3% ^b) | 23,04 (8,9% ^a) | 25,48 | 236,6 (91,1% ^a) | 259,64 | 0,056 | AnSTBR | (FUESS et al., 2021a) ¹ |
| - | - | 34,07 (14,8% ^a ;79,8% ^b) | 8,6 (3,7% ^a ;20,2% ^b) | 42,67 (18,5% ^a) | - | 187,5 (81,5% ^a) | 230,17 | 0,051 | AnSTBR | (ANZOLA-ROJAS; ZAIAT, 2016) ² |
| - | - | 6,4 (10,1% ^a ;33,2% ^b) | 12,9 (20,3% ^a ;66,8% ^b) | 19,3 (30,4% ^a) | - | 44,3 (69,6% ^a) | 63,6 | 0,030 | AnPBR C/N=140 | (ANZOLA-ROJAS et al., 2015) ³ |
| - | - | 4,4 (4,1% ^a ;15,6% ^b) | 23,7 (22,2% ^a ;84,3% ^b) | 28,1 (26,4% ^a) | - | 78,5 (73,6% ^a) | 106,7 | 0,040 | AnPBR C/N=40 | (ANZOLA-ROJAS et al., 2015) ³ |

Notas: ^ABiomassa suspensa no meio líquido dos compartimentos da zona de leito (C1, C2, C3 e C4) e na câmara de saída; ^BBiomassa suspensa em todo o meio líquido (câmara de alimentação + compartimentos da zona de leito + câmara de saída); ^CBiomassa retida estimada a partir do cálculo da COVe; ^D[g-SSV g⁻¹CHT]; ^aFração relacionada à biomassa total produzida (retida e lavada); ^bFração relacionada à biomassa retida (suspensa e aderida); ¹Condições operacionais: TDH = 6 h, COVa = 20 kg-DQOt m⁻³ d⁻¹, T = 55°C, meio de suporte de PEBD, período operacional = 141 dias nessas condições, substrato = melão de cana-de-açúcar e fluxo ascendente; ²Condições operacionais: TDH = 2 h, COVa = 24 kg-DQOt m⁻³ d⁻¹, T = 25°C, meio de suporte de PEBD, período operacional = 90 dias, substrato = água residual à base de sacarose e fluxo descendente; ³Condições operacionais: TDH = 2 h, COVa = 24 kg-DQOt m⁻³ d⁻¹, T = 25°C, meio de suporte de PEBD, período operacional = 60 dias, substrato = água residuária à base de sacarose, C/N = 140, fluxo ascendente; *Quantidade de biomassa fixada nas paredes internas da zona do leito.

Abreviaturas: C/N-razão carbono-nitrogênio, DQOt-demanda química de oxigênio total, TDH-tempo de detenção hidráulica, PEBD-polietileno de baixa densidade, COVa-carga orgânica volumétrica aplicada, COVe- carga orgânica volumétrica específica, T-temperatura, Y_{x/s}-coeficiente de rendimento de crescimento de biomassa, CA-câmara de alimentação, AnTR-reator anaeróbio tubular, AnSTBR-reator anaeróbio de leito estruturado, AnPBR-reator anaeróbio de leito empacotado.

Embora os $Y_{X/S}$ estimados estejam em faixas semelhantes às aquelas relatadas em outros estudos (Figura 7, (ANZOLA-ROJAS et al., 2015; ANZOLA-ROJAS; ZAIAT, 2016; FUESS et al., 2021a)), foi observado um padrão distinto em termos de lavagem e distribuição de biomassa. O AnPBR apresentou uma lavagem de biomassa que correspondeu a 91,94% de toda a biomassa produzida, enquanto no AnSTBR e AnTR as frações de biomassa lavada corresponderam a 88,97% e 87,49%, respectivamente (Tabela 7). Consequentemente, a maior fração relativa de biomassa retida foi medida no AnTR (12,51%) em comparação com o AnSTBR (11,03%) e AnPBR (8,06%) (Tabela 7).

A COVe tem sido utilizada para analisar a relação entre a disponibilidade de substrato e a biomassa retida em sistemas fermentativos contínuos e sua relação com a evolução de bioH₂ (ANZOLA-ROJAS et al., 2015; BLANCO; FUESS; ZAIAT, 2017; FERRAZ JÚNIOR; ETCHEBEHERE; ZAIAT, 2015; FUESS et al., 2016, 2018; FUESS; ZAIAT; DO NASCIMENTO, 2019; GOMES et al., 2015). No entanto, a COVRe é uma variável-resposta facilmente acessada por meio de uma pequena modificação no protocolo de cálculo da COVe e que representa a relação entre a quantidade de substrato convertido e a quantidade de biomassa retida em sistemas contínuos. Em geral, a COVRe pode ser considerada como uma boa aproximação para avaliar a eficácia de um dado consórcio microbiano retido em termos específicos de conversão de substrato. Sob esta abordagem, a COVRe estimada (Figura 7b) demonstra que o AnPBR ($6,54 \pm 2,52 \text{ g-CHt}_{\text{convertidos}} \text{ g}^{-1} \text{SSV d}^{-1}$) apresentou uma biomassa mais eficaz (estatisticamente significativa) em termos específicos de conversão de substrato fresco em comparação com o AnSTBR ($4,74 \pm 2,06 \text{ g-CHt}_{\text{convertidos}} \text{ g}^{-1} \text{SSV d}^{-1}$) e AnTR ($3,61 \pm 1,94 \text{ g-CHt}_{\text{convertidos}} \text{ g}^{-1} \text{SSV d}^{-1}$) (ambos os últimos estatisticamente equivalentes), respectivamente. Tais achados demonstram que o AnPBR foi capaz de reter uma biomassa com maior atividade celular específica devido ao maior valor de COVRe, o que corrobora o desempenho de conversão de substrato previamente relatado (Seção 5.1).

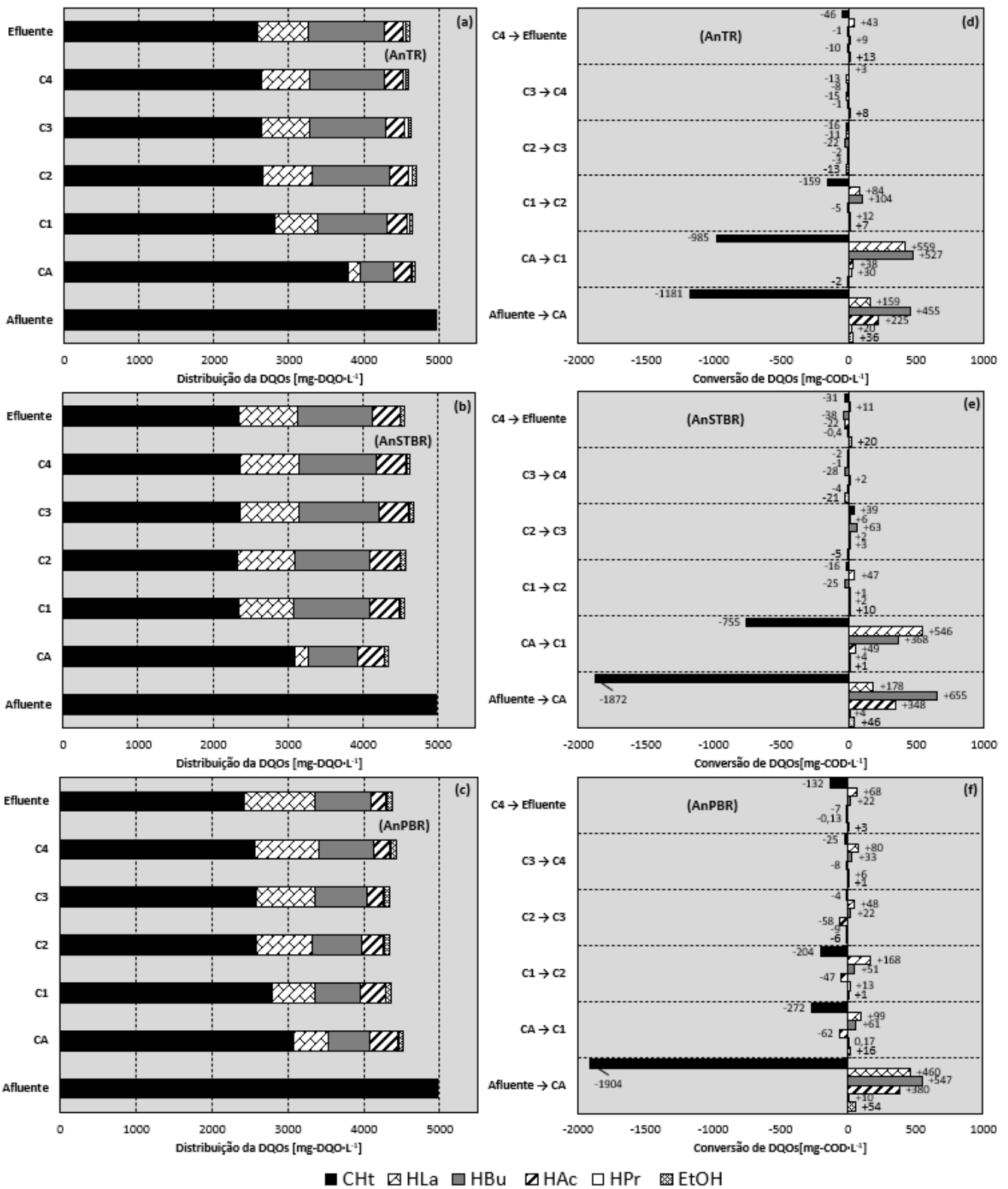
A maioria dos estudos que buscam estender a relação entre retenção de biomassa com a conversão de substrato e a consequente produção de bioH₂ (ANZOLA-ROJAS et al., 2015; ANZOLA-ROJAS; ZAIAT, 2016; BLANCO; FUESS; ZAIAT, 2017; FUESS et al., 2018, 2021a; FUESS; ZAIAT; DO NASCIMENTO, 2019; GOMES et al., 2015), incluindo este, são geralmente baseados na quantificação de biomassa por meio da determinação do teor de SSV de uma dada amostra de lodo. No geral, a análise da dinâmica de crescimento, retenção e lavagem de biomassa realizada exclusivamente através da determinação de SSV não permite distinguir as distintas frações que podem compreender uma determinada amostra de lodo. Por mais que esta abordagem seja amplamente utilizada para compreender a dinâmica de biomassa

em reatores de leito fixo, uma abordagem alternativa que considere a quantificação de substâncias poliméricas extracelulares (EPS, do inglês *extracellular polymeric substances*) e a fração de biomassa ativa pode compreender uma avaliação mais apropriada, dado que mesmo com quantidades distintas de biomassa retida (quantificadas apenas como SSV), o AnSTBR e o AnPBR demonstraram EC_{CHt} médias equivalentes (comportamento discutido anteriormente na Seção 5.1).

As EPS são caracterizadas como produtos metabólicos complexos de alto peso molecular, compostos principalmente por polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos, bem como por frações menos significativas de lipídeos e ácidos húmicos (LASPIDOU; RITTMANN, 2002). Dentre as diversas funções das matrizes de EPS relatadas na literatura, essas substâncias têm demonstrado desempenhar papel fundamental na fixação de biomassa em meios de suporte, agregação de células planctônicas em flocos e grânulos, assim como na formação e estruturação de biofilmes (BANU et al., 2018; LASPIDOU; RITTMANN, 2002; SHENG; YU; LI, 2010). Por mais que a determinação de EPS não tenha sido realizada neste estudo, os resultados quantitativos de retenção e lavagem de biomassa associados às COVRe calculadas sugerem fortemente que a ausência de meios de suporte no AnTR resultou em uma menor densidade celular em comparação com o AnSTBR e AnPBR, respectivamente, produzindo também maiores quantidades de EPS como uma “estratégia de sobrevivência” para compensar a menor disponibilidade de área superficial para o crescimento aderido.

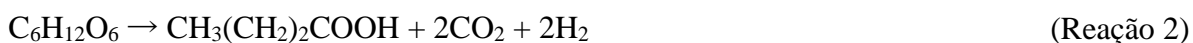
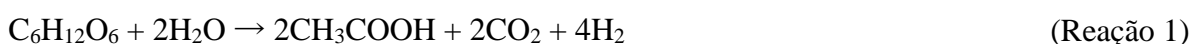
Os perfis espaciais de CHt e PMS (Figura 8a, b, c) são representados em termos de valores médios correspondentes aos perfis realizados durante o período de operação e permitiram visualizar padrões de consumo de substrato fresco e as vias metabólicas estabelecidas ao longo da altura dos reatores. As conversões de CHt e PMS ao longo dos reatores são representadas na Figura 8d, e, f em termos de valores médios correspondentes à conversão de DQOs calculados a partir dos perfis espaciais, demonstrando um padrão distinto entre os sistemas (os dados discretos correspondentes a cada perfil espacial são apresentados no Apêndice D). No geral, padrões metabólicos similares enfatizando diferenças quantitativas foram observadas no AnTR e AnSTBR. Por outro lado, um padrão metabólico distinto foi encontrado no AnPBR.

Figura 8. Perfis espaciais: (a, b, c) distribuição de CHT e SMP e (d, f, g) padrões de conversão de DQO entre compartimentos.



Abreviaturas: CA-câmara de alimentação, compartimentos C1/C2/C3/C4 da zona de leito, CHT-carboidratos totais, HAc-ácido acético, HPr-ácido propiônico, HLa-ácido láctico, HBU-ácido butírico, EtOH-etanol, AnTR-reator anaeróbico tubular, AnSTBR-reator anaeróbico de leito estruturado, AnPBR-reator anaeróbico de leito empacotado.

Foi observado um consumo acentuado de CHt na CA de todos os reatores, com os maiores valores observados no AnPBR (1904 ± 320 mg-DQO L⁻¹) e AnSTBR (1872 ± 333 mg-DQO L⁻¹) comparado ao AnTR (1181 ± 540 mg-DQO L⁻¹). Os comportamentos observados para conversão de substrato fresco nos reatores corroboram os achados apresentados por Fuess et al. (2021a). Entretanto, vale destacar que a distribuição de biomassa relatada por Fuess et al. (2021a) é notavelmente distinta da observada neste estudo, em particular para o AnSTBR, e pode estar associada às diferentes condições operacionais aplicadas, ou seja: uso de diferentes substratos (caldo de cana e melão), variação da concentração de substrato ($20-5$ g-DQO L⁻¹), relação C/N (152 quando utilizado melão como substrato), diferentes estratégias de alcalinização (dosagem de NaOH e/ou NaHCO₃), variações no TDH (24-6 h) e um maior período operacional (320 d) (FUESS; ZAIAT; NASCIMENTO, 2020). A produção de PMS na CA dos reatores demonstra ser resultado direto da conversão de substrato pelas vias de fermentação acética (Reação 1), butírica (Reação 2) e homolática (Reação 3), porém, com destacadas diferenças quantitativas. Maiores quantidades de HAc e HBU foram determinadas na CA do AnSTBR (Figura 8b; HAc = 348 ± 34 mg-DQO L⁻¹, HBU = 655 ± 179 mg-DQO L⁻¹) e AnPBR (Figura 8c; HAc = 380 ± 66 mg-DQO L⁻¹, HBU = 547 ± 130 mg-DQO L⁻¹) comparado ao AnTR (Figura 8a; HAc = 225 ± 43 mg-DQO L⁻¹, HBU = 455 ± 143 mg-DQO L⁻¹). No entanto, o AnPBR se destacou em termos de atividade láctica neste compartimento, demonstrando uma concentração de HLa (460 ± 176 mg-DQO L⁻¹) cerca de 2,9 e 2,6 vezes maior comparado ao AnTR (159 ± 77 mg-DQO L⁻¹) e AnSTBR (178 ± 30 mg-DQO L⁻¹), respectivamente.



Após a interface CA/C1, consideráveis reduções nas concentrações de CHt foram observadas no AnTR (985 ± 461 mg-DQO L⁻¹) e AnSTBR (755 ± 85 mg-DQO L⁻¹). Em ambos os casos, tais reduções estiveram associadas principalmente ao aumento da atividade butírica e láctica, dadas as concentrações de HBU e HLa determinadas no C1 do AnTR (HBU = 931 ± 29 mg-DQO L⁻¹, HLa = 577 ± 224 mg-DQO L⁻¹) e AnSTBR (HBU = 1023 ± 117 mg-DQO L⁻¹, HLa = 724 ± 60 mg-DQO L⁻¹). De C1 em diante, variações marginais na concentração de CHt foram determinadas no AnTR (3,2% na interface C1/C2 e

menor que 1% nos demais compartimentos) e AnSTBR (menor que 1% para todos os demais compartimentos), indicando uma baixa atividade celular nas regiões superiores da zona de leito. Além disso, é notável que a baixa variação nas concentrações de HAc e HBU após a interface CA/C1 do AnTR (Figura 8b) e AnSTBR (Figura 8d) demonstram que a atividade acética (Reação 1) e butírica (Reação 2) nos compartimentos da zona de leito foram marginais comparados à CA nestas configurações de reatores, o que demonstra que a biomassa retida na CA e no compartimento inicial da zona de leito (C1) do AnTR e AnSTBR desempenharam um papel primário no estabelecimento de vias metabólicas hidrogenogênicas, i.e., produtoras de bioH_2 .

No AnPBR, reduções de 5,5% e 4,1% na concentração de CHt foram observadas nas interfaces CA/C1 e C1/C2 (Figura 8f), respectivamente. De C2 em diante, a variação na concentração de CHt foi menor que 1% até a interface C4/Efluente, onde uma conversão de cerca de 2,7% ocorreu. Neste caso, a biomassa retida na FDC foi a responsável pela conversão da maior fração de substrato fresco e pelo estabelecimento das vias metabólicas primárias de produção de bioH_2 (Reações 1, 2 e 3). Além do padrão distinto relacionado à conversão de substrato fresco nos compartimentos iniciais da zona de leito (C1 e C2), as vias metabólicas estabelecidas na zona de leito do AnPBR foram distintas daquelas observadas no AnTR e AnSTBR. Analisando o perfil espacial do AnPBR (Figura 8c), um aumento progressivo nas concentrações de HLa associado com reduções nas concentrações de HAc ao longo da zona de leito foi observado. Dado que a produção de HAc ocorreu somente na CA do AnPBR e considerando a concentração determinada neste compartimento ($380 \pm 66 \text{ mg-DQO L}^{-1}$) e a concentração na corrente efluente ($197 \pm 29 \text{ mg-DQO L}^{-1}$), uma diminuição de cerca de $47,8 \pm 1,6\%$ da concentração de HAc ocorreu ao longo da zona de leito (obtida dos consumos de HAc considerando todos os perfis espaciais realizados ao longo período operacional). Usando a mesma abordagem, a concentração de HLa determinada no efluente do AnPBR ($924 \pm 237 \text{ mg-DQO L}^{-1}$) foi cerca de 2 vezes maior do que a concentração determinada na CA ($460 \pm 176 \text{ mg-DQO L}^{-1}$). Embora o aumento de HLa tenha ocorrido em conjunto com a redução de CHt nas interfaces CA/C1 e C1/C2, este padrão associado ao consumo de HAc nos compartimentos da zona de leito sugere fortemente o estabelecimento de uma fonte alternativa de atividade láctica nesta região do AnPBR, o que é destacado na interface C2/C3 onde este padrão foi observado associado a reduções marginais de CHt.

A fermentação láctica capnofílica (CLF, do inglês *capnophilic lactic fermentation*) consiste em uma fonte alternativa de atividade láctica capaz de reciclar frações de HAc em HLa quando concentrações adequadas de CO_2 dissolvido ocorrem no meio líquido sem prejudicar a

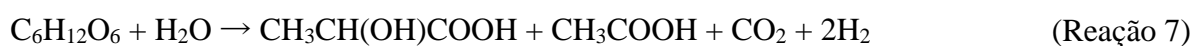
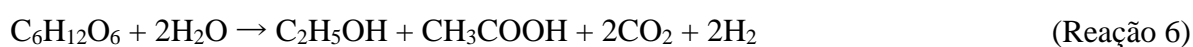
produção de bioH₂ (Reação 4). Neste caso, as bactérias pertencentes principalmente ao gênero *Thermotoga* desempenhar um papel metabólico fundamental em favor da redução do piruvato via acetil-CoA por meio da enzima piruvato-ferredoxina oxidoredutase sobre a descarboxilação oxidativa (DIPASQUALE; D'IPPOLITO; FONTANA, 2014; FUESS et al., 2021a; PRADHAN et al., 2016). A CLF foi relatada em sistemas fermentativos suplementados com NaHCO₃, particularmente em reatores do tipo AnSTBR alimentados com melaço (FUESS et al., 2021a; FUESS; ZAIAT; NASCIMENTO, 2020).

A disponibilidade de HAc a partir da fermentação acética (Reação 1) associada ao aumento da concentração de CO₂ dissolvido produzido a partir da fermentação direta de carboidratos e pela dissociação de NaHCO₃ desencadeada pela liberação aumentada de íons H⁺ na CA forneceu condições adequadas para a CLF nas regiões superiores (i.e., compartimentos da zona de leito) do AnPBR. O arranjo do meio suporte do AnPBR pode ter desempenhado um papel fundamental no estabelecimento da CLF devido ao maior “aprisionamento” do biogás rico em CO₂ na zona de leito em comparação com o AnSTBR e AnTR. Além disso, a retenção marginal de biomassa na zona de leito do AnSTBR e as diferentes condições e estratégias operacionais relatadas por Fuess et al. (2021a) em comparação aquelas utilizadas neste estudo são fatores que podem sustentar explicações para os diferentes padrões metabólicos observados. Em particular, a relação NaHCO₃/DQOt utilizada neste estudo correspondeu a 62,5 % (0,25 g-NaHCO₃ g⁻¹ DQOt) e 70% (0,28 g-NaHCO₃ g⁻¹ DQOt) da utilizada por Fuess et al. (2021a) (0,4 g-NaHCO₃ g⁻¹ DQOt), o que pode ter levado a diferentes níveis de disponibilidade de CO₂ dissolvido no meio líquido.



Os níveis marginais de HPr e EtOH determinados ao longo dos reatores podem ser resultado de caminhos metabólicos secundários, tais como a fermentação propiônica (Reação 5) (COUTO et al., 2020; GHIMIRE et al., 2015), do tipo etanol (Reação 6) (ANZOLA-ROJAS; ZAIAT; WEVER, 2016) e heterolática (Reação 7) (GARCÍA-DEPRAECT et al., 2019a), com as maiores concentrações determinadas na CA onde o maior consumo de substrato fresco ocorreu. Os menores níveis de HPr determinados corroboram os achados relatados por (FUESS; ZAIAT; NASCIMENTO, 2020), o qual a atividade propiônica foi aumentada sob condições de sobrecarga em um AnSTBR (COVa > 86 kg-DOQt m⁻³ d⁻¹). No entanto, vale destacar que os níveis de HPr determinados em todos os compartimentos do AnTR, o qual tinha a menor COVa

($16,85 \pm 0,63 \text{ kg-DOQt m}^{-3} \text{ d}^{-1}$), foram até 3,6 e 3 vezes maiores em comparação com o AnSTBR ($19,14 \pm 0,53 \text{ kg-DOQt m}^{-3} \text{ d}^{-1}$) e AnPBR ($33,20 \pm 0,99 \text{ kg-DOQt m}^{-3} \text{ d}^{-1}$), indicando um impacto metabólico negativo em termos de atividade hidrogenogênica relacionado à ausência de material suporte nessa configuração. Com relação às concentrações de EtOH, os resultados corroboram os achados relatados por (ANZOLA-ROJAS; ZAIAT; WEVER, 2016), os quais demonstraram que a fermentação do tipo etanol foi proporcional ao aumento progressivo de COV_a em um reator anaeróbio de leito-fixo estruturado de fluxo descendente.

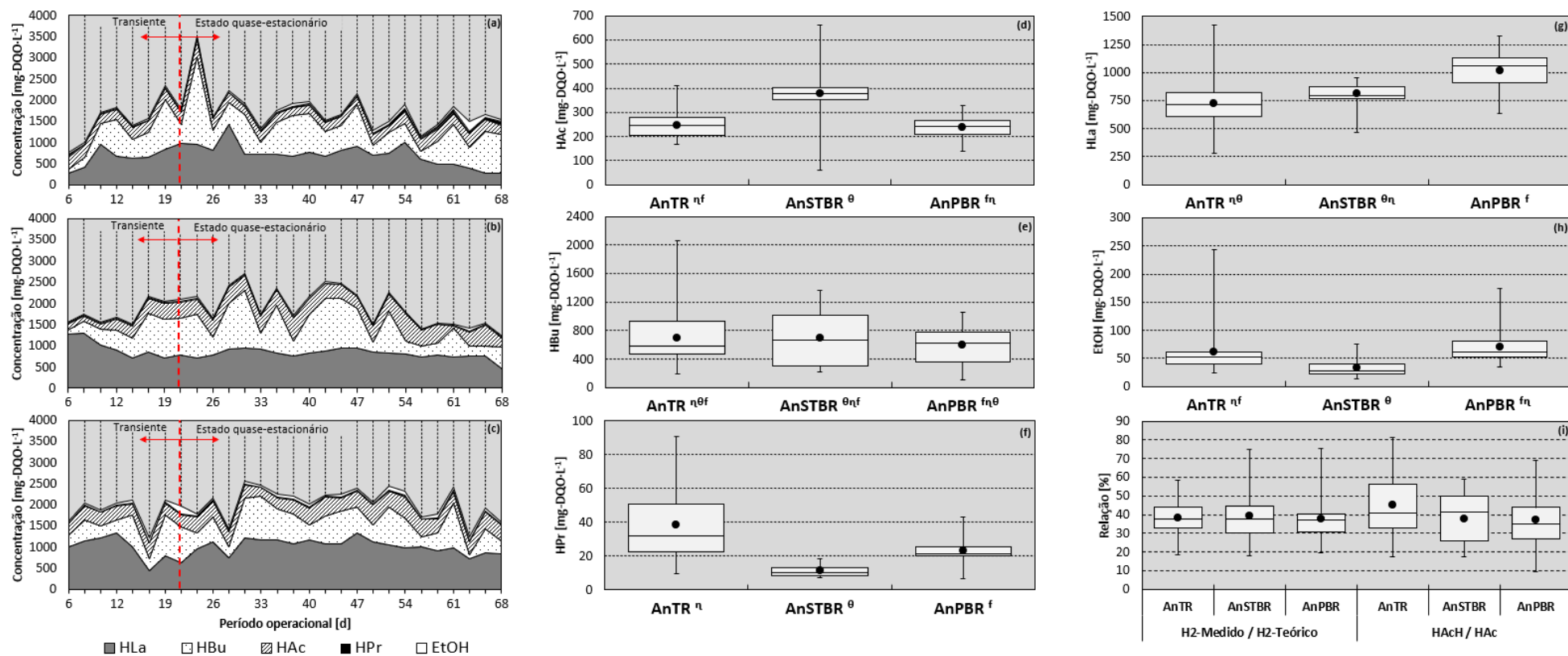


De modo geral, tais achados destacam o papel chave da biomassa retida na CA nos processos fermentativos primários, os quais podem ser direcionados dependendo dos arranjos do material suporte disposto acima desse compartimento. Em outras palavras, por mais que a CA dos reatores estejam em condições operacionais equivalentes, a disponibilidade de área superficial na zona de leito afeta a retenção de biomassa e direciona as rotas metabólicas neste compartimento. No entanto, não foram observadas correlações diretas entre uma maior disponibilidade de área superficial associada a níveis mais altos de retenção, o que sugere fortemente que o arranjo do material suporte impulsiona a dinâmica de retenção e lavagem de biomassa nos reatores de forma quali-quantitativa, provavelmente influenciando aspectos relacionados à formação de biofilme.

5.3 PERSPECTIVAS SOBRE AS ROTAS METABÓLICAS PREDOMINANTES

No geral, os perfis temporais de PMS (Figura 9a, b e c) permitiram avaliar se as rotas metabólicas estabelecidas nos reatores durante o período de operação corroboram os achados relacionados aos perfis espaciais, além de fornecer sustentação adicional para a avaliação de desempenho dos sistemas. Diferentes faixas de concentração de PMS relacionadas à produção ou consumo de bioH₂ foram observadas nos reatores, o que sustenta os resultados relacionados às avaliações de desempenho previamente apresentadas. Considerando o período de estado quase-estacionário, (dias 22-68), o maior nível médio de HAc (Figura 9d) foi observado no AnSTBR ($246,98 \pm 57,58 \text{ mg-DQO L}^{-1}$) e AnPBR ($239,59 \pm 47,77 \text{ mg-DQO L}^{-1}$).

Figura 9. Perfil temporal dos produtos metabólicos solúveis no (a) AnTR, (b) AnSTBR e (c) AnPBR e avaliação metabólica comparativa em termos de (d) ácido acético-HAc, (e) ácido butírico-HBu, (f) ácido propiônico-HPr, (g) ácido láctico-HLa, (h) etanol-EtOH e (i) homoacetogênese.



Notas: os índices ⁿ, ^θ e ^f representam o AnTR, o AnSTBR e o AnPBR, respectivamente. O reator que apresenta o índice dos demais indica que os valores médios da variável de resposta ou do parâmetro analisado apresentaram similaridade estatisticamente significativa. Os box-plots foram elaborados a partir dos dados referentes ao período de estado quase-estacionário (dias 22 a 68).

Abreviaturas: AnTR-reator anaeróbio tubular, AnSTBR-reator anaeróbio de leito estruturado, AnPBR-reator anaeróbio de leito empacotado, H₂-hidrogênio.

Por outro lado, o AnTR apresentou o maior nível médio de HPr ($38,69 \pm 22,24$ mg-DQO L⁻¹) comparado ao AnSTBR ($11,58 \pm 3,31$ mg-DQO L⁻¹) e AnPBR ($23,09 \pm 7,27$ mg-DQO L⁻¹) (Figura 9e). Níveis equivalentes de HBU (sem diferenças significativas) foram observados em todos os sistemas, i.e., $698,77 \pm 403,40$ mg-DQO L⁻¹ (AnTR), $690,34 \pm 393,48$ mg-DQO L⁻¹ (AnSTBR) e $599,88 \pm 271,24$ mg-DQO L⁻¹ (AnPBR) (Figura 9f).

Considerando que a produção de bioH₂ durante os processos fermentativos de substratos orgânicos por culturas mistas é tipicamente devida ao consumo de carboidratos via fermentação acética (Reação 1) e/ou butírica (Reação 2), bem como seu consumo é intrínseco à fermentação propiônica (Reação 6) (ANTONOPOULOU et al., 2008; CASTELLÓ et al., 2018; COUTO et al., 2020; GHIMIRE et al., 2015), esses achados corroboram o desempenho dos reatores em relação à produção de bioH₂. Em geral, os maiores níveis de HAc associados aos baixos níveis de HPr e a considerável atividade butírica no AnSTBR se destacam, assim como os níveis mais baixos de HAc associados aos maiores níveis de HPr no AnTR. Embora os níveis de HBU determinados nos reatores não apresentem diferenças estatisticamente significativas, os níveis ligeiramente mais baixos deste PMS no AnPBR indicam que a menor produção de bioH₂ dessa configuração em comparação ao AnSTBR foi provavelmente associada a esse padrão.

Além da fermentação propiônica, a atividade hidrogenogênica pode ser afetada pelo estabelecimento de rotas metabólicas tais como a homoacetogênese (Reação 8), a qual consiste na produção de HAc a partir do consumo autotrófico de H₂ e CO₂ (ANTONOPOULOU et al., 2008; SAADY, 2013). Embora esse processo possa ser responsável pelo consumo de mais de 40% do bioH₂ produzido em sistemas fermentativos, a homoacetogênese raramente é considerada (LUO et al., 2011). Estudos recentes demonstraram que o estabelecimento da homoacetogênese em sistemas fermentativos é independente da fonte e do tipo de pré-tratamento aplicado à fonte de inóculo e à configuração de reator, independentemente da faixa de temperatura (mesofílica, termofílica e hipertermofílica) (HAO; WANG, 2015; LUO et al., 2011; MONTIEL-CORONA; PALOMO-BRIONES; RAZO-FLORES, 2020; MONTROYA-ROSALES et al., 2019; SAADY, 2013).



A predominância da homoacetogênese (%Homo) em sistemas fermentativos tem sido relatada em diversos estudos por meio da avaliação da proporção entre HAc derivado da atividade homoacetogênica (HAcH) e o HAc total medido (Equação 9) (LUO et al., 2011; MENEZES; SILVA, 2019; MONTIEL-CORONA; PALOMO-BRIONES; RAZO-FLORES, 2020; MONTOYA-ROSALES et al., 2019). No entanto, essa abordagem pressupõe imperativamente que [i] todo HAc é produzido somente a partir da fermentação de carboidratos primários e da homoacetogênese, [ii] o bioH₂ é consumido somente pela fermentação propiônica e [iii] todo bioH₂ é derivado da produção de HAc e HBU, o que torna possível estimar o rendimento estequiométrico teórico de H₂ (bioH₂-teórico) e HAcH por meio das Equações 1-2 (ambas obtidas de balanços de massa para os ácidos orgânicos voláteis e bioH₂ produzidos) (AROOJ et al., 2008; LUO et al., 2011).

$$bioH_2 - teórico = 2 \times [HBU] + 2 \times [HAc] - [HPr] \quad (\text{Equação 7})$$

$$[HAcH] = \frac{2 \times [HBU] + 2 \times [HAc] - [HPr] - (bioH_2 - medido)}{6} \quad (\text{Equação 8})$$

$$\%Homo = [HAcH] \div [HAc] \quad (\text{Equação 9})$$

endo [HAc], [HBU] e [HPr] as taxas de produção molar (mmol d⁻¹) estimadas de ácido acético, ácido butírico e ácido propiônico, respectivamente.

Considerando que a estimativa da %Homo em sistemas fermentativos utiliza as concentrações efluentes de HAc, HBU e HPr e que os perfis espaciais do AnPBR demonstraram que em média 47,8±1,6% do HAc produzido na CA foi consumido ao longo da zona de leito via CLF, a qual consiste em uma rota metabólica que consome HAc sem afetar a produção de bioH₂, tal aproximação torna-se inadequada para esta configuração de reator devido ao não cumprimento das premissas necessárias. No entanto, a fração de HAc consumido demonstrou um baixo CV (3,4%), o que indica fortemente um padrão estável da CLF ao longo da zona de leito do AnPBR. Embora o tamanho da amostra dos perfis espaciais (n=4) seja menor em comparação com o monitoramento temporal dos reatores (considerando o período de estado quase-estacionário n=21, e todo o período operacional n=28), o estabelecimento da CLF ao longo da zona de leito do AnPBR foi observado em todos os perfis espaciais, os quais foram realizados de forma distribuída ao longo do período operacional. Portanto, considerando que todo o HAc no AnPBR foi produzido por meio da conversão direta de substrato fresco na CA e que seu consumo ocorreu somente ao longo da zona de leito via CLF, pode-se assumir que a

concentração recorrente de HAc na CA do AnPBR durante a operação (HAc_{CA}) é uma variável de processo que satisfaz as premissas necessárias para o uso da abordagem proposta por Arooj et al. (2008) (Equações 7, 8 e 9) e pode ser obtida pela Equação 10 para substituir a variável $[HAc]$ nas Equações 1, 2 e 3. No caso do AnTR e AnSTBR, as concentrações de HAc determinadas na corrente efluente naturalmente satisfazem as premissas necessárias para a estimativa da %Homo.

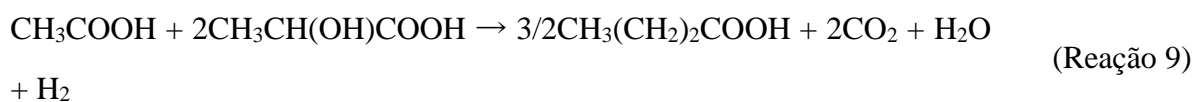
$$HAc_{CA} = [HAc] \times \frac{\sum_{i=0}^n \left(\frac{[HAc_{CA}(medida)]_i - [HAc_{Ef}]_i}{[HAc_{CA}(medida)]_i} \right)}{n} \quad (\text{Equação 10})$$

sendo $[HAc]$ a taxa de produção molar de ácido acético (mmol d^{-1}), $[HAc_{CA}(medida)]_i$ é a concentração de ácido acético determinada na CA em cada perfil, $[HAc_{Ef}]_i$ é a concentração de ácido acético determinada na corrente efluente de cada perfil, e n é o número total de perfis espaciais realizados durante o período operacional.

Sob esta aproximação, foi possível determinar a razão de bioH_2 -medido/ bioH_2 -teórica (Figura 9i) para o AnTR ($37,44 \pm 9,25\%$), AnSTBR ($39,32 \pm 13,11\%$) e AnPBR ($37,49 \pm 11,16\%$), os quais não foram significativamente diferentes entre si. Mesmo assim, a %Homo estimada nos reatores (Figura 9i) indica uma maior predominância desta rota metabólica no AnTR ($44,87 \pm 16,97\%$) comparado ao AnSTBR ($37,62 \pm 13,42\%$) e AnPBR ($36,94 \pm 14,02\%$), respectivamente. A maior %Homo estimada para o AnTR corrobora a menor produção de bioH_2 observada nesta configuração, bem como sustenta os impactos adversos da ausência de leito-fixado em reatores hidrogenogênicos termofílicos.

Por mais que o maior nível médio de HLa tenha sido determinado no AnPBR ($1011,40 \pm 176,97 \text{ mg-DQO L}^{-1}$), o qual é significativamente diferente dos níveis médios no AnSTBR ($809,38 \pm 108,42 \text{ mg-DQO L}^{-1}$) e AnTR ($723,27 \pm 265,31 \text{ mg-DQO L}^{-1}$), este PMS foi o mais predominante em todas as configurações de reatores (Figura 9g). A fonte de atividade láctica observada nos reatores pode ser atribuída à fonte de inóculo. A ocorrência de bactérias ácido-lácticas (LAB, do inglês *Lactic Acid Bacteria*) em vinhaça de cana-de-açúcar tem sido relatada em estudos que utilizaram o mesmo protocolo de inoculação aqui adotado (FUESS et al., 2018; VILELA et al., 2019). De acordo com García-Depraect et al. (2021), as evidências atualmente disponíveis indicam que as LAB podem desempenhar um papel de destaque em sistemas fermentativos, o que está além dos mecanismos comumente atribuídos a esse grupo microbiano e correlacionados com a produção prejudicada de bioH_2 , p. ex., competição por

substrato, excreção de compostos antimicrobianos e diminuição acentuada de pH. Diversos estudos atribuem um importante papel para as LAB durante a produção de bioH₂, a qual demonstra ser impulsionado por interações entre LAB e bactérias produtoras de hidrogênio (HPB, do inglês *Hydrogen-Producing Bacteria*) e fortemente influenciada pelas condições ambientais, especialmente em faixas de pH entre 5,0 e 6,0 (FUESS et al., 2018; GARCÍA-DEPRAECT et al., 2019b, 2019a). A relação entre LAB e HPB baseia-se na hipótese da ocorrência de um mecanismo de alimentação cruzada entre lactato, como o que ocorre na microbiota gastrointestinal humana, em que HLa, o principal produto liberado pelas LAB, e HAc são utilizados como substratos pelas HPB e convertidos em H₂, bioH₂ e CO₂ (Reação 9) (GARCÍA-DEPRAECT et al., 2021).



Embora alguns estudos apontem que a produção de bioH₂ impulsionada pelo lactato (Reação 9) é acionada em condições limitadas de disponibilidade de carboidratos (FUESS et al., 2018; GARCÍA-DEPRAECT et al., 2020), outras evidências sugerem que a razão entre disponibilidade de substrato e concentração de biomassa não apresentam uma correlação direta, mas depende do efeito combinado entre tais características (GARCÍA-DEPRAECT et al., 2021). Neste contexto, García-Depraect et al. (2021) destaca que o estabelecimento de um balanço entre a conversão direta de carboidratos em HLa e HAc pelas LAB associada com seus consumos pelas HPB é uma estratégia para utilizar efetivamente substratos ricos em carboidratos para a produção de bioH₂. Por exemplo, esta rota metabólica tem sido relatada em diversos sistemas fermentativos (BLANCO; OLIVEIRA; ZAIAT, 2019b; FUESS et al., 2018; FUESS; ZAIAT; DO NASCIMENTO, 2019), e em alguns casos é destacada como uma rota complementar ao consumo direto de carboidratos por meio da fermentação acética e butírica (FUESS et al., 2021b, 2021a). Considerando as faixas de pH, as produções de bioH₂ e os altos níveis de HLa determinados, o estabelecimento deste tipo de interação entre LAB e HPB nos reatores torna-se fortemente evidente, independente das particularidades observadas.

Considerando os baixos níveis de EtOH determinados ao longo do período operacional (Figura 9a, b, c e h), os quais foram cerca de 2 vezes maiores no AnTR (61,68±43,88 mg-DQO L⁻¹) e AnPBR (70,68±31,25 mg-DQO L⁻¹) comparado ao AnSTBR (32,15±15,49 mg-DQO L⁻¹), o estabelecimento da fermentação tipo etanol (Reação 6) e heterolática (Reação 7) como rotas secundárias e menos expressivas no papel da produção de

bioH₂ dos reatores são fortalecidas. Estas rotas metabólicas foram relatadas em outros trabalhos (ANZOLA-ROJAS; ZAIAT; WEVER, 2016; FUESS et al., 2021a; LORQUET et al., 2004). É importante notar que as menores concentrações de EtOH determinadas no AnSTBR, em associação com as concentrações intermediárias e mais altas de HLa e HAc, respectivamente, sugere fortemente que essa configuração foi capaz de fornecer condições favoráveis para o estabelecimento da fermentação acética como principal fonte de HAc, o que sustenta sua maior produção de bioH₂. Por outro lado, as frações de HAc determinadas no AnTR e AnPBR provavelmente resultam de rotas como a fermentação tipo etanol (Reação 6) e heterolática (Reação 7), as quais ambas fornecem metade do HY em comparação à fermentação acética (Reação 1).

Outras funções das LAB nos processos fermentativos devem ser enfatizadas, pois é possível encontrar relatórios sobre a degradação de HLa em condições anaeróbias ou anóxicas (LINDGREN; AXELSSON; MCFEETERS, 1990; LORQUET et al., 2004; OUDE ELFERINK et al., 2001). No geral, estes relatos demonstram a habilidade de certos grupos de LAB de degradar HLa em HAc a outros subprodutos sem necessariamente afetar a produção de bioH₂, dada a habilidade destes microrganismos em usar outros compostos como o ácido cítrico ou oxigênio como aceptores de elétrons ao invés do NAD⁺. Devido ao protocolo de preparo e armazenamento da água residuária sintética utilizada, os quais são fatores capazes de prover frações de oxigênio dissolvido, bem como as determinações de traços de ácido cítrico em todos os reatores ao longo do período operacional (dados não apresentados), estas rotas metabólicas também podem ser especuladas como contribuintes secundárias para a diferença entre o bioH₂-medido e o bioH₂-teórico devido a produção de HAc sem a concomitante produção de bioH₂.

Por fim, a confiabilidade dos dados pode ser verificada por meio dos balanços de massa da fase solúvel e balanços de massa globais, os quais apresentaram valores médios acima de 95% e são apresentados na Tabela 8 e ilustrados na Figura AC1 (Apêndice C).

Tabela 8. Balanços de massa: balanço de massa da fase solúvel (BMFS) e balanço de massa global (BMG).

| Reator | Balanço de massa | Discriminação da DQO [%] | | | | | |
|--------|------------------|--------------------------|------------------|----------|-------------------|---------|----------------------------------|
| | | CHt | PMS ^a | DQOs ef | bioH ₂ | SSV | Fração discriminada ^b |
| AnTR | BMFS | 65,8±10,5 | 36,8±10,5 | - | - | - | 102,6±10,7 |
| | BMG ^c | - | - | 93,7±2,5 | 2,1±0,5 | 2,4±0,4 | 98,3±2,5 |
| | BMG ^d | - | - | 96,1±9,9 | | | 100,6±10 |
| AnSTBR | BMFS | 56,1±11,5 | 41,2±8,7 | - | - | - | 97,3±12 |
| | BMG ^c | - | - | 93,4±2,4 | 2,5±0,9 | 2,9±0,5 | 98,8±2,6 |
| | BMG ^d | - | - | 91±12 | | | 96,6±12 |
| AnPBR | BMFS | 56,4±8,9 | 40,9±7,8 | - | - | - | 97,3±8,6 |
| | BMG ^c | - | - | 93,7±2,6 | 2,0±0,6 | 2,6±0,4 | 98,3±2,5 |
| | BMG ^d | - | - | 91,2±8,8 | | | 95,8±8,4 |

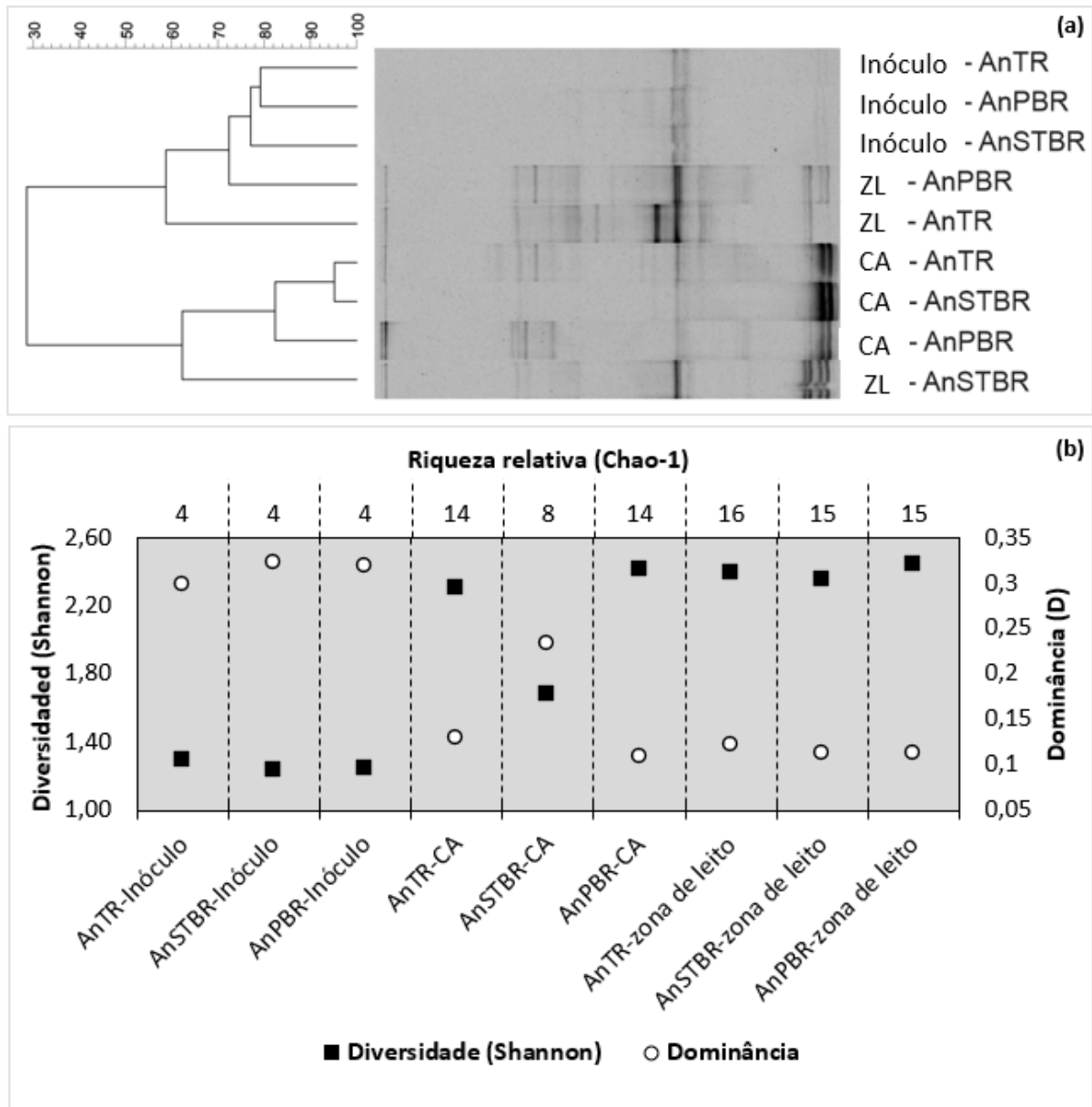
Notas: ^aDQO equivalente de HAc, HPr, HLa, HBU e EtOH; ^bDQO equivalente de CHt e PMS para o BMFS, e DQOs, bioH₂ e SSV para o BMG; ^cBMG a partir da DQOs efluente medida; ^dBMG a partir da DQOs estimada a partir do somatório dos PMS medidos em equivalentes de DQO.

Abreviaturas: AnTR-reator anaeróbico tubular, AnSTBR-reator anaeróbico de leito estruturado, AnPBR-reator anaeróbico de leito empacotado, bioH₂-biohidrogênio, DQO-demanda química de oxigênio, DQOs ef-demanda química de oxigênio solúvel medida na corrente efluente dos reatores, SSV-sólidos suspensos voláteis.

5.4 ENSAIOS COMPARATIVOS DE BIOLOGIA MOLECULAR: PCR/DGGE

O dendrograma dos coeficientes de similaridade calculado a partir dos perfis de bandas do DGGE para o Domínio *Bacteria* pela correlação de Pearson é ilustrado na Figura 10a. Em geral, as amostras de biomassa dos inóculos, das câmaras de alimentação e das zonas de leitos dos reatores demonstraram uma divisão em dois *clusters* principais, os quais são compostos pelas (i) amostras de biomassa dos inóculos de cada reator e as amostras de biomassa retidas na zona de leito do AnTR e AnPBR, e as (ii) amostras de biomassa retidas nas câmaras de alimentação dos reatores e na zona de leito do AnSTBR. Considerando que a etapa fermentação natural da vinhaça de cana-de-açúcar ocorreu no mesmo reservatório e que somente na etapa de recirculação foi realizada a segregação da fonte de microrganismos, os níveis de similaridade de cerca de 76 e 80% das fontes de inóculo demonstram que, mesmo após um curto período da etapa de recirculação (i.e., 5 dias) sob condições equivalentes de TDH (12 h), uma diferença considerável entre as amostras de biomassa coletadas no final da etapa de recirculação é resultado da ausência (AnTR) e da presença de diferentes arranjos de material suporte (AnSTBR e AnPBR).

Figura 10. Ensaios comparativos de biologia molecular: (a) Dendrograma calculado a partir dos perfis de banda do DGGE para o Domínio *Bacteria* (correlação de Pearson) e (b) índices de dominância (D), diversidade de Shannon (H') e riqueza relativa (Chao-1).



Abreviaturas: AnTR-reator anaeróbico tubular, AnSTBR-reator anaeróbico de leito-fixado estruturado, AnPBR-reator anaeróbico de leito-fixado empacotado, CA-câmara de alimentação, ZL-zona de leito.

Independentemente das amostras de biomassa retidas na CA dos reatores, uma similaridade de cerca de 96% entre o AnTR e AnSTBR foi observada. Por outro lado, o AnPBR demonstrou uma similaridade de 82% com relação ao AnTR e AnSTBR. A menor similaridade entre as amostras de biomassa coletadas na CA do AnTR e do AnSTBR em relação à amostra da CA do AnPBR pode ser um dos fatores que sustentam a menor quantidade de biomassa retida associada a uma maior capacidade de conversão de substrato específico (COVRe) do reator de leito-fixado empacotado (além de uma maior atividade láctica). Com exceção da amostra

de biomassa retida na zona de leito do AnSTBR, que apresentou similaridade de 64% com todas as amostras de biomassa retidas na CA dos reatores, as amostras de biomassa retidas na zona de leito do AnTR e do AnPBR apresentaram similaridade inferior a 30% em comparação com todas as amostras de biomassa retidas nas CA, demonstrando que não há correlação clara com a porosidade do reator (ou seja, disponibilidade de área superficial, e nem mesmo com os diferentes arranjos de leito versus a não disponibilização de leito).

Em geral, os índices de dominância (D) e de diversidade de Shannon (H'), bem como os índices de riqueza relativa (Chao-1) (Figura 10b) destacam a ocorrência de mudanças dinâmicas na estrutura das comunidades microbianas analisadas. Independentemente da configuração do reator, todas as amostras de biomassa coletadas após a etapa de recirculação do protocolo de inoculação apresentaram baixa diversidade relativa (em média $H' = 1,258$) e, conseqüentemente, alta dominância relativa ($D = 0,313$). Por outro lado, mudanças nesses parâmetros foram observadas para as amostras de biomassa coletadas ao final do período operacional dos reatores, especialmente para as amostras das CA. Além da menor similaridade entre a biomassa retida na CA do AnPBR em relação ao AnTR e AnSTBR, o primeiro apresentou maior índice de diversidade de Shannon ($H' = 2,409$), bem como maior riqueza relativa (Chao-1 = 14).

De acordo com Benomar et al. (2015), comunidades microbianas com maior diversidade podem apresentar melhores desempenhos em termos de produção de bioH_2 devido ao estabelecimento de relações sintróficas que envolvem interações célula-célula, como p.ex. a troca de PMS. No entanto, vale destacar que apesar de apresentar menor índice de diversidade de Shannon ($H' = 1,677$) e a menor riqueza relativa (Chao-1 = 8), o AnSTBR apresentou o melhor desempenho de produção de bioH_2 . Embora o AnTR tenha apresentado maior diversidade ($H' = 2,298$) em relação ao AnSTBR e riqueza relativa (Chao-1 = 14) equivalente ao AnPBR, esta configuração apresentou o pior desempenho em termos de produção de bioH_2 e conversão de substrato. Em relação às amostras de biomassa retidas na zona de leito dos reatores, as quais apresentaram aspectos quantitativos marginais associados a baixas conversões de substrato, todas apresentaram níveis equivalentes para os índices de dominância e diversidade de Shannon e riqueza relativa, com destaque para o AnSTBR que apresentou uma riqueza relativa 2 vezes maior para a biomassa retida neste compartimento comparado à biomassa retida na CA.

Por fim, além das diferentes distribuições quantitativas de biomassa apresentadas na Seção 5.2, os achados apresentados indicam o estabelecimento de uma estratificação qualitativa de biomassa nos reatores, independente da ausência ou presença de diferentes arranjos de leito.

Esta tendência corrobora os relatos apresentados por outros trabalhos (FUESS et al., 2021b, 2021a) e provavelmente esta relacionada às diferentes condições ambientais estabelecidas entre os compartimentos da zona de leito e CA (tais como disponibilidade de substrato fresco e perfis de PMS) e, neste caso particular, às diferentes áreas superficiais disponíveis para o crescimento microbiano aderido.

6 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em termos gerais, os resultados obtidos ao longo do presente trabalho permitiram confirmar a hipótese central de pesquisa formulada, a qual postulou que **“tanto a ausência quanto diferentes arranjos de leito fixo são fatores capazes de alterar a dinâmica de retenção de biomassa, as rotas metabólicas, os rendimentos e a produção de hidrogênio, além de selecionar diferentes comunidades microbianas em reatores acidogênicos, ainda que as condições operacionais na câmara de alimentação sejam mantidas semelhantes entre si”**, tendo em vista os aspectos relacionados à dinâmica de retenção de biomassa em termos quali-quantitativos, à conversão de substrato fresco, à geração de produtos metabólicos solúveis e à produção de bioH_2 nas condições experimentais adotadas.

De forma paralela à conclusão associada a hipótese central de pesquisa, os resultados apresentados permitiram acessar os seguintes aspectos:

- i. Diferentemente do esperado a partir das informações contidas na literatura, a configuração AnPBR reteve uma menor quantidade de biomassa quando comparada com as configurações AnTR (ausência de leito fixo) e AnSTBR (presença de leito fixo com elevada porosidade, i.e., 89%). Contudo, fatores meramente quantitativos relacionados as biomassas retidas nas diferentes configurações de reatores abordadas no presente trabalho não foram capazes de sustentar a argumentação relacionada às capacidades de conversão de substrato e níveis de produtividade de bioH_2 . A configuração AnPBR reteve cerca da metade da quantidade de biomassa retida no AnSTBR e AnTR, e apresentou uma EC_{CH} média similar ao AnSTBR, enquanto o AnTR apresentou uma EC_{CH} média cerca de 10% inferior as demais configurações.
- ii. A partir dos perfis espaciais de CHt foi demonstrado que as reduções majoritárias das concentrações de substrato fresco decorrem da atividade microbiana nas CA dos reatores. Apesar das quantidades marginais de biomassa retidas na zona de leito, os perfis espaciais de PMS demonstram o estabelecimento de uma fonte alternativa de ácido lático na zona de leito do AnPBR, enquanto uma atividade metabólica inexpressiva foi identificada no AnTR e AnSTBR.
- iii. Mesmo com condições operacionais semelhantes na CA e condições globais similares entre o AnTR e o AnSTBR, foram verificados desempenhos distintos em termos de EC_{CH} , produtividade de hidrogênio e perfis metabólicos, o que sugere que o fator fundamental responsável pelas diferenças pode ser relacionado a ausência de leito fixo no AnTR. O perfil metabólico observado no AnPBR é relativamente semelhante ao observado no AnTR, apesar

das diferenças entre as condições operacionais dos sistemas. Contudo, diferentes caminhos metabólicos foram verificados para essas configurações reacionais, o que reforça o papel fundamental do tipo ou ausência de leito fixo nos processos biológicos que ocorreram nas diferentes configurações de reatores.

iv. Os resultados das análises físico-químicas associados aos resultados de biologia molecular (PCR/DGGE) exibem uma estratificação de biomassa entre as biomassas retidas na CA e na zona de leito dos reatores. Maiores similaridades foram observadas entre as biomassas retidas na CA dos reatores, enquanto as biomassas retidas nas zonas de leito foram mais semelhantes aos inóculos, bem como apresentaram baixas similaridades quando comparadas.

Os aspectos supracitados trazem à tona novas percepções sobre a dinâmica de retenção de biomassa em reatores anaeróbios de leito-fixo operados sob condições acidogênicas para produção de bioH_2 , tendo em vista que a compreensão de fatores específicos relacionados a expressão gênica e às condições ambientais recorrentes no meio reacional de diferentes configurações de reatores demonstram ser fundamentais para a compreensão e desenvolvimento dessas tecnologias.

7 RECOMENDAÇÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A seguir são apresentadas algumas recomendações e sugestões para futuros trabalhos de pesquisa sobre a compreensão dos impactos de diferentes arranjos de leito fixo sobre a dinâmica de retenção de biomassa e da produção de bioH₂ em reatores anaeróbios acidogênicos.

- i. **Avaliação dos impactos da ausência e de diferentes arranjos de leito fixo em condição de alta carga orgânica volumétrica aplicada:** tendo em vista os indícios de que as velocidades superficiais aplicadas em reatores anaeróbios acidogênicos podem ser um fator relevante na dinâmica de retenção de biomassa e nos processos de produção de bioH₂, configura-se a necessidade de avaliação do mesmo protocolo experimental empregado na presente pesquisa com apenas a alteração da COVa para valores mais elevados.
- ii. **Estudos que abordem a aplicação do mesmo TDH global associado às mesmas condições de COVa a partir de alterações na composição da água residuária sintética:** em conjunto ao estudo proposto no item [i], a realização de um protocolo experimental que permita avaliar a influência do TDH frente a fixação das mesmas condições de COVa pode trazer novas percepções sobre como parâmetros como TDH e velocidades superficiais aplicadas podem impactar nos processos de retenção de biomassa e produção de bioH₂ em reatores anaeróbios acidogênicos de leito fixo.
- iii. **Estudos mais robustos com relação às técnicas de biologia molecular e parâmetros relacionados à dinâmica de retenção de biomassa:** o emprego de protocolos experimentais que contemplem técnicas mais robustas de biologia molecular (metagenômica baseada no sequenciamento do gene 16s, metabolômica e transcriptômica) e a avaliação de parâmetros como EPS podem trazer novas percepções sobre os impactos da ausência e de diferentes arranjos de leito sobre a dinâmica de retenção de biomassa e a produção de bioH₂ em reatores anaeróbios acidogênicos.

REFERÊNCIAS

ADORNO, M. A. T.; HIRASAWA, J. S.; VARESCHE, M. B. A. Development and Validation of Two Methods to Quantify Volatile Acids (C2-C6) by GC / FID : Headspace (Automatic and Manual) and Liquid-Liquid Extraction (LLE). **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 5, p. 406–414, 2014.

AGLER, M. T. et al. Waste to bioproduct conversion with undefined mixed cultures: The carboxylate platform. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 70–78, 2011.

ALBUQUERQUE, M. G. E. et al. Mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHA) production from volatile fatty acid (VFA)-rich streams: Effect of substrate composition and feeding regime on PHA productivity, composition and properties. **Journal of Biotechnology**, v. 151, n. 1, p. 66–76, jan. 2011.

AL-HALBOUNI, D. et al. Correlation of EPS content in activated sludge at different sludge retention times with membrane fouling phenomena. **Water Research**, v. 42, n. 6–7, p. 1475–1488, 2008.

ANGELIDAKI, I.; ELLEGAARD, L.; AHRING, B. K. Applications of the Anaerobic Digestion Process BT - Biomethanation II. Em: AHRING, B. K. et al. (Eds.). **Applications of the Anaerobic Digestion Process**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2003. p. 1–33.

ANTONOPOULOU, G. et al. Biofuels generation from sweet sorghum: Fermentative hydrogen production and anaerobic digestion of the remaining biomass. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 1, p. 110–119, 2008.

ANZOLA-ROJAS, M. D. P. et al. The use of the carbon/nitrogen ratio and specific organic loading rate as tools for improving biohydrogen production in fixed-bed reactors. **Biotechnology Reports**, v. 5, n. 1, p. 46–54, 2015.

ANZOLA-ROJAS, M. DEL P.; ZAIAT, M. A novel anaerobic down-flow structured-bed reactor for long-term stable H₂ energy production from wastewater. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 91, n. 5, p. 1551–1561, maio 2016.

ANZOLA-ROJAS, M. DEL P.; ZAIAT, M.; WEVER, H. DE. Improvement of hydrogen production via ethanol-type fermentation in an anaerobic down-flow structured bed reactor. **Bioresource Technology**, v. 202, p. 42–49, 2016.

APHA; AWWA; WEF. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 23. ed. Washington DC: APHA, 2017.

AQUINO, S. DE; FUESS, L. T.; PIRES, E. C. Media arrangement impacts cell growth in anaerobic fixed-bed reactors treating sugarcane vinasse: Structured vs. randomic biomass immobilization. **Bioresource Technology**, v. 235, p. 219–228, jul. 2017.

ARAUJO JUNIOR, M. M. DE et al. EVALUATION OF AN INNOVATIVE ANAEROBIC BIOREACTOR WITH FIXED-STRUCTURED BED (ABFSB) FOR BREWERY WASTEWATER TREATMENT. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 33, n. 04, p. 733–741, 2016.

AROOJ, M. F. et al. Continuous biohydrogen production in a CSTR using starch as a substrate. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 13, p. 3289–3294, 2008.

ASLAM, M. et al. Membrane bioreactors for wastewater treatment: A review of mechanical cleaning by scouring agents to control membrane fouling. **Chemical Engineering Journal**, v. 307, p. 897–913, 2017.

BABU, V. L.; MOHAN, S. V.; SARMA, P. N. Influence of reactor configuration on fermentative hydrogen production during wastewater treatment. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 8, p. 3305–3312, 2009.

BALAT, M. Potential importance of hydrogen as a future solution to environmental and transportation problems. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 15, p. 4013–4029, 2008.

BANU, J. R. et al. Recent advances on biogranules formation in dark hydrogen fermentation system: Mechanism of formation and microbial characteristics. **Bioresource Technology**, v. 268, n. July, p. 787–796, 2018.

BARCA, C. et al. Anaerobic biofilm reactors for dark fermentative hydrogen production from wastewater: A review. **Bioresource Technology**, v. 185, p. 386–398, 2015.

BARROS, A. R. et al. Biohydrogen production in anaerobic fluidized bed reactors: Effect of support material and hydraulic retention time. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, n. 8, p. 3379–3388, 2010.

BATISTA, A. P. et al. Combining urban wastewater treatment with biohydrogen production - An integrated microalgae-based approach. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 230–235, 2015.

BENOMAR, S. et al. Nutritional stress induces exchange of cell material and energetic coupling between bacterial species. **Nature Communications**, v. 6, 2015.

BLANCO, V. M. C.; FUESS, L. T.; ZAIAT, M. Calcium dosing for the simultaneous control of biomass retention and the enhancement of fermentative biohydrogen production in

an innovative fixed-film bioreactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 17, p. 12181–12196, 2017.

BLANCO, V. M. C.; OLIVEIRA, G. H. D.; ZAIAT, M. Dark fermentative biohydrogen production from synthetic cheese whey in an anaerobic structured-bed reactor: Performance evaluation and kinetic modeling. **Renewable Energy**, 2019a.

BLANCO, V. M. C.; OLIVEIRA, G. H. D.; ZAIAT, M. Dark fermentative biohydrogen production from synthetic cheese whey in an anaerobic structured-bed reactor: Performance evaluation and kinetic modeling. **Renewable Energy**, v. 139, p. 1310–1319, 2019b.

BOBOESCU, I. Z. et al. Surpassing the current limitations of biohydrogen production systems: The case for a novel hybrid approach. **Bioresource Technology**, v. 204, p. 192–201, 2016.

BRAGA, A. F. M. **Produção de hidrogênio em reatores anaeróbios termofílicos**. [s.l.] USP, 2014.

CAMILOTI, P. R. et al. Innovative anaerobic bioreactor with fixed-structured bed (ABFSB) for simultaneous sulfate reduction and organic matter removal. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 89, n. 7, p. 1044–1050, 2014.

CARNEIRO, R. B. et al. Feasibility of anaerobic packed and structured-bed reactors for sulfamethoxazole and ciprofloxacin removal from domestic sewage. **Science of the Total Environment**, v. 678, p. 419–429, 2019.

CARNEIRO, R. B. et al. Acidogenesis is a key step in the anaerobic biotransformation of organic micropollutants. **Journal of Hazardous Materials**, v. 389, n. December 2019, p. 121888, 2020a.

CARNEIRO, R. B. et al. Influence of organic loading rate on ciprofloxacin and sulfamethoxazole biodegradation in anaerobic fixed bed biofilm reactors. **Journal of Environmental Management**, v. 273, n. August, 2020b.

CASTELLÓ, E. et al. Possible causes for the instability in the H₂ production from cheese whey in a CSTR. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 43, n. 5, p. 2654–2665, 2018.

CAVALCANTE, W. A. et al. Upgrading sugarcane biorefineries: Acetate addition allows for conversion of fermented sugarcane molasses into high-value medium chain carboxylic acids. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 8, n. 2, p. 103649, 2020.

CHAGANTI, S. R.; KIM, D. H.; LALMAN, J. A. Flux balance analysis of mixed anaerobic microbial communities: Effects of linoleic acid (LA) and pH on biohydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 21, p. 14141–14152, 2011.

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

CHANG, J. S.; LEE, K. S.; LIN, P. J. Biohydrogen production with fixed-bed bioreactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 27, n. 11–12, p. 1167–1174, 2002.

CHERUBINI, F. The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. **Energy Conversion and Management**, v. 51, n. 7, p. 1412–1421, 2010.

CHERUBINI, F.; ULGIATI, S. Crop residues as raw materials for biorefinery systems - A LCA case study. **Applied Energy**, v. 87, n. 1, p. 47–57, 2010.

CORBARI, S. D. M. L. et al. Strategies to improve the biohydrogen production from cassava wastewater in fixed-bed reactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, n. 32, p. 17214–17223, 2019.

COUTO, P. T. et al. Modelling sugarcane vinasse processing in an acidogenic reactor to produce hydrogen with an ADM1-based model. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 45, n. 11, p. 6217–6230, 28 fev. 2020.

CUNHA, M. P. et al. Sulfidogenesis establishment under increasing metal and nutrient concentrations: An effective approach for biotreating sulfate-rich wastewaters using an innovative structured-bed reactor (AnSTBR). **Bioresource Technology Reports**, v. 11, n. April, p. 100458, 2020.

DAS, D. Advances in biohydrogen production processes: An approach towards commercialization. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 17, p. 7349–7357, 2009.

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

DAS, D.; VEZIROĞLU, T. N. Advances in biological hydrogen production processes. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 21, p. 6046–6057, 2008.

DE GIOANNIS, G. et al. Biohydrogen production from dark fermentation of cheese whey: Influence of pH. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 36, p. 20930–20941, 2014.

DE OLIVEIRA, G. H. D. et al. Effects of the Organic Loading Rate on Polyhydroxyalkanoate Production from Sugarcane Stillage by Mixed Microbial Cultures. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 189, n. 4, p. 1039–1055, 4 dez. 2019.

DERELI, R. K. et al. Potentials of anaerobic membrane bioreactors to overcome treatment limitations induced by industrial wastewaters. **Bioresource Technology**, v. 122, p. 160–170, 2012.

DHAR, B. R. et al. Hydrogen production from sugar beet juice using an integrated biohydrogen process of dark fermentation and microbial electrolysis cell. **Bioresource Technology**, v. 198, p. 223–230, 2015.

DIAS, J. M. L. et al. Recent Advances in Polyhydroxyalkanoate Production by Mixed Aerobic Cultures: From the Substrate to the Final Product. **Macromolecular Bioscience**, v. 6, n. 11, p. 885–906, 9 nov. 2006.

DIPASQUALE, L.; D'IPPOLITO, G.; FONTANA, A. Capnophilic lactic fermentation and hydrogen synthesis by *Thermotoga neapolitana*: An unexpected deviation from the dark fermentation model. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 10, p. 4857–4862, 2014.

EDWARDS, P. P. et al. Hydrogen and fuel cells: Towards a sustainable energy future. **Energy Policy**, v. 36, n. 12, p. 4356–4362, dez. 2008.

ENERGY INFORMATION ADMINISTRATION (U.S. EIA). **International Energy Outlook 2013 - DOE/EIA-0484(2013)Outlook 2013**. [s.l: s.n.].

ENG SÁNCHEZ, F. et al. Value-added soluble metabolite production from sugarcane vinasse within the carboxylate platform: An application of the anaerobic biorefinery beyond biogas production. **Fuel**, v. 286, p. 119378, fev. 2021.

FALKNER, R. Global environmental politics and energy: Mapping the research agenda. **Energy Research and Social Science**, v. 1, p. 188–197, 2014.

FANG, H. H. P.; LIU, H.; ZHANG, T. Characterization of a hydrogen-producing granular sludge. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 78, n. 1, p. 44–52, 2002.

FAVA, F. et al. Biowaste biorefinery in Europe: opportunities and research & development needs. **New Biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 100–108, 2013.

FERNANDES, B. S. et al. The effect of biomass immobilization support material and bed porosity on hydrogen production in an upflow anaerobic packed-bed bioreactor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 170, n. 6, p. 1348–1366, 2013.

FERRAZ JÚNIOR, A. D. N. et al. Impact of organic loading rate on biohydrogen production in an up-flow anaerobic packed bed reactor (UAnPBR). **Bioresource Technology**, v. 164, n. 91, p. 967–976, 2014.

FERRAZ JÚNIOR, A. D. N.; ETCHEBEHERE, C.; ZAIAT, M. High organic loading rate on thermophilic hydrogen production and metagenomic study at an anaerobic packed-bed

reactor treating a residual liquid stream of a Brazilian biorefinery. **Bioresource Technology**, v. 186, p. 81–88, 2015.

FERREIRA, T. B. et al. Selection of metabolic pathways for continuous hydrogen production under thermophilic and mesophilic temperature conditions in anaerobic fluidized bed reactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 43, n. 41, p. 18908–18917, 2018.

FIELD, A. **Discovering Statistics Using IBM SPSS Statistics**. 5th Edition ed. Londo, United Kingdom: SAGE Publications, Limited, 2018.

FIELD, R. J.; SIERRA, A.; LETTINGA, G. “**Ensayos Anaerobios**”. Actas del 4 Seminario D. A. A. R.: Depuración Anaerobia de Aguas Residuales. **Anais...**Valladolid: 1988.

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

FONTES LIMA, D. M.; ZAIAT, M. The influence of the degree of back-mixing on hydrogen production in an anaerobic fixed-bed reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 12, p. 9630–9635, 2012.

FORESTI, E.; ZAIAT, M.; VALLERO, M. **Anaerobic processes as the core technology for sustainable domestic wastewater treatment : Consolidated applications , new trends , perspectives , and challenges**. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology. **Anais...**2006.

FUESS, L. T. et al. Operational strategies for long-term biohydrogen production from sugarcane stillage in a continuous acidogenic packed-bed reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 19, p. 8132–8145, 2016.

FUESS, L. T. et al. Designing full-scale biodigestion plants for the treatment of vinasse in sugarcane biorefineries: How phase separation and alkalization impact biogas and electricity production costs? **Chemical Engineering Research and Design**, v. 119, p. 209–220, 2017a.

FUESS, L. T. et al. Thermophilic two-phase anaerobic digestion using an innovative fixed-bed reactor for enhanced organic matter removal and bioenergy recovery from sugarcane vinasse. **Applied Energy**, v. 189, p. 480–491, 2017b.

FUESS, L. T. et al. Temporal dynamics and metabolic correlation between lactate-producing and hydrogen-producing bacteria in sugarcane vinasse dark fermentation: The key role of lactate. **Bioresource Technology**, v. 247, n. September 2017, p. 426–433, 2018.

FUESS, L. T. et al. Biohydrogen-producing from bottom to top? Quali-quantitative characterization of thermophilic fermentative consortia reveals microbial roles in an upflow

fixed-film reactor. **Chemical Engineering Journal Advances**, v. 7, n. March, p. 100125, 2021a.

FUESS, L. T. et al. Full details on continuous biohydrogen production from sugarcane molasses are unraveled: Performance optimization, self-regulation, metabolic correlations and quanti-qualitative biomass characterization. **Chemical Engineering Journal**, v. 414, n. November 2020, p. 128934, 2021b.

FUESS, L. T.; ZAIAT, M.; DO NASCIMENTO, C. A. O. Novel insights on the versatility of biohydrogen production from sugarcane vinasse via thermophilic dark fermentation: Impacts of pH-driven operating strategies on acidogenesis metabolite profiles. **Bioresource Technology**, v. 286, n. April, p. 121379, ago. 2019.

FUESS, L. T.; ZAIAT, M.; NASCIMENTO, C. A. O. DO. Molasses vs. juice: Maximizing biohydrogen production in sugarcane biorefineries to diversify renewable energy generation. **Journal of Water Process Engineering**, v. 37, n. July, p. 101534, 2020.

GADOW, S. I. et al. Effect of temperature and temperature shock on the stability of continuous cellulosic-hydrogen fermentation. **Bioresource Technology**, v. 142, p. 304–311, 2013.

GAIROLA, K.; SMIRNOVA, I. Hydrothermal pentose to furfural conversion and simultaneous extraction with SC-CO₂ - Kinetics and application to biomass hydrolysates. **Bioresource Technology**, v. 123, p. 592–598, 2012.

GARCÍA-DEPRAECT, O. et al. Enhanced biohydrogen production from the dark co-fermentation of tequila vinasse and nixtamalization wastewater: Novel insights into ecological regulation by pH. **Fuel**, v. 253, n. February, p. 159–166, 2019a.

GARCÍA-DEPRAECT, O. et al. Lactate- and acetate-based biohydrogen production through dark co-fermentation of tequila vinasse and nixtamalization wastewater: Metabolic and microbial community dynamics. **Bioresource Technology**, v. 282, n. February, p. 236–244, 2019b.

GARCÍA-DEPRAECT, O. et al. Changes in performance and bacterial communities in a continuous biohydrogen-producing reactor subjected to substrate- and pH-induced perturbations. **Bioresource Technology**, v. 295, n. August 2019, p. 122182, 2020.

GARCÍA-DEPRAECT, O. et al. A review on the factors influencing biohydrogen production from lactate: The key to unlocking enhanced dark fermentative processes. **Bioresource Technology**, v. 324, n. December 2020, 2021.

GHIMIRE, A. et al. A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products. **Applied Energy**, v. 144, p. 73–95, 2015.

GOMES, S. D. et al. The application of an innovative continuous multiple tube reactor as a strategy to control the specific organic loading rate for biohydrogen production by dark fermentation. **Bioresource Technology**, v. 197, p. 201–207, 2015.

GORGEÇ, F. K.; KARAPINAR, I. Production of biohydrogen from waste wheat in continuously operated UPBR: The effect of influent substrate concentration. **International Journal of Hydrogen Energy**, n. xxxx, 2019.

GUO, X. M. et al. Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, n. 19, p. 10660–10673, 2010.

HAFEZ, H. et al. Effect of organic loading on a novel hydrogen bioreactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, n. 1, p. 81–92, 2010.

HALLENBECK, P. C.; ABO-HASHESH, M.; GHOSH, D. Strategies for improving biological hydrogen production. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 1–9, 2012.

HALLENBECK, P. C.; BENEMANN, J. R. Biological hydrogen production; Fundamentals and limiting processes. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 27, n. 11–12, p. 1185–1193, 2002.

HAO, J.; WANG, H. Volatile fatty acids productions by mesophilic and thermophilic sludge fermentation: Biological responses to fermentation temperature. **Bioresource Technology**, v. 175, p. 367–373, 2015.

HARPER, S. R.; POHLAND, F. G. Recent developments in hydrogen management during anaerobic biological wastewater treatment. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 28, n. 4, p. 585–602, 1986.

HAUKOOS, J. S.; LEWIS, R. J. Advanced Statistics: Bootstrapping Confidence Intervals for Statistics with “Difficult” Distributions. **Academic Emergency Medicine**, v. 12, n. 4, p. 360–365, 1 abr. 2005.

HAWKES, F. R. et al. Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: Principles and progress. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 32, n. 2, p. 172–184, 2007.

HICKEY, R. F. et al. Start-up, operation, monitoring and control of high-rate anaerobic treatment systems. **Water Science and Technology**, v. 24, n. 8, p. 207–255, 1991.

HOELZLE, R. et al. Lactate vs butyrate production during mixed culture glucose fermentation driven by substrate availability as determined by metaproteomics. p. 1–19, 2020.

HOLLADAY, J. D. et al. An overview of hydrogen production technologies. **Catalysis Today**, v. 139, n. 4, p. 244–260, 2009.

INTERNATIONAL ENERGY AGENCY (IEA). Climate change. **Nature**, v. 479, n. 7373, p. 267–268, 16 nov. 2011.

JAIN, I. P. Hydrogen the fuel for 21st century. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 17, p. 7368–7378, 2009.

JUNG, K. W. et al. Bioreactor design for continuous dark fermentative hydrogen production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 18, p. 8612–8620, 2011a.

JUNG, K. W. et al. Bioreactor design for continuous dark fermentative hydrogen production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 18, p. 8612–8620, 2011b.

KHAN, M. A. et al. Biohydrogen production from anaerobic digestion and its potential as renewable energy. **Renewable Energy**, v. 129, p. 754–768, 2018.

KUMAR, G. et al. Hydrogen fermentation of different galactose-glucose compositions during various hydraulic retention times (HRTs). **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 35, p. 20625–20631, 2014.

KUMAR, G. et al. Recent insights into the cell immobilization technology applied for dark fermentative hydrogen production. **Bioresource Technology**, v. 219, p. 725–737, 2016.

LASPIDOU, C. S.; RITTMANN, B. E. A unified theory for extracellular polymeric substances, soluble microbial products, and active and inert biomass. **Water Research**, v. 36, n. 11, p. 2711–2720, jun. 2002.

LEE, D. Y. et al. Behavior of extracellular polymers and bio-fouling during hydrogen fermentation with a membrane bioreactor. **Journal of Membrane Science**, v. 322, n. 1, p. 13–18, 2008.

LEE, D. Y.; LI, Y. Y.; NOIKE, T. Influence of solids retention time on continuous H₂ production using membrane bioreactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, n. 1, p. 52–60, 2010.

LEE, Y. J.; MIYAHARA, T.; NOIKE, T. Effect of pH on microbial hydrogen fermentation. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 77, n. 6, p. 694–698, 2002.

LEITE, J. A. C. et al. Application of an anaerobic packed-bed bioreactor for the production of hydrogen and organic acids. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, p. 579–586, 2008.

LETTINGA, G. et al. Use of the upflow sludge blanket (USB) reactor concept for biological wastewater treatment. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 22, p. 699–734, 1980.

LETTINGA, G. Anaerobic digestion and wastewater treatment systems. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 67, n. 1, p. 3–28, 1995.

LETTINGA, G.; HULSHOFF, P. L. **Anaerobic reactor technology: reactor and process design** International Course on anaerobic treatment. Wageningen: [s.n.].

LEVENSPIEL, O. **Chemical reaction engineering**. [s.l.] John Wiley & Sons, 1998.

LI, C.; FANG, H. H. P. Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 37, n. 1, p. 1–39, 2007.

LINDGREN, S. E.; AXELSSON, L. T.; MCFEETERS, R. F. Anaerobic l-lactate degradation by *Lactobacillus plantarum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 66, n. 1–3, p. 209–213, 1990.

LORQUET, F. et al. Characterization and functional analysis of the *poxB* gene, which encodes pyruvate oxidase in *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 12, p. 3749–3759, 2004.

LOVATO, G. et al. Design study of an AnSBBR for hydrogen production by co-digestion of whey with glycerin: Interaction effects of organic load, cycle time and feed strategy. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 15, p. 9567–9576, 2017.

LUCAS, S. D. M. et al. Energy recovery from agro-industrial wastewaters through biohydrogen production: Kinetic evaluation and technological feasibility. **Renewable Energy**, v. 75, p. 496–504, 2015.

LUO, G. et al. Anaerobic treatment of cassava stillage for hydrogen and methane production in continuously stirred tank reactor (CSTR) under high organic loading rate (OLR). **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, n. 21, p. 11733–11737, 2010.

LUO, G. et al. Long-term effect of inoculum pretreatment on fermentative hydrogen production by repeated batch cultivations: Homoacetogenesis and methanogenesis as competitors to hydrogen production. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 108, n. 8, p. 1816–1827, 2011.

MAMMAN, A. S. et al. Furfural: Hemicellulose/xylose-derived biochemical. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 2, n. 5, p. 17, 2008.

MARAGNO, A. L. F.; CAMPOS, J. R. Treatment of wastewater with a low concentration of organics using an anaerobic fluidized bed reactor. **Water Science and Technology**, v. 25, n. 7, p. 179–191, 1992.

MCCARTY, P. L. The development of anaerobic treatment and its future. **Water Science and Technology**, v. 44, n. 8, p. 149–156, 1 out. 2001.

MENEZES, C.; PARANHOS, A. G. DE O.; SILVA, E. L. **Biohydrogen production in Fluidized Bed Reactors: an environmental approach**. New York: Nova Science Publishers, Inc., 2020.

MENEZES, C. A. DE; SILVA, E. L. Hydrogen production from sugarcane juice in expanded granular sludge bed reactors under mesophilic conditions: The role of homoacetogenesis and lactic acid production. **Industrial Crops and Products**, v. 138, n. April, p. 111586, 2019.

MOCKAITIS, G. et al. Continuous anaerobic bioreactor with a fixed-structure bed (ABFSB) for wastewater treatment with low solids and low applied organic loading content. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, n. 7, p. 1361–1368, 2014.

MOMIRLAN, M.; VEZIROGLU, T. N. The properties of hydrogen as fuel tomorrow in sustainable energy system for a cleaner planet. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 30, p. 795–802, 2005.

MONTIEL-CORONA, V.; PALOMO-BRIONES, R.; RAZO-FLORES, E. Continuous thermophilic hydrogen production from an enzymatic hydrolysate of agave bagasse: Inoculum origin, homoacetogenesis and microbial community analysis. **Bioresource Technology**, v. 306, n. January, p. 123087, 2020.

MONTOYA-ROSALES, J. DE J. et al. Improvement of continuous hydrogen production using individual and binary enzymatic hydrolysates of agave bagasse in suspended-culture and biofilm reactors. **Bioresource Technology**, v. 283, n. March, p. 251–260, 2019.

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 Modelling of the Anaerobic Digestion Process: Regulatory Mechanisms for the Formation of Short-Chain Volatile Acids from Glucose. **Water Science and Technology**, v. 15, n. 8–9, p. 209–232, 1 ago. 1983.

MOTA, V. T.; ZAIAT, M. Two- vs. single-stage anaerobic reactors: evaluation of effluent quality and energy production potential using sucrose-based wastewater. **Water Science and Technology**, v. 78, n. 9, p. 1966–1979, 12 nov. 2018.

MU, Y.; YU, H. Q.; WANG, Y. The role of pH in the fermentative H₂ production from an acidogenic granule-based reactor. **Chemosphere**, v. 64, n. 3, p. 350–358, 2006.

MU, Y.; YU, H.-Q. Biological hydrogen production in a UASB reactor with granules. I: Physicochemical characteristics of hydrogen-producing granules. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 94, n. 5, p. 980–987, 5 ago. 2006.

MUYZER, G.; WAAL, E. C. DE; UITIERLINDEN, A. G. Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**, v. 59, n. 3, p. 695–700, 1993.

NATH, K.; DAS, D. Improvement of fermentative hydrogen production: Various approaches. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, n. 5, p. 520–529, 2004.

NIKOLAIDIS, P.; POULLIKKAS, A. A comparative overview of hydrogen production processes. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 67, p. 597–611, 2017.

NIZ, M. Y. K. et al. Extreme thermophilic condition: An alternative for long-term biohydrogen production from sugarcane vinasse. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, n. 41, p. 22876–22887, 2019.

NUALSRI, C.; KONGJAN, P.; REUNGSANG, A. Direct integration of CSTR-UASB reactors for two-stage hydrogen and methane production from sugarcane syrup. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 40, p. 17884–17895, 2016.

NÜBEL, U. et al. Sequence Heterogeneities of Genes Encoding 16S rRNAs in. **JOURNAL OF BACTERIOLOGY**, v. 178, n. 19, p. 5636–5643, 1996.

OLIVEIRA, C. A. et al. Thermophilic biohydrogen production from sugarcane molasses under low pH: Metabolic and microbial aspects. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 45, n. 7, p. 4182–4192, 2020.

OUDE ELFERINK, S. J. W. H. et al. Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1,2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 125–132, 2001.

OZGUN, H. et al. A review of anaerobic membrane bioreactors for municipal wastewater treatment: Integration options, limitations and expectations. **Separation and Purification Technology**, v. 118, p. 89–104, 2013.

PALMA, D. et al. Using dolomitic limestone to replace conventional alkalization in the biodigestion of rapid acidification cassava processing wastewater. **Journal of Cleaner Production**, v. 172, p. 2942–2953, 2018.

PEIXOTO, G. et al. Hydrogen production from soft-drink wastewater in an upflow anaerobic packed-bed reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 15, p. 8953–8966, 2011.

PENTEADO, E. D. et al. Influence of seed sludge and pretreatment method on hydrogen production in packed-bed anaerobic reactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 14, p. 6137–6145, 2013.

PERNA, V. et al. Hydrogen production in an upflow anaerobic packed bed reactor used to treat cheese whey. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, p. 54–62, 2013.

POGGI-VARALDO, H. M. et al. Biohydrogen, biomethane and bioelectricity as crucial components of biorefinery of organic wastes: A review. **Waste Management and Research**, v. 32, n. 5, p. 353–365, 2014.

PRADHAN, N. et al. Model development and experimental validation of capnophilic lactic fermentation and hydrogen synthesis by *Thermotoga neapolitana*. **Water Research**, v. 99, p. 225–234, 2016.

PREETHI et al. Biohydrogen production from industrial wastewater: An overview. **Bioresource Technology Reports**, v. 7, n. July, p. 100287, 2019.

RAJESHWARI, K. V. et al. State-of-the-art of anaerobic digestion technology for industrial wastewater treatment. **Renewable & sustainable energy reviews**, v. 4, n. 2, p. 135–156, 2000.

REN, N. et al. Biological hydrogen production by dark fermentation: Challenges and prospects towards scaled-up production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 3, p. 365–370, 2011.

ROBLES, Á. et al. A review on anaerobic membrane bioreactors (AnMBRs) focused on modelling and control aspects. **Bioresource Technology**, v. 270, n. September, p. 612–626, 2018.

RODRÍGUEZ, J. et al. Variable stoichiometry with thermodynamic control in ADM1. **Water Science and Technology**, v. 54, n. 4, p. 101–110, 2006.

ROGERI, R. C. et al. Strategies to control pH in the dark fermentation of sugarcane vinasse: Impacts on sulfate reduction, biohydrogen production and metabolite distribution. **Journal of Environmental Management**, v. 325, 1 jan. 2023.

ROMEIRO, G. F. et al. Evaluation of sulfamethazine removal kinetics using fixed structured bed bioreactor. **Environmental Technology (United Kingdom)**, v. 40, n. 8, p. 979–987, 2019.

SAADY, N. M. C. **Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge. International Journal of Hydrogen Energy** Elsevier Ltd, , 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.07.122>>

SAWATDEENARUNAT, C. et al. Anaerobic biorefinery: Current status, challenges, and opportunities. **Bioresource Technology**, v. 215, p. 304–313, 2016.

SCHINK, B. **Anaerobic digestion: concepts, limits and perspectives.** *Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research*, 2002.

SCHMIDT, J. E.; AHRING, B. K. Granular sludge formation in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 49, n. 3, p. 229–246, 1996.

SEGHEZZO, L. **Kinetics and structure of anaerobic granular sludge from EGSB reactors.** [s.l.] Wageningen Agricultural University, 1997.

SHEN, L. et al. Membrane fouling in a fermentative hydrogen producing membrane bioreactor at different organic loading rates. *Journal of Membrane Science*, v. 360, n. 1–2, p. 226–233, 2010.

SHENG, G.-P.; YU, H.-Q.; LI, X.-Y. Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: A review. *Biotechnology Advances*, v. 28, n. 6, p. 882–894, nov. 2010.

SHIN, C.; BAE, J. Current status of the pilot-scale anaerobic membrane bioreactor treatments of domestic wastewaters: A critical review. *Bioresource Technology*, v. 247, n. September 2017, p. 1038–1046, 2018.

SINHARROY, A.; KUMAR, M.; PAKSHIRAJAN, K. **An overview of bioreactor configurations and operational strategies for dark fermentative biohydrogen production.** [s.l.] INC, 2020.

SIVAGURUNATHAN, P. et al. A critical review on issues and overcoming strategies for the enhancement of dark fermentative hydrogen production in continuous systems. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 41, n. 6, p. 3820–3836, 2016.

SIVAGURUNATHAN, P. et al. Mixed-culture H₂ fermentation performance and the relation between microbial community composition and hydraulic retention times for a fixed bed reactor fed with galactose/glucose mixtures. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 124, n. 3, p. 339–345, 2017.

SIVAGURUNATHAN, P.; SEN, B.; LIN, C. Overcoming propionic acid inhibition of hydrogen fermentation by temperature shift strategy. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 39, n. 33, p. 19232–19241, 2014.

STAMS, A. J. M.; PLUGGE, C. M. **Electron transfer in syntrophic communities of anaerobic bacteria and archaea.** *Nature Reviews Microbiology* Nature Publishing Group, , 2009.

STAZI, V.; TOMEI, M. C. Enhancing anaerobic treatment of domestic wastewater: State of the art, innovative technologies and future perspectives. **Science of the Total Environment**, v. 635, p. 78–91, 2018.

SURENDRA, K. C. et al. Anaerobic Digestion-Based Biorefinery for Bioenergy and Biobased Products. **Industrial Biotechnology**, v. 11, n. 2, p. 103–112, abr. 2015.

TAYLOR, K. A. C. C. A Simple Colorimetric Assay for Muramic Acid and Lactic Acid. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 56, n. 4, p. 49–58, 1996.

VAN DER LAST, A. R. M.; LETTINGA, G. Anaerobic Treatment of Domestic Sewage under Moderate Climatic (Dutch) Conditions Using Upflow Reactors at Increased Superficial Velocities. **Water Science and Technology**, v. 25, n. 7, p. 167–178, 1 abr. 1992.

VAN GINKEL, S. W.; LOGAN, B. Increased biological hydrogen production with reduced organic loading. **Water Research**, v. 39, n. 16, p. 3819–3826, 2005.

VEIGA, M. C. et al. A new device for measurement and control of gas production by bench scale anaerobic digesters. **Water Research**, v. 24, n. 12, p. 1551–1554, 1990.

VILELA, R. et al. Hydrogen production in reactors: The influence of organic loading rate, inoculum and support material. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, n. 50, p. 27259–27271, 2019.

WANG, B. et al. Simultaneous coproduction of hydrogen and methane from sugary wastewater by an “aCSTRH-UASBMet” system. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 19, p. 7774–7779, 2013.

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, Y.; MU, Y.; YU, H. Q. Comparative performance of two upflow anaerobic biohydrogen-producing reactors seeded with different sludges. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 32, n. 8, p. 1086–1094, 2007.

ZHANG, J. J. et al. Physical and hydrodynamic properties of flocs produced during biological hydrogen production. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, n. 7, p. 854–860, 2004.

ZHANG, Z. P. et al. Biohydrogen production in a granular activated carbon anaerobic fluidized bed reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 32, n. 2, p. 185–191, 2007.

APÊNDICE A:
Resultados dos testes estatísticos de normalidade
(Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (Levene)

Tabela A1: Teste de Normalidade para as cargas orgânicas volumétricas aplicadas medidas no período de total de operação (6° ao 68° dia de operação).

| COV _{a(CA)} | Shapiro-Wilk | | Levene | |
|----------------------|--------------|----------------|-----------|----------------|
| | Statistic | Sig. (p-valor) | Statistic | Sig. (p-valor) |
| Reatores | | | | |
| AnTR | 0,958 | 0,316 | - | - |
| AnSTBR | 0,955 | 0,269 | - | - |
| AnPBR | 0,972 | 0,632 | - | - |
| All Groups* | 0,977 | 0,143 | 0,885 | 0,417 |

Fonte: Elaboração própria. Legenda: valores em vermelho ($p < 0,05$) representam distribuição de probabilidade não paramétrica (teste de Shapiro-Wilk) e valores em negrito e vermelho ($p < 0,05$) representam heterogeneidade das variâncias (teste de Levene). Notas: *All Groups (N=84) = AnTR (n=28) + AnSTBR (n=28) + AnPBR (n=28).

Síglas: COV_{a(CA)} (carga orgânica volumétrica aplicada na câmara de alimentação); AnTR (*Anaerobic Tubular Reactor*); AnSTBR (*Anaerobic Structured-Bed Reactor*); AnPBR (*Anaerobic Packed-Bed Reactor*).

Tabela A2: Teste de Normalidade e Homocedasticidade para as frações relativas das concentrações de carboidratos convertidos na câmara de alimentação dos reatores medidas a partir dos perfis especiais.

| f-CH _C -CA | Shapiro-Wilk | | Levene | |
|-----------------------|--------------|----------------|-----------|----------------|
| | Statistic | Sig. (p-valor) | Statistic | Sig. (p-valor) |
| Reatores | | | | |
| AnTR | 0,988 | 0,950 | - | - |
| AnSTBR | 0,797 | 0,097 | - | - |
| AnPBR | 1,000 | 0,999 | - | - |
| All Groups* | 0,889 | 0,113 | 2,791 | 0,114 |

Fonte: Elaboração própria. Legenda: valores em vermelho ($p < 0,05$) representam distribuição de probabilidade não paramétrica (teste de Shapiro-Wilk) e valores em negrito e vermelho ($p < 0,05$) representam heterogeneidade das variâncias (teste de Levene). Notas: *All Groups (N=12) = AnTR (n=4) + AnSTBR (n=4) + AnPBR (n=4).

Síglas: f-CH_C-CA (fração relativa da concentração de carboidratos convertidos na câmara de alimentação); AnTR (*Anaerobic Tubular Reactor*); AnSTBR (*Anaerobic Structured-Bed Reactor*); AnPBR (*Anaerobic Packed-Bed Reactor*).

Tabela A3: Teste de Normalidade e Homocedasticidade para as frações relativas das concentrações de carboidratos convertidos na câmara de alimentação dos reatores medidas a partir dos perfis especiais.

| f-CH_c-ZL | Shapiro-Wilk | | Levene | |
|----------------------------|--------------|----------------|-----------|----------------|
| | Statistic | Sig. (p-valor) | Statistic | Sig. (p-valor) |
| AnTR | 0,988 | 0,950 | - | - |
| AnSTBR | 0,797 | 0,097 | - | - |
| AnPBR | 1,000 | 0,999 | - | - |
| All Groups* | 0,889 | 0,113 | 2,791 | 0,114 |

Fonte: Elaboração própria. Legenda: valores em vermelho ($p < 0,05$) representam distribuição de probabilidade não paramétrica (teste de Shapiro-Wilk) e valores em negrito e vermelho ($p < 0,05$) representam heterogeneidade das variâncias (teste de Levene). Notas: *All Groups (N=12) = AnTR (n=4) + AnSTBR (n=4) + AnPBR (n=4).

Siglas: f-CH_c-ZL (fração relativa da concentração de carboidratos convertidos na zona de leite); AnTR (*Anaerobic Tubular Reactor*); AnSTBR (*Anaerobic Structured-Bed Reactor*); AnPBR (*Anaerobic Packed-Bed Reactor*).

Tabela A4: Teste de Normalidade e Homocedasticidade para as eficiências de conversão de carboidratos na câmara de alimentação dos reatores medidas a partir dos perfis especiais.

| EC_{CH}-CA | Shapiro-Wilk | | Levene | |
|---------------------------|--------------|----------------|-----------|----------------|
| | Statistic | Sig. (p-valor) | Statistic | Sig. (p-valor) |
| AnTR | 0,882 | 0,348 | - | - |
| AnSTBR | 0,946 | 0,691 | - | - |
| AnPBR | 0,979 | 0,894 | - | - |
| All Groups* | 0,972 | 0,929 | 1,051 | 0,389 |

Fonte: Elaboração própria. Legenda: valores em vermelho ($p < 0,05$) representam distribuição de probabilidade não paramétrica (teste de Shapiro-Wilk) e valores em negrito e vermelho ($p < 0,05$) representam heterogeneidade das variâncias (teste de Levene). Notas: *All Groups (N=12) = AnTR (n=4) + AnSTBR (n=4) + AnPBR (n=4).

Siglas: EC_{CH}-CA (eficiência de conversão de carboidratos na câmara de alimentação); AnTR (*Anaerobic Tubular Reactor*); AnSTBR (*Anaerobic Structured-Bed Reactor*); AnPBR (*Anaerobic Packed-Bed Reactor*).

Tabela A5: Teste de Normalidade e Homocedasticidade para as eficiências de conversão de carboidratos na de leito dos reatores medidas a partir dos perfis especiais.

| Reatores | Shapiro-Wilk | | Levene | |
|-------------|--------------|----------------|-----------|----------------|
| | Statistic | Sig. (p-valor) | Statistic | Sig. (p-valor) |
| AnTR | 0,982 | 0,916 | - | - |
| AnSTBR | 0,798 | 0,098 | - | - |
| AnPBR | 0,945 | 0,686 | - | - |
| All Groups* | 0,891 | 0,121 | 1,113 | 0,370 |

Fonte: Elaboração própria. Legenda: valores em vermelho ($p < 0,05$) representam distribuição de probabilidade não paramétrica (teste de Shapiro-Wilk) e valores em negrito e vermelho ($p < 0,05$) representam heterogeneidade das variâncias (teste de Levene). Notas: *All Groups (N=12) = AnTR (n=4) + AnSTBR (n=4) + AnPBR (n=4).

Siglas: EC_{CH-ZL} (eficiência de conversão de carboidratos na zona de leito); AnTR (*Anaerobic Tubular Reactor*); AnSTBR (*Anaerobic Structured-Bed Reactor*); AnPBR (*Anaerobic Packed-Bed Reactor*).

Tabela A6: Teste de Normalidade e Homocedasticidade para as eficiências de conversão de carboidratos calculadas no período de estabilidade (22° ao 68° dia de operação).

| Reatores | Shapiro-Wilk | | Levene | |
|-------------|--------------|----------------|-----------|----------------|
| | Statistic | Sig. (p-valor) | Statistic | Sig. (p-valor) |
| AnTR | 0,945 | 0,276 | - | - |
| AnSTBR | 0,877 | 0,013 | - | - |
| AnPBR | 0,971 | 0,765 | - | - |
| All Groups* | 0,959 | 0,033 | 2,179 | 0,122 |

Fonte: Elaboração própria. Legenda: valores em vermelho ($p < 0,05$) representam distribuição de probabilidade não paramétrica (teste de Shapiro-Wilk) e valores em negrito e vermelho ($p < 0,05$) representam heterogeneidade das variâncias (teste de Levene). Notas: *All Groups (N=63) = AnTR (n=21) + AnSTBR (n=21) + AnPBR (n=21).

Siglas: EC_{CH} (eficiência de conversão de carboidratos); AnTR (*Anaerobic Tubular Reactor*); AnSTBR (*Anaerobic Structured-Bed Reactor*); AnPBR (*Anaerobic Packed-Bed Reactor*).

Tabela A7: Teste de Normalidade e Homocedasticidade para as produções volumétricas de hidrogênio calculadas a partir do volume útil dos reatores no período de estabilidade (22° ao 68° dia de operação).

| PVH _{VU} | Shapiro-Wilk | | Levene | |
|-------------------|--------------|----------------|-----------|----------------|
| | Statistic | Sig. (p-valor) | Statistic | Sig. (p-valor) |
| AnTR | 0,925 | 0,109 | - | - |
| AnSTBR | 0,921 | 0,092 | - | - |
| AnPBR | 0,948 | 0,312 | - | - |
| All Groups* | 0,94 | 0,004 | 5,177 | 0,008 |

Fonte: Elaboração própria. Legenda: valores em vermelho ($p < 0,05$) representam distribuição de probabilidade não paramétrica (teste de Shapiro-Wilk) e valores em negrito e vermelho ($p < 0,05$) representam heterogeneidade das variâncias (teste de Levene). Notas: *All Groups (N=63) = AnTR (n=21) + AnSTBR (n=21) + AnPBR (n=21).

Siglas: PVH_{VU} (produção volumétrica de hidrogênio calculada a partir do volume útil); AnTR (*Anaerobic Tubular Reactor*); AnSTBR (*Anaerobic Structured-Bed Reactor*); AnPBR (*Anaerobic Packed-Bed Reactor*).

Tabela A8: Teste de Normalidade e Homocedasticidade para as produções volumétricas de hidrogênio calculadas a partir do volume total dos reatores no período de estabilidade (22° ao 68° dia de operação).

| PVH _{VT} | Shapiro-Wilk | | Levene | |
|-------------------|--------------|----------------|-----------|----------------|
| | Statistic | Sig. (p-valor) | Statistic | Sig. (p-valor) |
| AnTR | 0,925 | 0,109 | - | - |
| AnSTBR | 0,921 | 0,092 | - | - |
| AnPBR | 0,948 | 0,312 | - | - |
| All Groups* | 0,983 | 0,556 | 0,42 | 0,959 |

Fonte: Elaboração própria. Legenda: valores em vermelho ($p < 0,05$) representam distribuição de probabilidade não paramétrica (teste de Shapiro-Wilk) e valores em negrito e vermelho ($p < 0,05$) representam heterogeneidade das variâncias (teste de Levene). Notas: *All Groups (N=63) = AnTR (n=21) + AnSTBR (n=21) + AnPBR (n=21).

Siglas: PVH_{VT} (produção volumétrica de hidrogênio calculada a partir do volume total); AnTR (*Anaerobic Tubular Reactor*); AnSTBR (*Anaerobic Structured-Bed Reactor*); AnPBR (*Anaerobic Packed-Bed Reactor*).

Tabela A9: Teste de Normalidade e Homocedasticidade para os rendimentos de hidrogênio estimados no período de estabilidade (22° ao 68° dia de operação).

| HY | Shapiro-Wilk | | Levene | |
|-------------|--------------|--------------|----------------|-----------|
| | Reatores | Statistic | Sig. (p-valor) | Statistic |
| AnTR | 0,791 | 0,000 | - | - |
| AnSTBR | 0,962 | 0,567 | - | - |
| AnPBR | 0,943 | 0,245 | - | - |
| All Groups* | 0,885 | 0,000 | 0,474 | 0,625 |

Fonte: Elaboração própria. Legenda: valores em vermelho ($p < 0,05$) representam distribuição de probabilidade não paramétrica (teste de Shapiro-Wilk) e valores em negrito e vermelho ($p < 0,05$) representam heterogeneidade das variâncias (teste de Levene). Notas: *All Groups (N=63) = AnTR (n=21) + AnSTBR (n=21) + AnPBR (n=21).

Siglas: HY (rendimento de hidrogênio, do inglês *Hydrogen Yield*); AnTR (*Anaerobic Tubular Reactor*); AnSTBR (*Anaerobic Structured-Bed Reactor*); AnPBR (*Anaerobic Packed-Bed Reactor*).

Tabela A10: Teste de Normalidade e Homocedasticidade para as frações de hidrogênio no biogás medidas no período de estabilidade (22° ao 68° dia de operação).

| f-H ₂ | Shapiro-Wilk | | Levene | |
|------------------|--------------|--------------|----------------|-----------|
| | Reatores | Statistic | Sig. (p-valor) | Statistic |
| AnTR | 0,920 | 0,087 | - | - |
| AnSTBR | 0,790 | 0,000 | - | - |
| AnPBR | 0,856 | 0,005 | - | - |
| All Groups* | 0,946 | 0,008 | 1,716 | 0,189 |

Fonte: Elaboração própria. Legenda: valores em vermelho ($p < 0,05$) representam distribuição de probabilidade não paramétrica (teste de Shapiro-Wilk) e valores em negrito e vermelho ($p < 0,05$) representam heterogeneidade das variâncias (teste de Levene). Notas: *All Groups (N=63) = AnTR (n=21) + AnSTBR (n=21) + AnPBR (n=21).

Siglas: f-H₂ (fração de hidrogênio do biogás); AnTR (*Anaerobic Tubular Reactor*); AnSTBR (*Anaerobic Structured-Bed Reactor*); AnPBR (*Anaerobic Packed-Bed Reactor*).

Tabela A11: Teste de Normalidade para os valores de pH medidos na corrente efluente dos reatores no período de estabilidade (22° ao 68° dia de operação).

| pH | Shapiro-Wilk | | Levene | |
|-------------|--------------|----------------|-----------|----------------|
| | Statistic | Sig. (p-valor) | Statistic | Sig. (p-valor) |
| AnTR | 0,933 | 0,156 | - | - |
| AnSTBR | 0,975 | 0,831 | - | - |
| AnPBR | 0,663 | 0,000 | - | - |
| All Groups* | 0,799 | 0,000 | 7,797 | 0,001 |

Fonte: Elaboração própria. Legenda: valores em vermelho ($p < 0,05$) representam distribuição de probabilidade não paramétrica (teste de Shapiro-Wilk) e valores em negrito e vermelho ($p < 0,05$) representam heterogeneidade das variâncias (teste de Levene). Notas: *All Groups (N=63) = AnTR (n=21) + AnSTBR (n=21) + AnPBR (n=21).

Siglas: pH (potencial hidrogeniônico); AnTR (*Anaerobic Tubular Reactor*); AnSTBR (*Anaerobic Structured-Bed Reactor*); AnPBR (*Anaerobic Packed-Bed Reactor*).

Tabela A12: Teste de Normalidade para as concentrações de ácido láctico medidas na corrente efluente dos reatores no período de estabilidade (22° ao 68° dia de operação).

| HLa | Shapiro-Wilk | | Levene | |
|-------------|--------------|----------------|-----------|----------------|
| | Statistic | Sig. (p-valor) | Statistic | Sig. (p-valor) |
| AnTR | 0,949 | 0,320 | - | - |
| AnSTBR | 0,876 | 0,012 | - | - |
| AnPBR | 0,969 | 0,706 | - | - |
| All Groups* | 0,979 | 0,343 | 3,755 | 0,029 |

Fonte: Elaboração própria. Legenda: valores em vermelho ($p < 0,05$) representam distribuição de probabilidade não paramétrica (teste de Shapiro-Wilk) e valores em negrito e vermelho ($p < 0,05$) representam heterogeneidade das variâncias (teste de Levene). Notas: *All Groups (N=63) = AnTR (n=21) + AnSTBR (n=21) + AnPBR (n=21).

Siglas: HLa (concentração de ácido láctico); AnTR (*Anaerobic Tubular Reactor*); AnSTBR (*Anaerobic Structured-Bed Reactor*); AnPBR (*Anaerobic Packed-Bed Reactor*).

Tabela A13: Teste de Normalidade para as concentrações de ácido butírico medidas na corrente efluente dos reatores no período de estabilidade (22° ao 68° dia de operação).

| Reatores | Shapiro-Wilk | | Levene | |
|-------------|--------------|----------------|-----------|----------------|
| | Statistic | Sig. (p-valor) | Statistic | Sig. (p-valor) |
| AnTR | 0,819 | 0,001 | - | - |
| AnSTBR | 0,883 | 0,017 | - | - |
| AnPBR | 0,970 | 0,736 | - | - |
| All Groups* | 0,925 | 0,001 | 2,469 | 0,093 |

Fonte: Elaboração própria. Legenda: valores em vermelho ($p < 0,05$) representam distribuição de probabilidade não paramétrica (teste de Shapiro-Wilk) e valores em negrito e vermelho ($p < 0,05$) representam heterogeneidade das variâncias (teste de Levene). Notas: *All Groups (N=63) = AnTR (n=21) + AnSTBR (n=21) + AnPBR (n=21).

Siglas: HBU (concentração de ácido butírico); AnTR (*Anaerobic Tubular Reactor*); AnSTBR (*Anaerobic Structured-Bed Reactor*); AnPBR (*Anaerobic Packed-Bed Reactor*).

Tabela A14: Teste de Normalidade para as concentrações de ácido acético determinadas na corrente efluente dos reatores durante o período de estabilidade (22° ao 68° dia de operação).

| Reatores | Shapiro-Wilk | | Levene | |
|-------------|--------------|----------------|-----------|----------------|
| | Statistic | Sig. (p-valor) | Statistic | Sig. (p-valor) |
| AnTR | 0,926 | 0,116 | - | - |
| AnSTBR | 0,900 | 0,036 | - | - |
| AnPBR | 0,988 | 0,994 | - | - |
| All Groups* | 0,935 | 0,002 | 1,931 | 0,154 |

Fonte: Elaboração própria.

Legenda: valores em vermelho ($p < 0,05$) representam distribuição de probabilidade não paramétrica (teste de Shapiro-Wilk) e valores em negrito e vermelho ($p < 0,05$) representam heterogeneidade das variâncias (teste de Levene). Notas: *All Groups (N=63) = AnTR (n=21) + AnSTBR (n=21) + AnPBR (n=21).

Siglas: HAc (concentração de ácido acético); AnTR (*Anaerobic Tubular Reactor*); AnSTBR (*Anaerobic Structured-Bed Reactor*); AnPBR (*Anaerobic Packed-Bed Reactor*).

Tabela A15: Teste de Normalidade para as concentrações de ácido propiônico medidas na corrente efluente dos reatores no período de estabilidade (22° ao 68° dia de operação).

| HPr | Shapiro-Wilk | | Levene | |
|-------------|--------------|----------------|-----------|----------------|
| | Statistic | Sig. (p-valor) | Statistic | Sig. (p-valor) |
| AnTR | 0,858 | 0,006 | - | - |
| AnSTBR | 0,896 | 0,030 | - | - |
| AnPBR | 0,927 | 0,119 | - | - |
| All Groups* | 0781 | 0,000 | 18,296 | 0,000 |

Fonte: Elaboração própria. Legenda: valores em vermelho ($p < 0,05$) representam distribuição de probabilidade não paramétrica (teste de Shapiro-Wilk) e valores em negrito e vermelho ($p < 0,05$) representam heterogeneidade das variâncias (teste de Levene). Notas: *All Groups (N=63) = AnTR (n=21) + AnSTBR (n=21) + AnPBR (n=21).

Siglas: HPr (concentração de ácido propiônico); AnTR (*Anaerobic Tubular Reactor*); AnSTBR (*Anaerobic Structured-Bed Reactor*); AnPBR (*Anaerobic Packed-Bed Reactor*).

Tabela A16: Teste de Normalidade para as concentrações de etanol medidas na corrente efluente dos reatores no período de estabilidade (22° ao 68° dia de operação).

| EtOH | Shapiro-Wilk | | Levene | |
|-------------|--------------|----------------|-----------|----------------|
| | Statistic | Sig. (p-valor) | Statistic | Sig. (p-valor) |
| AnTR | 0,537 | 0,000 | - | - |
| AnSTBR | 0,850 | 0,004 | - | - |
| AnPBR | 0,842 | 0,003 | - | - |
| All Groups* | 0,742 | 0,000 | 1,124 | 0,332 |

Fonte: Elaboração própria. Legenda: valores em vermelho ($p < 0,05$) representam distribuição de probabilidade não paramétrica (teste de Shapiro-Wilk) e valores em negrito e vermelho ($p < 0,05$) representam heterogeneidade das variâncias (teste de Levene). Notas: *All Groups (N=63) = AnTR (n=21) + AnSTBR (n=21) + AnPBR (n=21).

Siglas: EtOH (concentração de etanol); AnTR (*Anaerobic Tubular Reactor*); AnSTBR (*Anaerobic Structured-Bed Reactor*); AnPBR (*Anaerobic Packed-Bed Reactor*).

Tabela A16: Teste de Normalidade para as concentrações de ácido cítrico medidas na corrente efluente dos reatores no período de estabilidade (22° ao 68° dia de operação).

| H <i>C</i> i | Shapiro-Wilk | | Levene | | |
|--------------|--------------|-----------|----------------|-----------|----------------|
| | Reatores | Statistic | Sig. (p-valor) | Statistic | Sig. (p-valor) |
| AnTR | | 0,908 | <u>0,051</u> | - | - |
| AnSTBR | | 0,965 | 0,629 | - | - |
| AnPBR | | 0,954 | 0,398 | - | - |
| All Groups* | | 0,948 | 0,010 | 9,795 | 0,000 |

Fonte: Elaboração própria.

Legenda: valores em vermelho ($p < 0,05$) representam distribuição de probabilidade não paramétrica (teste de Shapiro-Wilk) e valores em negrito e vermelho ($p < 0,05$) representam heterogeneidade das variâncias (teste de Levene).

Notas: *All Groups (N=63) = AnTR (n=21) + AnSTBR (n=21) + AnPBR (n=21).

Siglas: EtOH (concentração de etanol); AnTR (*Anaerobic Tubular Reactor*); AnSTBR (*Anaerobic Structured-Bed Reactor*); AnPBR (*Anaerobic Packed-Bed Reactor*).

Tabela A16: Teste de Normalidade para as concentrações de ácido fórmico medidas na corrente efluente dos reatores no período de estabilidade (22° ao 68° dia de operação).

| H <i>F</i> o | Shapiro-Wilk | | Levene | | |
|--------------|--------------|-----------|----------------|-----------|----------------|
| | Reatores | Statistic | Sig. (p-valor) | Statistic | Sig. (p-valor) |
| AnTR | | 0,615 | 0,000 | - | - |
| AnSTBR | | 0,404 | 0,000 | - | - |
| AnPBR | | 0,854 | 0,005 | - | - |
| All Groups* | | 0,582 | 0,000 | 0,044 | 0,957 |

Fonte: Elaboração própria.

Legenda: valores em vermelho ($p < 0,05$) representam distribuição de probabilidade não paramétrica (teste de Shapiro-Wilk) e valores em negrito e vermelho ($p < 0,05$) representam heterogeneidade das variâncias (teste de Levene).

Notas: *All Groups (N=63) = AnTR (n=21) + AnSTBR (n=21) + AnPBR (n=21).

Siglas: HFo (concentração de ácido fórmico); AnTR (*Anaerobic Tubular Reactor*); AnSTBR (*Anaerobic Structured-Bed Reactor*); AnPBR (*Anaerobic Packed-Bed Reactor*).

Tabela A16: Teste de Normalidade para as razões H₂-medido/H₂-teórico no período de estabilidade (22° ao 68° dia de operação).

| H ₂ -m/H ₂ -t | Shapiro-Wilk | | Levene | |
|-------------------------------------|--------------|----------------|-----------|----------------|
| | Statistic | Sig. (p-valor) | Statistic | Sig. (p-valor) |
| AnTR | 0,994 | 1,00 | - | - |
| AnSTBR | 0,905 | 0,045 | - | - |
| AnPBR | 0,823 | 0,001 | - | - |
| All Groups* | 0,880 | 0,000 | 0,980 | 0,381 |

Fonte: Elaboração própria.

Legenda: valores em vermelho ($p < 0,05$) representam distribuição de probabilidade não paramétrica (teste de Shapiro-Wilk) e valores em negrito e vermelho ($p < 0,05$) representam heterogeneidade das variâncias (teste de Levene).

Notas: *All Groups (N=63) = AnTR (n=21) + AnSTBR (n=21) + AnPBR (n=21).

Siglas: HFo (concentração de ácido fórmico); AnTR (*Anaerobic Tubular Reactor*); AnSTBR (*Anaerobic Structured-Bed Reactor*); AnPBR (*Anaerobic Packed-Bed Reactor*).

Tabela A17: Distribuições de probabilidade observadas para as variáveis dependentes utilizadas para análise dos reatores.

| Variável dependente | População | AnSTBR | AnTR | AnPBR |
|----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| COV _{a(CA)} | Paramétrica | Paramétrica | Paramétrica | Paramétrica |
| EC _{CHt} | Paramétrica | Não paramétrica | Paramétrica | Paramétrica |
| PVH _{VU} | Paramétrica | Paramétrica | Paramétrica | Paramétrica |
| PVH _{VT} | Paramétrica | Paramétrica | Paramétrica | Paramétrica |
| HY | Paramétrica | Paramétrica | Não paramétrica | Paramétrica |
| pH | Paramétrica | Paramétrica | Paramétrica | Não paramétrica |
| f-H ₂ | Paramétrica | Não paramétrica | Paramétrica | Não paramétrica |
| HL _a | Paramétrica | Não paramétrica | Paramétrica | Paramétrica |
| HBu | Paramétrica | Não paramétrica | Não paramétrica | Paramétrica |
| HAc | Não paramétrica | Não paramétrica | Paramétrica | Paramétrica |
| HPr | Não paramétrica | Não paramétrica | Não paramétrica | Não paramétrica |
| EtOH | Não paramétrica | Não paramétrica | Não paramétrica | Não paramétrica |
| HCi | Paramétrica | Paramétrica | Paramétrica | Paramétrica |
| HFo | Não paramétrica | Não paramétrica | Não paramétrica | Não paramétrica |

Fonte: Elaboração própria. Legenda: paramétrica (distribuição de probabilidade normal); não paramétrica (distribuição de probabilidade diferente da normal).

Siglas: COV_{a(CA)} (carga orgânica volumétrica aplicada na câmara de alimentação); f-CH_C-CA (fração de carboidratos convertidos na câmara de alimentação); f-CH_C-ZL (fração de carboidratos convertidos na zona de leito); EC_{CH}-CA (eficiência de conversão de carboidratos na câmara de alimentação); EC_{CH}-ZL (eficiência de conversão de carboidratos na zona de leito); EC_{CH} (eficiência de conversão de carboidratos); PVH_(VU) (produção volumétrica de hidrogênio calculada a partir do volume útil); PVH_(VT) (produção volumétrica de hidrogênio calculada a partir do volume total); HY (rendimento de hidrogênio); pH (potencial hidrogeniônico); f-H₂ (fração de hidrogênio do biogás); HL_a (conc. de ácido láctico); HBu (conc. de ácido butírico); HAc (conc. de ácido acético); HPr (conc. de ácido propiônico); EtOH (conc. de etanol).

APÊNDICE B:

Resultados do teste estatístico de comparação para variáveis quantitativas com distribuição normal (ANOVA), teste de comparação múltipla (Teste de Tuckey ou Games-Howell)

Tabela B1: Resultados dos testes ANOVA (*One Way*), ANOVA (*One Way*) com correção de Welch e os tipos de testes post-hoc empregados.

| Variáveis dependentes | Unidade | Variáveis independentes (grupos) | | | Distribuição de probabilidade | ANOVA (<i>One Way</i>) | ANOVA (<i>One Way</i>) com correção de Welch | Teste post-hoc |
|--------------------------|--|----------------------------------|--------|-------|-------------------------------|--------------------------|--|----------------|
| COV _{a(CA)} | [kg-DQO·m ⁻³ ·d ⁻¹] | AnTR | AnSTBR | AnPBR | Paramétrica | 0,359 | - | - |
| f-CHt _(C) -CA | [%] | AnTR | AnSTBR | AnPBR | Paramétrica | 0,129 | - | - |
| f-CHt _(C) -ZL | [%] | AnTR | AnSTBR | AnPBR | Paramétrica | 0,129 | - | - |
| EC _{CH} -CA | [%] | AnTR | AnSTBR | AnPBR | Paramétrica | 0,240 | - | - |
| EC _{CH} -ZL | [%] | AnTR | AnSTBR | AnPBR | Paramétrica | | | |
| EC _{CH} | [%] | AnTR | AnSTBR | AnPBR | Não-Paramétrica | 0,000 | - | |
| PVH _(VU) | [mL-H ₂ ·L ⁻¹ ·d] | AnTR | AnSTBR | AnPBR | Não-Paramétrica | - | 0,000 | Games-Howell |
| PVH _(VT) | [mL-H ₂ ·L ⁻¹ ·d] | AnTR | AnSTBR | AnPBR | Paramétrica | 0,000 | - | Tukey |
| HY | [mol-H ₂ ·mol ⁻¹ CH] | AnTR | AnSTBR | AnPBR | Não-Paramétrica | 0,275 | - | - |
| f-H ₂ | [%] | AnTR | AnSTBR | AnPBR | Não-Paramétrica | 0,087 | - | - |

| | | | | | | | | |
|-----------|---------------------------|------|--------|-------|-----------------|--------|-------|--------------|
| pH | - | AnTR | AnSTBR | AnPBR | Não-Paramétrica | - | 0,000 | Games-Howell |
| HLa | [mg-DQO·L ⁻¹] | AnTR | AnSTBR | AnPBR | Não-Paramétrica | - | 0,000 | Games-Howell |
| HBu | [mg-DQO·L ⁻¹] | AnTR | AnSTBR | AnPBR | Não-Paramétrica | - | 0,619 | - |
| HAc | [mg-DQO·L ⁻¹] | AnTR | AnSTBR | AnPBR | Não-Paramétrica | 0,000 | - | Tukey |
| HPr | [mg-DQO·L ⁻¹] | AnTR | AnSTBR | AnPBR | Não-Paramétrica | - | 0,000 | Games-Howell |
| EtOH | [mg-DQO·L ⁻¹] | AnTR | AnSTBR | AnPBR | Não-Paramétrica | 0,001 | - | Tukey |
| HCi | [mg-DQO·L ⁻¹] | AnTR | AnSTBR | AnPBR | Paramétrica | - | 0,000 | Games-Howell |
| HFo | [mg-DQO·L ⁻¹] | AnTR | AnSTBR | AnPBR | Não-Paramétrica | 0,948 | - | - |
| H2-m/H2-t | [%] | AnTR | AnSTBR | AnPBR | Não-Paramétrica | 0,063* | - | |

Fonte: elaboração própria. Legenda: Valores em vermelho representam diferenças significativas entre os reatores para a variável dependente correspondente.

Siglas: COV_{a(CA)} (carga orgânica volumétrica aplicada na câmara de alimentação); EC_{CHt} (eficiência de conversão de carboidratos); PVH_{VU} (produção volumétrica de hidrogênio calculada a partir do volume útil); PVH_{VT} (produção volumétrica de hidrogênio calculada a partir do volume total); HY (rendimento de hidrogênio); pH (potencial hidrogeniônico); f-H₂ (fração de hidrogênio do biogás); HLa (conc. de ácido lático); HBu (conc. de ácido butírico); HAc (conc. de ácido acético); HPr (conc. de ácido propiônico); EtOH (conc. de etanol).

Tabela B2: Teste post-hoc de Tukey com Bootstrapping (95% IC BCa) para as eficiências de conversão de carboidratos no período de estabilidade.

| Comparação entre os reatores (grupos) – EC _{CHt} | | $\bar{X}_i - \bar{X}_j$ | Estimativas de Bootstrapping (95% IC BCa) | | |
|---|-----------------------|-------------------------|---|-----------------|-----------------|
| | | | Erro-padrão | Limite inferior | Limite superior |
| AnTR _(i) | AnSTBR _(j) | -11,596 | 2,392 | -16,375 | -7,257 |
| AnTR _(i) | AnPBR _(j) | -10,092 | 2,198 | -14,601 | -5,708 |
| AnSTBR _(i) | AnPBR _(j) | 1,504 | 1,947 | -2,641 | 5,976 |

Fonte: elaboração própria. Legenda: \bar{X} (média aritmética). Notas: valores em vermelho indicam que os grupos comparados apresentaram diferenças significativas entre as médias.

Siglas: EC_{CH} (eficiência de conversão de carboidratos); AnTR (*Anaerobic Tubular Reactor*); AnSTBR (*Anaerobic Structured-Bed Reactor*); AnPBR (*Anaerobic Packed-Bed Reactor*).

Tabela B3: Teste post-hoc de Games-Howell com Bootstrapping (95% IC BCa) para as produções volumétricas de hidrogênio calculadas a partir do volume útil dos reatores no período de estabilidade.

| Comparação entre os reatores (grupos) – PVH _{VU} | | $\bar{X}_i - \bar{X}_j$ | Estimativas de Bootstrapping (95% IC BCa) | | |
|---|-----------------------|-------------------------|---|-----------------|-----------------|
| | | | Erro-padrão | Limite inferior | Limite superior |
| AnTR _(i) | AnSTBR _(j) | -268,526 | 37,417 | -334,375 | -202,424 |
| AnTR _(i) | AnPBR _(j) | -726,446 | 52,990 | -828,927 | -624,735 |
| AnSTBR _(i) | AnPBR _(j) | -457,920 | 57,818 | -566,299 | -326,655 |

Fonte: elaboração própria. Legenda: \bar{X} (média aritmética). Notas: valores em vermelho indicam que os grupos comparados apresentaram diferenças significativas entre as médias.

Siglas: PVH_{VU} (produção volumétrica de hidrogênio calculada a partir do volume útil); AnTR (*Anaerobic Tubular Reactor*); AnSTBR (*Anaerobic Structured-Bed Reactor*); AnPBR (*Anaerobic Packed-Bed Reactor*).

Tabela B4: Teste post-hoc de Tukey para as produções volumétricas de hidrogênio calculadas a partir do volume total dos reatores no período de estabilidade.

| Comparação entre os reatores (grupos) – PVH _{VT} | | $\bar{X}_i - \bar{X}_j$ | Estimativas de Bootstrapping (95% IC BCa) | | |
|---|-----------------------|-------------------------|---|-----------------|-----------------|
| | | | Erro-padrão | Limite inferior | Limite superior |
| AnTR _(i) | AnSTBR _(j) | -157,038 | 33,921 | -229,964 | -93,534 |
| AnTR _(i) | AnPBR _(j) | -75,822 | 32,796 | -139,724 | -15,497 |
| AnSTBR _(i) | AnPBR _(j) | 81,216 | 35,898 | 12,187 | 153,422 |

Fonte: elaboração própria.

Legenda: \bar{X} (média aritmética).

Notas: valores em vermelho indicam que os grupos comparados apresentaram diferença significativa entre as médias ($p < 0,05$).

Siglas: PVH_{VT} (produção volumétrica de hidrogênio calculada a partir do volume total); AnTR (*Anaerobic Tubular Reactor*); AnSTBR (*Anaerobic Structured-Bed Reactor*); AnPBR (*Anaerobic Packed-Bed Reactor*).

Tabela B5: Teste post-hoc de Games-Howell com Bootstrapping (95% IC BCa) para os valores de pH efluente dos reatores medidos no período de estabilidade.

| Comparação entre os reatores (grupos) – pH | | $\bar{X}_i - \bar{X}_j$ | Estimativas de Bootstrapping (95% IC BCa) | | |
|--|-----------------------|-------------------------|---|-----------------|-----------------|
| | | | Erro-padrão | Limite inferior | Limite superior |
| AnTR _(i) | AnSTBR _(j) | 1,016 | 0,125 | 0,772 | 1,268 |
| AnTR _(i) | AnPBR _(j) | 0,851 | 0,148 | 0,563 | 1,129 |
| AnSTBR _(i) | AnPBR _(j) | -0,165 | 0,083 | -0,365 | -0,025 |

Fonte: elaboração própria.

Legenda: \bar{X} (média aritmética).

Notas: valores em vermelho indicam que os grupos comparados apresentaram diferença significativa entre as médias.

Siglas: pH (potencial hidrogeniônico); AnTR (*Anaerobic Tubular Reactor*); AnSTBR (*Anaerobic Structured-Bed Reactor*); AnPBR (*Anaerobic Packed-Bed Reactor*).

Tabela B6: Teste post-hoc de Games-Howell com Bootstrapping (95% IC BCa) para as concentrações de ácido láctico na corrente efluente dos reatores medidas no período de estabilidade.

| Comparação entre os reatores (grupos) – HLa | | $\bar{X}_i - \bar{X}_j$ | Estimativas de Bootstrapping (95% IC BCa) | | |
|---|-----------------------|-------------------------|---|-----------------|-----------------|
| | | | Erro-padrão | Limite inferior | Limite superior |
| AnTR _(i) | AnSTBR _(j) | -86,128 | 64,039 | -224,533 | 57,327 |
| AnTR _(i) | AnPBR _(j) | -288,133 | 71,168 | -428,212 | -142,125 |
| AnSTBR _(i) | AnPBR _(j) | -202,004 | 46,272 | -285,563 | -117,578 |

Fonte: elaboração própria. Legenda: \bar{X} (média aritmética). Notas: valores em vermelho indicam que os grupos comparados apresentaram diferenças significativas entre as médias.

Siglas: HLa (concentração de ácido láctico); AnTR (*Anaerobic Tubular Reactor*); AnSTBR (*Anaerobic Structured-Bed Reactor*); AnPBR (*Anaerobic Packed-Bed Reactor*).

Tabela B7: Teste post-hoc de Tuckey com Bootstrapping (95% IC BCa) para as concentrações de ácido acético na corrente efluente dos reatores medidas no período de estabilidade.

| Comparação entre os reatores (grupos) – HAc | | $\bar{X}_i - \bar{X}_j$ | Estimativas de Bootstrapping (95% IC BCa) | | |
|---|-----------------------|-------------------------|---|-----------------|-----------------|
| | | | Erro-padrão | Limite inferior | Limite superior |
| AnTR _(i) | AnSTBR _(j) | -131,400 | 28,742 | -188,432 | -73,282 |
| AnTR _(i) | AnPBR _(j) | 7,384 | 15,889 | -22,952 | 35,133 |
| AnSTBR _(i) | AnPBR _(j) | 138,784 | 27,128 | 84,032 | 192,639 |

Fonte: elaboração própria. Legenda: \bar{X} (média aritmética). Notas: valores em vermelho indicam que os grupos comparados apresentaram diferenças significativas entre as médias.

Siglas: HAc (concentração de ácido acético); AnTR (*Anaerobic Tubular Reactor*); AnSTBR (*Anaerobic Structured-Bed Reactor*); AnPBR (*Anaerobic Packed-Bed Reactor*).

Tabela B8: Teste post-hoc de Games-Howell com Bootstrapping (95% IC BCa) para as concentrações de ácido propiônico na corrente efluente dos reatores medidas no período de estabilidade.

| Comparação entre os reatores (grupos) – HPr | | $\bar{X}_i - \bar{X}_j$ | Estimativas de Bootstrapping (95% IC BCa) | | |
|---|-----------------------|-------------------------|---|-----------------|-----------------|
| | | | Erro-padrão | Limite inferior | Limite superior |
| AnTR _(i) | AnSTBR _(j) | 27,118 | 4,625 | 18,927 | 35,563 |
| AnTR _(i) | AnPBR _(j) | 15,607 | 4,889 | 6,971 | 24,581 |
| AnSTBR _(i) | AnPBR _(j) | -11,510 | 1,788 | -15,336 | -7,848 |

Fonte: elaboração própria.

Legenda: \bar{X} (média aritmética). Notas: valores em vermelho indicam que os grupos comparados apresentaram diferenças significativas entre as médias.

Siglas: HPr (concentração de ácido propiônico); AnTR (*Anaerobic Tubular Reactor*); AnSTBR (*Anaerobic Structured-Bed Reactor*); AnPBR (*Anaerobic Packed-Bed Reactor*).

Tabela B6: Teste post-hoc de Tukey com Bootstrapping (95% IC BCa) para as concentrações de etanol na corrente efluente dos reatores medidas no período de estabilidade.

| Comparação entre os reatores (grupos) – EtOH | | $\bar{X}_i - \bar{X}_j$ | Estimativas de Bootstrapping (95% IC BCa) | | |
|--|-----------------------|-------------------------|---|-----------------|-----------------|
| | | | Erro-padrão | Limite inferior | Limite superior |
| AnTR _(i) | AnSTBR _(j) | 29,538 | 10,044 | 14,218 | 48,676 |
| AnTR _(i) | AnPBR _(j) | -8,998 | 11,929 | -29,169 | 14,340 |
| AnSTBR _(i) | AnPBR _(j) | -38,536 | 7,481 | -56,381 | -24,837 |

Fonte: elaboração própria.

Legenda: \bar{X} (média aritmética).

Notas: valores em vermelho indicam que os grupos comparados apresentaram diferenças significativas entre as médias.

Siglas: EtOH (concentração de etanol); AnTR (*Anaerobic Tubular Reactor*); AnSTBR (*Anaerobic Structured-Bed Reactor*); AnPBR (*Anaerobic Packed-Bed Reactor*).

Tabela B6: Teste post-hoc de Games-Howell com Bootstrapping (95% IC BCa) para as concentrações de ácido cítrico na corrente efluente dos reatores medidas no período de estabilidade.

| Comparação entre os reatores (grupos) – H2C | | $\bar{X}_i - \bar{X}_j$ | Estimativas de Bootstrapping (95% IC BCa)* | | |
|---|-----------------------|-------------------------|--|-----------------|-----------------|
| | | | Erro-padrão | Limite inferior | Limite superior |
| AnTR _(i) | AnSTBR _(j) | 6,601 | 3,675 | -0,173 | 13,047 |
| AnTR _(i) | AnPBR _(j) | -11,464 | 4,203 | -19,437 | -3,598 |
| AnSTBR _(i) | AnPBR _(j) | -18,066 | 2,855 | -23,830 | -12,316 |

Fonte: elaboração própria.

Legenda: \bar{X} (média aritmética).

Notas: valores em vermelho indicam que os grupos comparados apresentaram diferenças significativas entre as médias. *

Siglas: EtOH (concentração de etanol); AnTR (*Anaerobic Tubular Reactor*); AnSTBR (*Anaerobic Structured-Bed Reactor*); AnPBR (*Anaerobic Packed-Bed Reactor*).

Tabela B6: Teste post-hoc de Tukey com Bootstrapping (95% IC BCa) para as razões de H2-m/H2-t dos reatores no período de estabilidade.

| Comparação entre os reatores (grupos): H2-m/H2-t | | $\bar{X}_i - \bar{X}_j$ | Estimativas de Bootstrapping (95% IC BCa)* | | |
|--|-----------------------|-------------------------|--|-----------------|-----------------|
| | | | Erro-padrão | Limite inferior | Limite superior |
| AnTR _(i) | AnSTBR _(j) | -0,883 | 3,379 | -7,035 | 4,753 |
| AnTR _(i) | AnPBR _(j) | -9,048 | 4,190 | -17,545 | -1,963 |
| AnSTBR _(i) | AnPBR _(j) | -8,164 | 4,589 | -19,430 | 1,342 |

Fonte: elaboração própria.

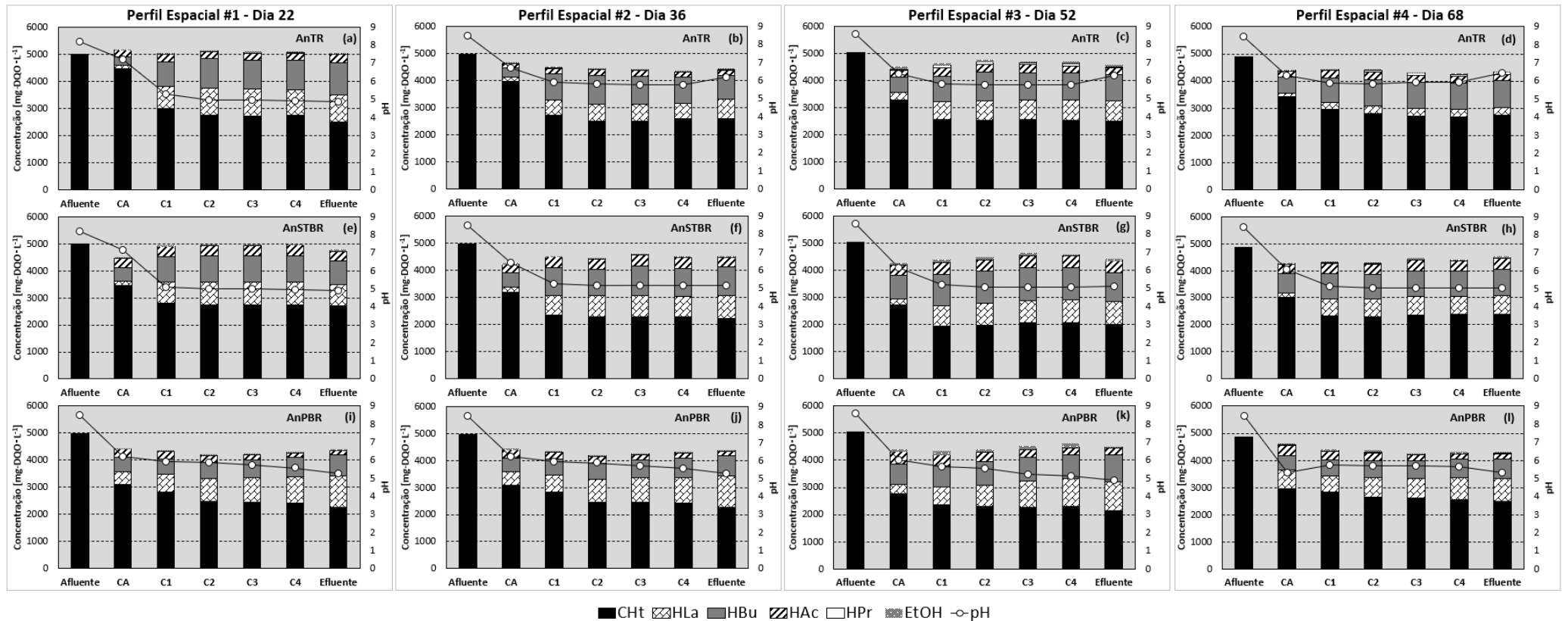
Legenda: \bar{X} (média aritmética).

Notas: valores em vermelho indicam que os grupos comparados apresentaram diferenças significativas entre as médias. *

Siglas: EtOH (concentração de etanol); AnTR (*Anaerobic Tubular Reactor*); AnSTBR (*Anaerobic Structured-Bed Reactor*); AnPBR (*Anaerobic Packed-Bed Reactor*).

APÊNDICE C:**Perfis espaciais de carboidratos totais e produtos metabólicos solúveis**

Figura AC1. Perfis espaciais de carboidratos totais e produtos metabólicos solúveis.

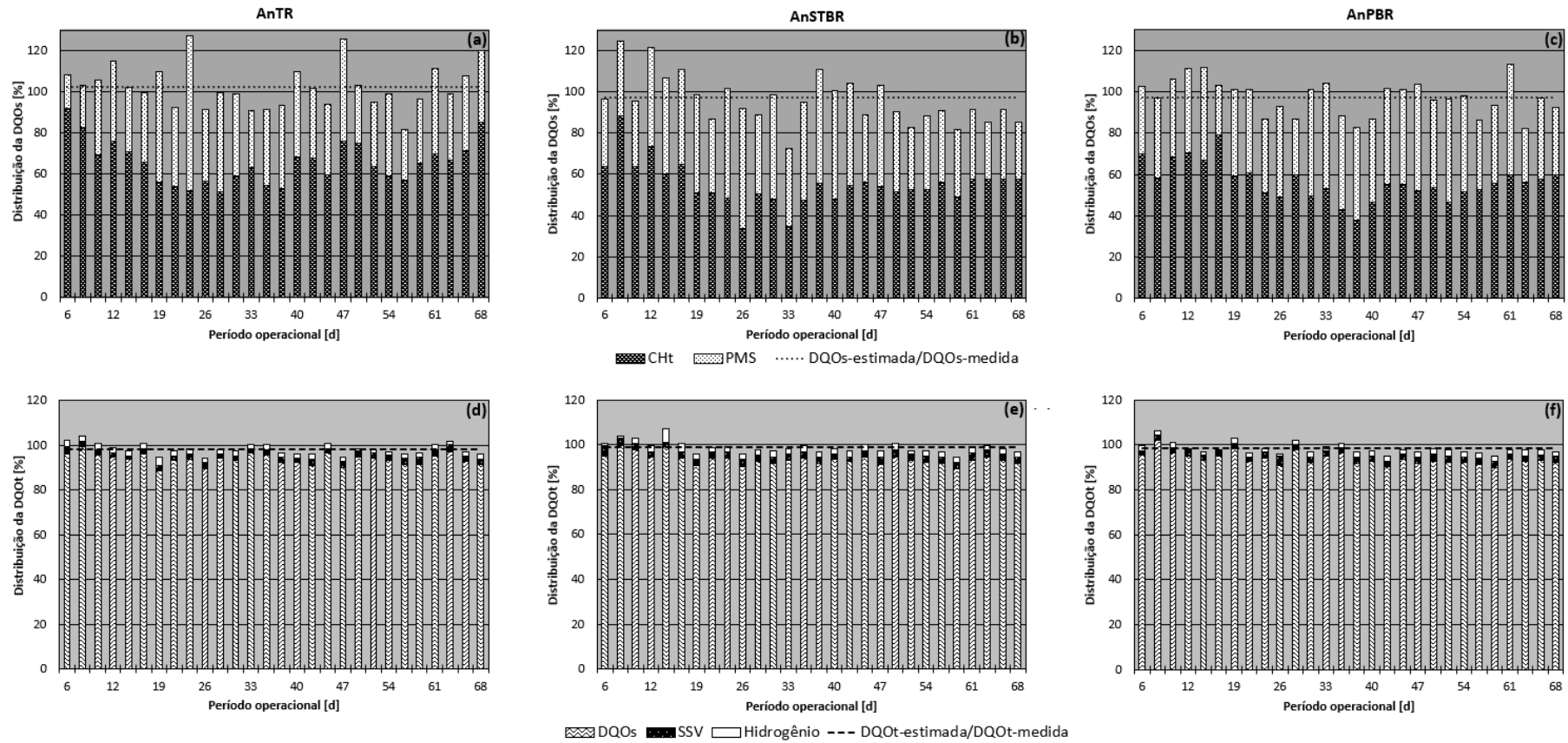


Nota: concentrações apresentadas em termos de equivalentes de demanda química de oxigênio (DQO).

Abreviaturas: CA-câmara de alimentação, compartimentos C1/C2/C3/C4 da zona de leito, Cht-carboidratos totais, HAC-ácido acético, HPr-ácido propiônico, HLa-ácido láctico, HBu-ácido butírico, EtOH-etanol, AnTR-reator anaeróbio tubular, AnSTBR-reator anaeróbio de leito estruturado, AnPBR-reator anaeróbio de leito empacotado.

APÊNDICE D:
Balanços de massa global e da fase solúvel

Figura AD1. Balanços de massa da fase solúvel (a, b, c) e balanços de massa global (d, e, f) do (a, d) AnTR, (b, e) AnSTBR e (c, f) AnPBR.



Abreviaturas: AnTR-reator anaeróbio tubular, AnSTBR-reator anaeróbio de leito-fixado estruturado, AnPBR-reator anaeróbio de leito-fixado empacotado, CA-câmara de alimentação, ZL-zona de leito, CHT-carboidratos totais, PMS-produtos metabólicos solúveis, DQOs -demanda química de oxigênio solúvel, DQOt-demanda química de oxigênio total, SSV-sólidos suspensos voláteis.



EESC • USP