

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO E ETANOL EM REATOR ANAERÓBIO DE LEITO
FLUIDIZADO: AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE TRÊS MATERIAIS SUPORTE
EM DIFERENTES CONDIÇÕES OPERACIONAIS**

Aruana Rocha Barros

São Carlos

2012

**PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO E ETANOL EM REATOR ANAERÓBIO DE
LEITO FLUIDIZADO: AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE TRÊS MATERIAIS
SUPORTE EM DIFERENTES CONDIÇÕES OPERACIONAIS**

Aruana Rocha Barros

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Silva

São Carlos

2012

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

B277ph

Barros, Aruana Rocha.

Produção de hidrogênio e etanol em reator anaeróbio de leito fluidizado : avaliação do desempenho de três materiais suporte em diferentes condições operacionais / Aruana Rocha Barros. -- São Carlos : UFSCar, 2012.
98 f.

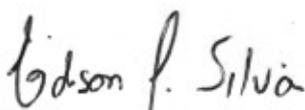
Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

1. Engenharia ambiental. 2. Fermentação. 3. Reatores anaeróbicos. 4. Produção de hidrogênio. 5. Produção de álcool. 6. Biofilme. I. Título.

CDD: 628 (20^a)

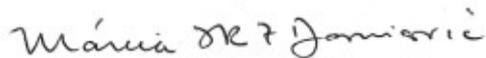
MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO DE **ARUANA ROCHA BARROS**, APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS EM 09 DE MARÇO DE 2012.

BANCA EXAMINADORA:


Edson Luiz Silva
Orientador / PPGEQ-UFSCar


Roberto de Campos Giordano
PPGEQ-UFSCar


Marlei Barboza Pasotto
DEQ/UFTM


Márcia H. R. Z. Damianovic
SHS/EESC/USP


Marcelo Zalat
SHS/EESC/USP

Aos meus amados pais Robson e Emília e a
minha irmã Jordana.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me iluminar e dar força e coragem nas horas mais difíceis.

Aos meus pais Robson e Emília, pelo amor, por sempre me apoiarem e me compreenderem.

A minha querida irmã e amiga Jordana, pelo amor, conselhos, broncas e risadas.

Ao Sérgio, pelo amor e respeito, compreensão nas horas fáceis e difíceis.

Ao Professor Dr. Edson Luiz Silva, pela oportunidade concedida e orientação.

Aos amigos do Laboratório de Controle Ambiental II: Cristiane, Paula, Samantha, Mariana e Eduardo, pela amizade, colaboração, momentos de descontração, paciência e companhia.

Ao técnico Oscar Silva, pela construção dos reatores e pela disposição em ajudar e solucionar problemas sempre que necessário.

Às grandes amigas do “Quarteto Fantástico e o Surfista Prateado”, Bruna, Ediane, Natália e Renata, que sempre estiveram ao meu lado, compartilhando alegrias e tristezas.

À Aike e à Fran, pela amizade, convivência, companhia e confidências.

Ao Departamento de Engenharia Química da UFSCar, pelas instalações e oportunidade concedida.

Ao Professor Dr. Marcelo Zaiat por permitir a utilização do medidor de hidrogênio, e pelas sugestões no exame de qualificação.

Ao Professor Dr. Roberto Giordano, pelas sugestões no exame de qualificação e pelo apoio concedido.

Aos Professores Dr. José Maria Bueno e Dra. Mônica Lopes Aguiar pelos conselhos e apoio concedidos durante a realização deste doutorado.

À Maria Ângela Adorno (Janja), pelo carinho, ensinamentos e colaboração na utilização do cromatógrafo.

Ao Daniel Fontes Lima por emprestar o medidor de hidrogênio para a realização deste trabalho e sempre disposição em ajudar.

Ao Senhor Nelson Gallo, pelas análises e microscopia eletrônica de varredura.

Ao técnico Carlinhos do Departamento de Engenharia de Materiais pelo fornecimento dos materiais suporte.

À EcoBalbo – reciclagem de pneus, pelo fornecimento do pneu triturado utilizado.

Ao grupo do Laboratório de Processos Biológicos do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC-USP, pela colaboração e ajuda nas análises.

Ao Professor Dr. Roberto Alves de Oliveira, da Universidade Estadual Paulista, campus de Jaboticabal, pelo fornecimento do lodo de suínos utilizado.

Aos alunos de iniciação científica Danilo, José Marcos e Lucas, e ao Gilberto por toda a ajuda prestada na parte experimental.

Aos amigos de São Carlos que me fizeram dar muitas risadas, ajudaram a reconhecer erros, respeitar diferenças e aprender bastante: Aike, Fran, Bruna, Ediane, Natália, Renata, Priscilinha, Lili, Japa, Diogo, Érika, Vivi, Jaque, Lulu, Ivana, Maísa, Hugo, Cris, Paula, Samantha, Mari, Ariany, Isabela, Bebel.

A todos os colegas de turma do doutorado, pela colaboração e momentos descontraídos.

Às funcionárias de limpeza do Departamento de Engenharia Química da UFSCar.

Ao CNPq e à FAPESP, pelo apoio financeiro concedido e pelo investimento no Laboratório de Controle Ambiental II do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos.

SUMÁRIO

LISTA FIGURAS	i
LISTA TABELAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
LISTA DE SÍMBOLOS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	05
2.1. Objetivo geral	05
2.2. Objetivos específicos	05
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	06
3.1. Digestão Anaeróbia	06
3.2. Produção Biológica de Hidrogênio	10
3.3. Rotas Fermentativas	11
3.4. Reator Anaeróbio de Leito Fluidizado	15
3.5. Material Suporte e Produção Biológica de Hidrogênio	17
3.6. Considerações finais sobre a revisão bibliográfica	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1. Reator anaeróbio de leito fluidizado	20
4.2. Água residuária e material suporte.....	22
4.3. Inóculo	27
4.5. Métodos analíticos	28
4.6. Avaliação dos dados experimentais	29

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1. Conversão de glicose.....	32
5.2. Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidizado	35
5.3. Metabólitos produzidos	49
5.4. Biomassa, carboidratos, proteínas e avaliação da adesão microbiana aos materiais suporte	61
5.5. Considerações finais	82
6. CONCLUSÕES	84
6.1. Sugestões para trabalhos futuros	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 – Esquema da digestão anaeróbia	09
Figura 3.2 – Fluxograma das diferentes rotas a partir da glicose	14
Figura 4.1 - Esquema da instalação do reator anaeróbio de leito fluidizado	21
Figura 4.2 – Partículas de poliestireno para utilização como suporte para imobilização da biomassa	23
Figura 4.3 – Partículas de pneu triturado para utilização como suporte para imobilização da biomassa	24
Figura 4.4 – Partículas de PET para utilização como suporte para imobilização da biomassa	24
Figura 4.5 – Metodologia utilizada para a estimativa da rugosidade da superfície das partículas	26
Figura 5.1 – Comparação da concentração média de glicose afluyente e conversão média de glicose no R1 (poliestireno), no R2 (pneu) e no R3 (PET), em diferentes TDH	33
Figura 5.2 – Comparação das produções volumétricas médias de H ₂ , em diferentes TDH no R1(poliestireno), no R2 (pneu) e no R3 (PET)	36
Figura 5.3 – Comparação dos rendimentos médios em diferentes TDH no R1 (poliestireno), no R2 (pneu) e no R3 (PET)	39
Figura 5.4 - Comparação do conteúdo de H ₂ no biogás médio em diferentes TDH no R1 (poliestireno), no R2 (pneu) e no R3 (PET)	42
Figura 5.5 – Comparação entre o pH afluyente médio e os pH efluentes médios no R1 (poliestireno), no R2 (pneu) e no R3 (PET) em diferentes TDH	46
Figura 5.6 – Concentração de ácidos acético (HAc), butírico (HBu), propiônico (HPr), etanol (EtOH) e metanol (MtOH) produzidos pelo reator anaeróbio de leito fluidizado	

contendo poliestireno como material suporte (R1) nos diferentes TDH	49
Figura 5.7 – Concentração dos ácidos acético (HAc), butírico (HBu), propiônico (HPr), etanol (EtOH) e metanol (MtOH) produzidos pelo reator anaeróbio de leito fluidizado contendo pneu inservível triturado como material suporte (R2) nos diferentes TDH	50
Figura 5.8 – Concentração dos ácidos acético (HAc), butírico (HBu), propiônico (HPr), etanol (EtOH) e metanol (MtOH) produzidos pelo reator anaeróbio de leito fluidizado contendo PET como material suporte (R3) nos diferentes TDH	51
Figura 5.9 - Rendimento de produção de etanol em função do TDH no R1 (poliestireno), no R2 (pneu) e no R3 (PET)	55
Figura 5.10 – Relação entre o rendimento de produção de H ₂ e o rendimento de produção de EtOH (Y _{H₂} /Y _{EtOH} – seletividade) nos três reatores para ambos os TDH	56
Figura 5.11 - Relação HAc/HBu, nos três reatores, em ambos os TDH	59
Figura 5.12 – Crescimento da biomassa aderida, rendimento de produção de hidrogênio e produção volumétrica de hidrogênio no R1 (poliestireno), em função do TDH	61
Figura 5.13 – Crescimento da biomassa aderida, rendimento de produção de hidrogênio e produção volumétrica de hidrogênio no R2 (pneu), em função do TDH	62
Figura 5.14 – Crescimento da biomassa aderida, rendimento de produção de hidrogênio e produção volumétrica de hidrogênio no R3 (PET), em função do TDH	62
Figura 5.15 – Massa de polímeros extracelulares excretados na forma de carboidratos por grama de partícula, rendimento de produção de hidrogênio e produção volumétrica de hidrogênio no poliestireno (R1), em função do TDH	65
Figura 5.16 – Massa de polímeros extracelulares excretados na forma de carboidratos por grama de partícula, rendimento de produção de hidrogênio e produção volumétrica de hidrogênio no pneu triturado (R2), em função do TDH	66

Figura 5.17 – Massa de polímeros extracelulares excretados na forma de carboidratos por grama de partícula, rendimento de produção de hidrogênio e produção volumétrica de hidrogênio no PET (R3), em função do TDH	66
Figura 5.18 – Massa de polímeros extracelulares excretados na forma de proteínas por grama de partícula, rendimento de produção de hidrogênio e produção volumétrica de hidrogênio no poliestireno (R1), em função do TDH	68
Figura 5.19 – Massa de polímeros extracelulares excretados na forma de proteínas por grama de partícula, rendimento de produção de hidrogênio e produção volumétrica de hidrogênio no pneu triturado (R2), em função do TDH	69
Figura 5.20 – Massa de polímeros extracelulares excretados na forma de proteínas por grama de partícula, rendimento de produção de hidrogênio e produção volumétrica de hidrogênio no PET (R3), em função do TDH	69
Figura 5.21 - Comparação da concentração média de DQO afluente e eficiência média de DQO no R1 (poliestireno), no R2 (pneu) e no R3 (PET), em diferentes TDH	71
Figura 5.22 - Microscopia eletrônica de varredura dos microrganismos aderidos no poliestireno (R1) no TDH de 8 h (a) e no TDH de 2 h (b), com presença de bacilos, indicados por setas em vermelho, que são morfologias semelhantes à <i>Clostridium sp.</i> (aumento: 3000 x)	78
Figura 5.23 - Microscopia eletrônica de varredura dos microrganismos aderidos no pneu inservível triturado (R2) no TDH de 8 h (aumento: 1000 x) (a) e no TDH de 2 h (aumento: 5000 x) (b), com presença de bacilos, indicados por setas em vermelho, que são morfologias semelhantes à <i>Clostridium sp.</i>	78

Figura 5.24 - Microscopia eletrônica de varredura dos microrganismos aderidos no PET (R3) no TDH de 8 h (aumento: 5000 x) (a) e no TDH de 2 h (aumento: 3000 x) (b), com presença de bacilos, indicados por setas em vermelho, que são morfologias semelhantes à <i>Clostridium sp.</i>	79
Figura 5.25 – Porcentagem filogenética dos clones para um domínio Bacteria em um consórcio microbiano (BARROS et al., 2011)	81
Figura 5.26 - Árvore filogenética baseada em sequências obtidas a partir de uma amostra de biomassa aderida ao material de suporte (pneu triturado) alimentado com glicose para a produção de hidrogênio. Os valores presentes nos nós da árvore indicam percentagens de ramos recorrentes (1000 bootstraps para reamostragem). <i>Methanosarcina mazei</i> foi empregado como grupo externo (BARROS et al., 2011)	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Composição da água residuária sintética utilizada	22
Tabela 4.2 - Dimensão, densidade, velocidade de mínima fluidização e rugosidade para as partículas utilizadas	25
Tabela 4.3 – Frequência de coleta e análise de amostras para todas as fases de operação ..	30
Tabela 5.1 - Resultados médios obtidos e seus respectivos desvios, para cada faixa de TDH aplicado no R1 (poliestireno), no R2 (pneu) e no R3 (PET)	34
Tabela 5.2 – Resultados médios obtidos de PVH e seus respectivos desvios, para cada faixa de TDH aplicado no R1 (poliestireno), no R2 (pneu) e no R3 (PET)	37
Tabela 5.3 – Resultados médios obtidos de RPH e seus respectivos desvios, para cada faixa de TDH aplicado no R1 (poliestireno), no R2 (pneu) e no R3 (PET)	40
Tabela 5.4 – Resultados médios obtidos de conteúdo de hidrogênio e gás carbônico e seus respectivos desvios, para cada faixa de TDH aplicado no R1 (poliestireno), no R2 (pneu) e no R3 (PET)	43
Tabela 5.5 - Porcentagem média de DQO removida e seus respectivos desvios padrões para o R1 (poliestireno), o R2 (pneu) e o R3 (PET) nos TDH aplicados	72
Tabela 5.6 – Concentrações de ácidos acético, butírico, propiônico, lático, etanol, glicose efluente e biomassa no reator com poliestireno como material suporte (R1)	73
Tabela 5.7 – Concentrações de ácidos acético, butírico, propiônico, lático, etanol, glicose efluente e biomassa no reator com pneu triturado como material suporte (R2)	74
Tabela 5.8 – Concentrações de ácidos acético, butírico, propiônico, lático, etanol, glicose efluente e biomassa no reator com PET como material suporte (R3)	74
Tabela 5.9 – DQO teórica dos metabólitos, DQO da biomassa e DQO efluente medida no reator com poliestireno como material suporte (R1)	75

Tabela 5.10 – DQO teórica dos metabólitos, DQO da biomassa e DQO efluente medida no reator com pneu triturado como material suporte (R2)	76
Tabela 5.11 – DQO teórica dos metabólitos, DQO da biomassa e DQO efluente medida no reator com PET como material suporte (R3)	76

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Adenosina-tri-fosfato	
CSTR	Reator Contínuo de Tanque Agitado (Continuous-Stirred Tank-Reactor)	
DQO	Demanda Química de Oxigênio	(mg.L ⁻¹)
EGSB	Reator de Leito Granular Expandido (Expanded Granular Sludge Bed)	
EtOH	Etanol	
HAc	Ácido Acético	
HBu	Ácido Butírico	
HPr	Ácido Propiônico	
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura	
MtOH	Metanol	
PET	Politereftalato de Etileno	
PS	Poliestireno	
PVH	Produção Volumétrica de Hidrogênio	(L.h ⁻¹ .L ⁻¹)
RALF	Reator Anaeróbio de Leito Fluidizado	
RALFDT	Reator Anaeróbio de Leito Fluidizado com Tubo Draft	
RPH	Rendimento de Produção de Hidrogênio	(mol H ₂ /mol glicose)
SST	Sólidos Suspensos Totais	(mg.L ⁻¹)
SSV	Sólidos Suspensos Voláteis	(mg.L ⁻¹)
SVT	Sólidos Voláteis Totais	(mg.L ⁻¹)
TDH	Tempo de Detenção Hidráulica	(h)
UASB	Reator Anaeróbio de Manta de Lodo	

UNESP Universidade Estadual Paulista

LISTA DE SÍMBOLOS

C_g	Concentração de Glicose	(mg.L ⁻¹)
D_p	Dimensão da Partícula	(mm)
H_0	Altura inicial do Leito no Reator de Leito Fluidizado	(cm)
m	Massa do Leito de partículas	(g)
Q_r	Vazão de Recirculação	(L.h ⁻¹)
V_{mf}	Velocidade Mínima de fluidização	(cm.s ⁻¹)
ρ_p	Densidade da partícula	(g.cm ⁻³)

RESUMO

A produção de hidrogênio e etanol usando microrganismos é uma promissora área de desenvolvimento tecnológico a partir de uma ampla variedade de fontes renováveis e uma das alternativas para esta produção é a utilização do reator anaeróbio de leito fluidizado (RALF). Desta maneira, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de diferentes materiais suporte (poliestireno - R1, pneu inservível triturado - R2 e PET - R3) visando à produção de hidrogênio e etanol utilizando três reatores anaeróbios de leito fluidizado. Cada reator possuía um volume total de 4192 cm^3 , alimentado com meio contendo glicose como fonte de carbono (4000 mg.L^{-1}), com tempo de detenção hidráulica (TDH) entre 8 e 1 h a uma temperatura entre 20 e 25°C , com tratamento térmico do inóculo, utilizando culturas mistas. Para produção de hidrogênio, o melhor desempenho foi do R2, apresentando melhor rendimento de H_2 ($2,11 \text{ mol-H}_2.\text{mol}^{-1}\text{-glicose}$) e melhor conteúdo de H_2 no biogás (60%). Os metabólitos solúveis predominantes em todos os reatores foram ácidos acético e butírico e etanol, havendo uma pequena produção de ácido propiônico, sendo o R2 o que mais produziu ácidos acético e butírico (434,74 e 1013,61 mg/L, respectivamente). Entretanto, o R3 apresentou um melhor desempenho para produção de etanol ($2,43 \text{ mol-EtOH.mol}^{-1}\text{-glicose}$). Assim, pode-se afirmar que foi possível produzir simultaneamente hidrogênio e etanol como biocombustíveis.

Palavras-chave: Fermentação ácida, reator anaeróbio de leito fluidizado, produção de hidrogênio, produção de etanol, material suporte, poliestireno, pneu, PET.

ABSTRACT

Hydrogen and ethanol production using microorganisms is a promising area of technological development from a wide variety of renewable and alternative to this production is the use of anaerobic fluidized bed reactor (AFBR). One of the factors that most influence the performance of the AFBR is the material support, which must provide abrasion resistance, porous surface conducive to colonization by microorganisms, easy to achieve fluidization and ability to promote mass transfer between the medium and biofilm. Thus, the objective of this study was to evaluate the influence of different support materials (polystyrene - R1, grounded tire - R2 and polyethylene terephthalate (PET) - R3) on producing hydrogen and ethanol using three anaerobic fluidized bed reactors. Each reactor had a total volume of 4192 cm³ and was fed with media containing glucose as the carbon source (4000 mg L⁻¹) with an influent pH around 5.0 and an effluent pH of about 3.5, a hydraulic retention time (HRT) of 8 – 1 h at a temperature of 23 ± 2 °C, with thermal treatment of the inoculum. For hydrogen production, the best performance was achieved with R2 (2.11 mol H₂ mol⁻¹ glucose), providing the highest H₂ content in biogas (60%). In all reactors, the predominant soluble metabolites were acetic acid, butyric acid, lactic acid and ethanol, with small amounts of propionic acid. The reactor R2 produced more acetic and butyric acid (434.74 and 1013.61 mg L⁻¹, respectively). However, reactor R3 showed a better performance for ethanol production (1941.78 mg L⁻¹).

Keywords: Acid fermentation, hydrogen production, ethanol production, anaerobic fluidized bed reactor; support material, polystyrene, grounded tire, PET.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

As alterações climáticas antropogênicas e a redução das reservas dos combustíveis fósseis são um desafio que está conduzindo a pesquisas em fontes alternativas de energia (HALLENBECK e GHOSH, 2009) e uma atraente possibilidade é a utilização do processo biológico para produzir biocombustível, como hidrogênio e etanol. Na co-produção de etanol e H₂, importantes quantias de ambos podem ser obtidas (KOSKINEN et al., 2008). Esses processos são promissores e possuem grande potencial de se tornarem alternativas aos combustíveis fósseis (WU et al., 2007).

O hidrogênio possui o maior conteúdo de energia por unidade de peso que qualquer outro combustível conhecido (142 kJ.g⁻¹ ou 61.000 Btu.lb⁻¹), pode ser transportado para uso doméstico e industrial e é hoje universalmente aceito como um carreador de energia ambientalmente segura, que não contribui para o efeito estufa (DAS e VERZIROGLU, 2008).

De acordo com Das e Verziroglu (2008), na produção de hidrogênio por fermentação, a glicose é inicialmente convertida a piruvato pela via glicolítica e este oxidado a acetil-CoA, que pode ser convertido em acetil fosfato, resultando na geração de ATP e acetato. A oxidação do piruvato a acetil-CoA exige a redução do ferredoxin (Fd). Fd reduzido é oxidado pela hidrogenase que gera Fd (ox) e libera elétrons para produzir hidrogênio. A produção de hidrogênio e etanol usando microrganismos é uma promissora área de desenvolvimento tecnológico a partir de uma ampla variedade de fontes renováveis, por exemplo, fontes que contenham açúcar, como de beterraba e resíduos de açúcar de indústrias, com amido, como batata e trigo, e de celulose, como *Miscanthus* (KOSKINEN et al., 2008). As espécies principais identificadas como responsáveis pela produção biológica de hidrogênio durante a

acidogênese dos carboidratos são: *Enterobacter*, *Bacillus* e *Clostridium* (HAWKES et al., 2002) e *Clostridium* para a co-produção de H₂ e etanol (KOSKINEN et al., 2008).

De acordo com Ren et al. (2007), podem ocorrer três tipos de fermentação: fermentação que produz ácido burtírico, fermentação etanólica e fermentação ácido propiônico. A fermentação que produz ácido butírico ocorre quando a maior parte dos produtos gerados na fermentação acidogênica são ácidos butírico e acético (REN et al., 2007) e é a mais favorável para a produção de hidrogênio, pois para a geração de 1 mol de ácido acético a partir da fermentação de glicose, são produzidos 4 mols de hidrogênio e para geração de 1 mol de ácido butírico, são produzidos 2 mols de hidrogênio. Já na fermentação etanol, os produtos líquidos gerados são principalmente etanol e ácido acético (REN et al., 2007). E por fim, na fermentação que produz ácido propiônico, este ácido é convertido a metano e acumula no reator no processo fermentativo (REN et al., 2007).

Dentre os reatores anaeróbios de alta taxa utilizados para a produção biológica de hidrogênio, ou seja, os reatores que são operados com baixos tempos de detenção hidráulica, há o reator anaeróbio de leito fluidizado (RALF). Em RALF, o filme microbiano é retido por meio da adesão natural dos microrganismos às partículas de suportes sólidos, sendo que o material suporte é sua variável mais significativa (KIDA et al., 1990). Sendo assim, é interessante utilizar materiais suporte que além de possuírem baixa densidade, baixo custo e serem de fácil aquisição, possam contribuir para solucionar o grave problema ambiental atual da geração de resíduos sólidos e sua destinação inadequada. Materiais suporte poliméricos como poliestireno, pneu inservível e PET, além de serem leves e de fácil aquisição, podem ser reusados, diminuindo a quantidade de lixo em aterros sanitários. Também minimizam a energia necessária para a fluidização em RALF.

Alguns estudos têm mostrado que os produtos da fermentação dependem do tipo de substrato usado e das condições operacionais do reator, como tempo de detenção hidráulica

(TDH), temperatura e pH . O pH, em particular, tem a maior influência na composição efluente do reator acidogênico (REN et al., 1997). Conforme Wang e Wan (2009), é um importante fator que influencia a produção de hidrogênio, pois pode afetar a atividade da hidrogenase assim como a rota metabólica. Segundo van Ginkel et al. (2001), Fang e Liu (2002), Li et al. (2008), Aceves-Lara et al. (2008) o pH ótimo para produção de hidrogênio é entre 5,5 e 6,0. O pH entre 6,0 e 6,5 pode produzir um excessivo rendimento de ácido propiônico, entretanto, para pH menor que 4,5, há produção de H₂, CO₂, ácidos acético e butírico e etanol (REN et al. 1997). Na literatura, há resultados contraditórios quanto ao pH ótimo para a produção de hidrogênio, e uma possível razão para falta de consenso nesses estudos é o tipo de inóculo utilizado, substrato e faixa de pH estudados (WANG e WAN, 2009). Assim, observa-se que o valor do pH conduz à rota de produção do metabólitos líquidos e gasosos produzidos.

Outro aspecto importante na produção biológica de hidrogênio é o controle ou não do pH, pois a utilização de alcalinizantes, como bicarbonato, por exemplo, para este controle gera um custo a mais e encarece o processo. Na literatura há resultados paradoxais, como por exemplo, Barros et al. (2010), com glicose como fonte de carbono, utilizaram poliestireno e argila expandida como materiais suporte e alcalinizante para controle do pH, redução de TDH de 8 para 2 h e obtiveram uma alta produção de hidrogênio (1,90 e 2,59 mol H₂.mol⁻¹ glicose, respectivamente) e uma baixa produção de etanol (1,96 e 4,35 mM, respectivamente) para ambos os suportes. Amorim et al. (2009) e Shida et al. (2009), também com glicose como fonte de carbono e argila expandida como material suporte e sem utilização de alcalinizante e redução de TDH de 8 para 2 h, também alcançaram uma alta produção de hidrogênio (2,49 e 2,29 mol H₂.mol⁻¹ glicose, respectivamente) e uma baixa produção de etanol (1,86 e 1,18 mM, respectivamente). Abreu et al. (2009), com arabinose como fonte de carbono e reator em batelada e uso de alcalinizante para controle do pH, observaram uma baixa produção de

hidrogênio ($0,8 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$ arabinose consumida) e uma alta produção de etanol (197,43 mM). Entretanto, Wu et al. (2007), em reator anaeróbio de leito fluidizado, com elastômero polietileno-octano como suporte, controle de pH, em torno de 6,0, e glicose como fonte de carbono, conseguiram obter simultaneamente uma alta produção de hidrogênio ($1,04 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$ hexose) e etanol (20,43 mM), apesar das rotas para produção desses biocombustíveis serem competitivas. Então pode-se constatar, que é possível produzir hidrogênio e etanol simultaneamente.

Em face ao exposto, este trabalho visou estudar a produção biológica simultânea de hidrogênio e etanol em reatores anaeróbios de leito fluidizado, sem adição de alcalinizante para o controle de pH, que foi em torno de 3,5, usando como substrato a água residuária sintética com uma concentração de $4000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de glicose como fonte de carbono, com a redução de TDH de 8 para 1 h, em uma temperatura de 20 - 25°C, com diferentes materiais suporte (poliestireno, pneu inservível triturado e PET).

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência dos materiais suporte para a produção biológica de hidrogênio e etanol em reator anaeróbio de leito fluidizado (RALF) sem o controle do pH, a partir da fermentação da glicose, utilizando consórcios de microrganismos anaeróbios com potencial de produzir hidrogênio.

2.2. Objetivos específicos

Os objetivos específicos foram:

- a) Avaliar o tempo de detenção hidráulica (TDH) na produção biológica de hidrogênio e etanol para cada material suporte.
- b) Qualificar e quantificar os álcoois e os ácidos orgânicos voláteis produzidos e relacionar essa produção com a produção de hidrogênio e etanol com os materiais suporte.

CAPÍTULO 3

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo serão abordados aspectos sobre o hidrogênio, a produção biológica de hidrogênio, as rotas fermentativas de produção de hidrogênio, parâmetros que influenciam a produção de hidrogênio, como: pH, temperatura e tempo de detenção hidráulica (TDH), tipo de inóculo, fonte de carbono. Também serão enfocados os materiais suporte estudados neste trabalho: poliestireno, pneu inservível triturado e PET.

Inicialmente haverá uma breve introdução a respeito de digestão anaeróbia, havendo, posteriormente, a descrição sobre a produção biológica deste gás.

No item sobre as rotas fermentativas de produção de hidrogênio serão descritas as principais rotas que levam à formação de hidrogênio e etanol, como por exemplo: a rota dos ácidos acético, butírico e propiônico e do etanol.

Sobre os parâmetros que influenciam a produção biológica de hidrogênio, procurou-se dar ênfase aos principais parâmetros avaliados neste estudo, como por exemplo: o efeito do controle de pH, TDH e material suporte.

Com relação aos aspectos referentes ao reator anaeróbio de leito fluidizado, são mostrados os aspectos positivos e negativos dessa tecnologia e as características dos materiais suporte.

3.1. Digestão Anaeróbia

A Figura 3.1 ilustra o processo de digestão anaeróbia, que consiste em cinco fases: hidrólise, acidogênese, acetogênese, metanogênese e sulfetogênese.

Na hidrólise, materiais particulados complexos (polímeros) são transformados em materiais dissolvidos mais simples (moléculas menores), e podem atravessar as paredes celulares das bactérias fermentativas, que é feita através de exoenzimas excretadas pelas bactérias fermentativas hidrolíticas.

Na acidogênese, os produtos oriundos da fase hidrolítica são metabolizados no interior das células das bactérias fermentativas, sendo em diversos compostos mais simples, que são então excretados pelas células. Os compostos produzidos incluem ácidos graxos voláteis, álcoois, ácido lático, gás carbônico, hidrogênio, além de novas células bacterianas. Como os ácidos graxos voláteis são o principal produto dos organismos fermentativos, estes são usualmente designados de bactérias fermentativas acidogênicas.

A acidogênese é efetuada por um grande e diverso grupo de bactérias fermentativas, como por exemplo, *Clostridium* e *Bacteroids*. As primeiras constituem uma espécie anaeróbia que forma esporos, podendo desta forma, sobreviver em ambientes totalmente adversos. As bacteroids encontram-se comumente presentes nos tratos digestivos, participando da degradação de açúcares e aminoácidos. A maioria das bactérias acidogênicas são anaeróbias estritas, mas cerca de 1% consiste de bactérias facultativas que podem oxidar o substrato orgânico por via oxidativa. Isso é particularmente importante, uma vez que as bactérias estritas são protegidas contra a exposição ao oxigênio eventualmente presente no meio (VAN HAANDEL e LETTINGA, 1996).

Na acetogênese, as bactérias acetogênicas são responsáveis pela oxidação dos produtos gerados na fase acidogênica em substrato apropriado para as bactérias metanogênicas. Dessa forma, as bactérias acetogênicas fazem parte de um grupo metabólico intermediário que produz substrato para as metanogênicas. Os produtos gerados pelas bactérias acetogênicas são o hidrogênio, o dióxido de carbono e o acetato. Durante a formação dos ácidos acético e propiônico, uma grande quantidade de hidrogênio é formada, fazendo

com que o valor do pH no meio aquoso decresça. De todos os produtos metabolizados pelas bactérias acidogênicas, apenas o hidrogênio e o acetato podem ser utilizados diretamente pelas metanogênicas. Porém pelo menos 50% da DQO biodegradável é convertida em propionato e butirato, que são posteriormente decompostos em acetato e hidrogênio pela ação das bactérias acetogênicas (VAN HAANDEL e LETTINGA, 1996).

Ainda segundo os mesmos autores, a metanogênese é a etapa final no processo global de degradação anaeróbia de compostos orgânicos em metano e dióxido de carbono e é efetuada pelas bactérias metanogênicas. As metanogênicas utilizam somente um limitado número de substratos, compreendendo ácido acético, hidrogênio/dióxido de carbono, ácido fórmico, metanol, metilaminas e monóxido de carbono. Em função de sua afinidade por substrato e magnitude de produção de metano, as metanogênicas são divididas em dois grupos principais, um que forma metano a partir de ácido acético ou metanol (acetoclásticas), e o segundo que produz metano a partir de hidrogênio e dióxido de carbono (hidrogenotróficas).

Despejos que contenham compostos de enxofre são submetidos à fase de sulfetogênese (redução de sulfato e formação de sulfetos). A produção de sulfetos é um processo em que o sulfato e outros compostos a base de enxofre são utilizados como aceptores de elétrons durante a oxidação de compostos orgânicos. Durante este processo, sulfato, sulfito e outros compostos sulfurados são reduzidos a sulfeto, através da ação de um grupo de bactérias anaeróbia, denominadas bactérias redutoras de sulfato (ou bactérias sulforedutoras). As bactérias sulforedutoras são consideradas um grupo muito versátil de microrganismos, capazes de utilizar uma ampla gama de substratos, incluindo toda a cadeia de ácidos graxos voláteis, diversos ácidos aromáticos, hidrogênio, metanol, etanol, glicerol, açúcares, aminoácidos, e vários compostos fenólicos. As bactérias sulforedutoras dividem-se em dois grandes grupos: bactérias sulforedutoras que oxidam seus substratos de forma incompleta até

o acetato e bactérias sulforedutoras que oxidam seus substratos completamente até o gás carbônico.

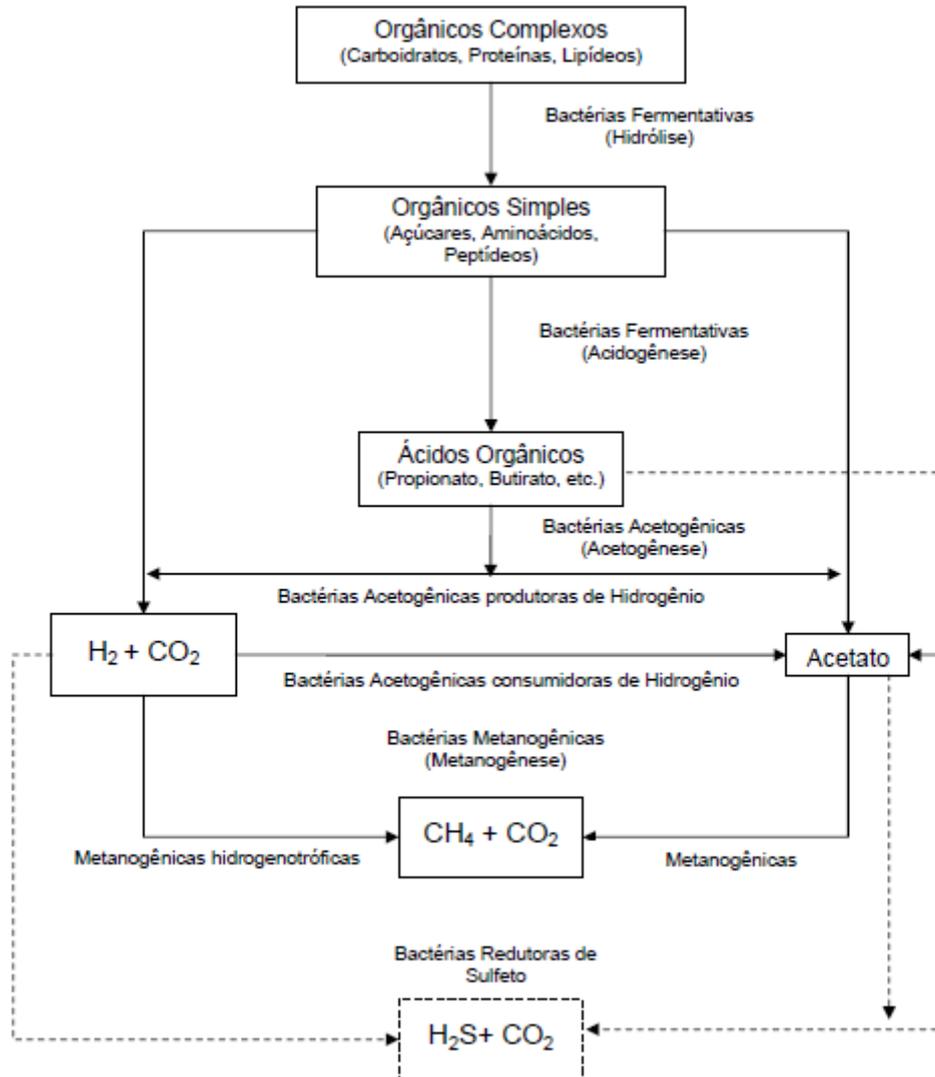


Figura 3.1 – Esquema da digestão anaeróbica (Fonte: HAPER e POLAND, 1986).

Neste trabalho, a produção de hidrogênio foi realizada a partir da interrupção da digestão anaeróbica na fase de acetogênese. Para o tratamento completo do resíduo, seria necessário o resíduo líquido gerado na produção de hidrogênio ser novamente degradado, em uma digestão anaeróbica completa.

3.2. Produção Biológica de Hidrogênio

A produção biológica de hidrogênio tem se destacado por constituir uma alternativa menos agressiva ao ambiente, pois utiliza matérias-primas renováveis no processo, o que lhe confere a vantagem de se realizar independentemente da disponibilidade de combustíveis fósseis que, quando empregados, contribuem para o aumento da concentração de gases do efeito-estufa decorrentes da sua combustão (PEIXOTO, 2008).

A produção biológica de hidrogênio pode ser feita por meio da fotossíntese: biofotólise (algas verdes e cianobactérias) e fotodecomposição de compostos orgânicos (bactérias fotossintetizantes); e através da fermentação: fermentação de compostos orgânicos (bactérias fermentativas) (DAS e VEZIROGLU, 2001).

O processo fermentativo de compostos orgânicos para produção de hidrogênio é obtido por bactérias fermentativas em que o H_2 é liberado pela ação de hidrogenases como meio de eliminar os elétrons gerados durante a degradação de carboidratos. Estas bactérias possuem alta velocidade de produção de H_2 e o podem produzir constantemente, durante o dia e a noite, crescendo e se multiplicando rápido para fornecer microrganismos para o sistema de produção (DAS e VEZIROGLU, 2001). Essas bactérias são classificadas em proteolíticas e sacarolíticas. Neste processo, pode-se utilizar uma ampla variedade de fontes de carbono, como glicose, amido, sacarose, xilose, entre outros. Também há a vantagem de se produzir hidrogênio o dia todo e não necessitar de iluminação.

De acordo com Das e Verziroglu (2001), a principal grupo de bactérias para produção de hidrogênio identificadas até o presente são: *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium pasteurianum*, *Desulfovibrio vulgaris*, *Magashaera elsdenii*, *Citrobacter intermedius* e *Escherichia coli*. O rendimento de hidrogênio a partir de

espécies *Clostridium* é geralmente maior que aquele obtido por bactérias aeróbias facultativas como *Enterobacter* sp. (HAWKES et al., 2002). Além de culturas puras, diversas microfloras e coculturas mistas também vêm sendo estudadas para a produção de hidrogênio a partir de carboidratos (NADI e SENGUPTA, 1998; DAS e VERZIROGLU, 2001; LEVIN et al., 2004).

Ren et al. (2007) constataram que microrganismos como *Clostridium* sp. são mais favoráveis para a produção de ácido butírico e hidrogênio, *Propionibacterium* sp. para produção de ácido propiônico e *Bacteriodes* sp. para produção de etanol. No entanto, a busca do microrganismo ideal para a produção de hidrogênio a partir de diversas fontes de matéria orgânica tem sido um dos principais alvos dos pesquisadores.

3.3. Rotas Fermentativas

Ao se dividir o processo de digestão anaeróbia em acidogênese e metanogênese, verifica-se que a obtenção de hidrogênio só é possível se o processo for interrompido na acidogênese, pois este gás se caracteriza como um intermediário do processo, sendo produzido na acidogênese e consumido na metanogênese ou na redução de sulfeto.

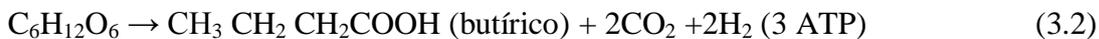
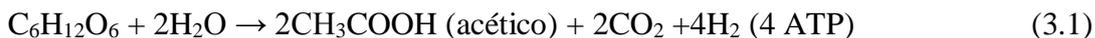
De acordo com Mosey (1983), existem quatro grupos principais de microrganismos envolvidos na conversão da glicose para gás carbônico e metano na digestão anaeróbia. O grupo consiste de bactérias acidogênicas, bactérias acetogênicas, arqueias metanogênicas acetoclásticas e arqueias metanogênicas hidrogenotróficas.

Harper e Pohland (1986) reconhecem nove etapas do processo, cada uma mediada por um grupo específico de microrganismos. As etapas consistem de: (a) hidrólise de polímeros orgânicos e monômeros como os açúcares, ácidos orgânicos e aminoácidos; (b) conversão de monômeros orgânicos a hidrogênio, bicarbonato, ácido acético, ácido propiônico, ácido

butírico, etanol e ácido láctico; (c) oxidação de produtos orgânicos reduzidos a hidrogênio, bicarbonato e ácido acético por bactérias acetogênicas produtoras de hidrogênio; (d) respiração homoacetogênica de bicarbonato pelas bactérias homoacetogênicas; (e) oxidação de produtos orgânicos reduzidos a acetato pelas bactérias redutoras de nitrato e sulfato; (f) oxidação de acetato a bicarbonato pelas bactérias redutoras de nitrato e sulfato; (g) oxidação de hidrogênio pelas bactérias redutoras de nitrato e sulfato; (h) fermentação metanogênica acetoclástica; (i) respiração metanogênica do hidrogênio.

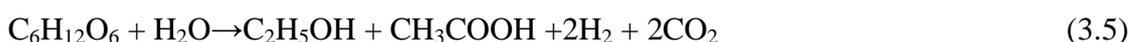
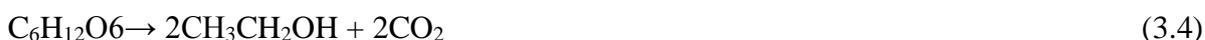
Em estudos realizados por Lay et al. (1999) e Ueno et al. (1995) as bactérias acidogênicas do gênero *Clostridium* foram estudadas devido à sua habilidade para formar esporos e pelo seu potencial de gerar o gás hidrogênio. Os *Clostridium* são classificados como proteolítica ou sacarolítica, dependendo dos tipos de substratos que fermentam. As acidogênicas proteolíticas degradam proteínas ou aminoácidos. As bactérias acidogênicas sacarolíticas fermentam os carboidratos e são estudadas extensamente por causa de sua habilidade de produzir hidrogênio em alto nível de produção. Por exemplo, Maintinguer et al. (2008) estudaram a utilização de consórcio de bactérias a partir do inóculo tratado termicamente de um reator UASB que tratava resíduos de matadouros e sacarose como fonte de carbono para a produção de hidrogênio, em reator em batelada e controle de pH. Através de microbiologia molecular, contataram que o consórcio microbiano continha *Enterobacter cloacae*, *Clostridium* sp. e *Clostridium acetobutyricum*, conhecidos como produtores de hidrogênio e ácidos voláteis.

A geração de ácido acético e hidrogênio, necessários para o equilíbrio da fermentação metanogênica, ocorre no primeiro estágio da digestão anaeróbia, denominado acidogênese (SHIDA, 2008). A hidrólise da glicose pelas bactérias acidogênicas, de mais rápido crescimento, geram os ácidos acético, butírico e propiônico, de acordo com as reações:



Mosey (1983) cita que a reação de conversão de glicose para ácido acético ocorre preferencialmente, uma vez que essa reação fornece às bactérias acidogênicas um maior rendimento de energia para o crescimento, além de prover substrato ao grupo posterior, das arqueias metanogênicas acetoclásticas, para a produção de metano. As demais reações, de formação de ácido butírico e propiónico são as respostas das bactérias à acumulação de hidrogênio durante sobrecargas. O desvio do metabolismo da glicose em direção ao ácido butírico reduz tanto a produção de hidrogênio quanto o teor de ácido no sistema. A formação de ácido propiónico requer o consumo de hidrogênio e, assim, há o controle do potencial redox durante as sobrecargas.

Na formação de etanol nenhum hidrogênio é consumido ou produzido. A equação 3.4 mostra a reação de formação do etanol, de acordo com a rota clássica. Entretanto, há uma rota de produção de etanol alternativa em que também é possível a produção de 2 moles de hidrogênio e 1 mol de etanol [Equação (3.5)].



A Figura 3.2 apresenta as diferentes rotas metabólicas presentes nesse estudo.

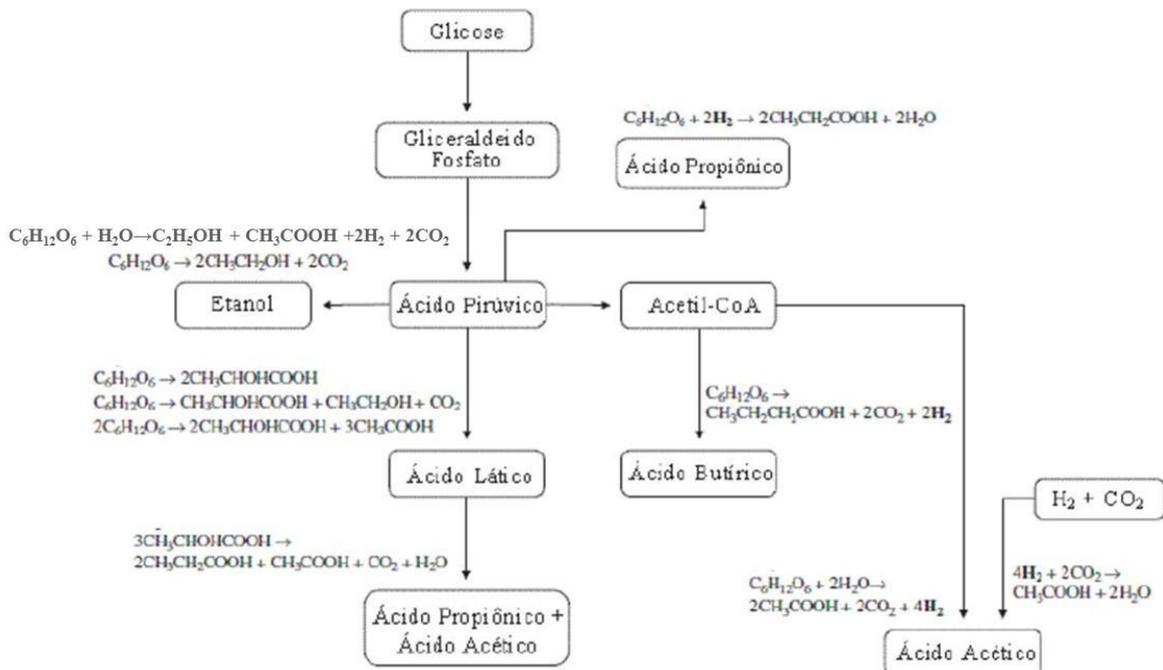


Figura 3.2 – Fluxograma das diferentes rotas a partir da glicose (Fonte: Adaptado de ANTONOPOULOU et al., 2008).

Sendo assim, o rendimento de produção de hidrogênio por culturas em sistemas contínuos pode variar entre 0,7 a 4,0 mol-H₂.mol⁻¹-glicose dependendo da comunidade bacteriana (tipo de inóculo, cultura pura ou mista), temperatura, pH, tempo de detenção hidráulica entre outros fatores (VAN GINKEL e LOGAN, 2005).

O maior rendimento de produção de H₂ que pode ser obtido utilizando a espécie é 4,0 mol-H₂.mol⁻¹-glicose quando é produzido o ácido acético, e isto também resulta numa produção de 4,0 moles de ATP. Porém, a produção média de H₂ em faixas de temperatura termofílica será sempre inferior a 4,0 mol-H₂.mol⁻¹-glicose e varia amplamente (KATAOKA et al., 1997; LIN e CHANG, 1999; FANG e LIU).

De acordo com Ren et al. (1997), em um sistema de tratamento anaeróbio de duas fases em geral a rota metabólica e a estabilidade operacional da fase metanogênica dependem

fortemente dos produtos da fermentação do reator acidogênico, portanto, a investigação do tipo de fermentação é crucial para a otimização da operação do tratamento anaeróbio. Existem dois tipos de fermentação na acidogênese, ou seja, fermentação ácido butírico e fermentação ácido propiônico (COHEN et al., 1984). A fermentação ácido butírico é caracterizada pela produção de ácidos acético e butírico, dióxido de carbono e hidrogênio, enquanto que a fermentação ácido propiônico produz principalmente propionato, acetato e algum ácido valérico, sem uma produção de gás significativa (REN et al., 1997). Assim, como já mostrado anteriormente pelas rotas metabólicas, é mais interessante que haja, para produção de hidrogênio, a rota ácido butírico, já que há a formação deste gás, diferentemente da rota ácido propiônico, em que há o consumo de hidrogênio.

A operação do pH, em particular, desempenha um papel importante na composição do efluente do reator acidogênico (REN et al., 1997). O pH ótimo para a acidogênese foi encontrado em torno de 6,0 e 6,5, para evitar um excesso de rendimento de ácido propiônico, entretanto, quando o pH se encontrou abaixo de 4,5, houve produção de CO₂, H₂, produzidos juntamente com ácidos acético, butírico acrescido de etanol (KISAALITA et al., 1987).

3.4. Reator Anaeróbio de Leito Fluidizado

Alguns estudos têm mostrado que os produtos da fermentação dependem do tipo de substrato utilizado e das condições de funcionamento do reator, como por exemplo, o tempo de detenção hidráulica, temperatura e pH. Em particular, pH tem a maior influência sobre a composição do efluente em reatores acidogênicos (REN et al., 1997). De acordo com Wang e Wan (2009), o pH influencia a produção de hidrogênio, porque pode afetar a atividade

hidrogenase, bem como a via metabólica. Como indicado por Van Ginkel et al. (2001), Fang e Liu (2002), Li et al. (2008), e Aceves-Lara et al. (2008), o valor de pH ideal para a produção de hidrogênio é entre 5,5 e 6,0. No entanto, os valores de pH inferior a 4,5 são favoráveis à produção de H₂, CO₂, ácido acético, ácido butírico e etanol (REN et al., 1997). A literatura apresenta resultados contraditórios em relação ao valor de pH ideal para a produção de hidrogênio. Possíveis razões para essa falta de consenso é o tipo de inóculo e substrato utilizados nestes estudos, bem como a faixa de pH sob investigação (WANG e WAN , 2009).

Um aspecto importante dos RALFs é se o pH deve ser controlado, pois o uso de álcalis para alcançar este controle aumenta o custo do processo. Resultados paradoxiais têm sido descritos na literatura. Por exemplo, Barros et al. (2010), com glicose como fonte de carbono, operaram dois reatores, um com poliestireno como material suporte e outro com argila expandida e controle de pH em torno de 5,5 e obtiveram uma alta produção de hidrogênio (1,90 e 2,59 mol H₂ mol⁻¹ de glicose, respectivamente) e uma baixa produção de etanol (1,96 e 4,35 mM, respectivamente). Amorim et al. (2009) e Shida et al. (2009) também alcançaram uma produção de hidrogênio de alta (2,49 e 2,29 mol H₂ mol⁻¹ de glicose, respectivamente) e uma baixa produção de etanol (1,86 e 1,18 mM, respectivamente) com a glicose como fonte de carbono e argila expandida como material suporte, porém sem o uso de álcalis, com pH em torno de 4,0. Abreu et al. (2009) relataram uma baixa produção de hidrogênio (0,8 mol H₂ mol⁻¹ arabinose) e uma alta produção de etanol (197,43 mM) com arabinose como fonte de carbono e em um reator batelada e o uso de agente alcalinizante para controle de pH. No entanto, Wu et al. (2007) alcançaram uma alta produção de hidrogênio e de etanol (1,04 mol mol⁻¹ H₂ hexose e 20,43 mM, respectivamente), com elastômero polietileno-octano como meio suporte, controle de pH em torno de 6,0 e glicose como fonte de carbono, apesar do fato de que as vias de produção desses biocombustíveis competem uns com os outros segundo a

rota clássica [Equação (3.4)]. Porém, a partir de Equação (3.5), pode se observar que é possível a produção de hidrogênio e etanol simultaneamente.

Amorim (2009), utilizando reator anaeróbio de leito fluidizado e argila expandida como material suporte, comparou o uso e o não uso de alcalinizante, observando que a produção de hidrogênio foi maior no reator com o uso de alcalinizante e houve uma baixa produção de etanol. Entretanto, no reator sem o uso de alcalinizante, houve uma menor produção de hidrogênio e uma maior produção de etanol.

3.5. Material suporte e produção biológica de hidrogênio em RALF

Entre os reatores anaeróbios de alta taxa utilizados para a produção biológica de hidrogênio está o reator de leito fluidizado anaeróbico. Nos reatores que utilizam material suporte, o filme microbiano é retido por adesão natural de microrganismos em partículas de um meio de suporte sólido, que é a variável mais influente para este tipo de reator (KIDA et al., 1990). Portanto, é importante o uso de materiais suporte que são simultaneamente leves, baratos, fáceis de comprar e que também podem contribuir para resolver os graves problemas ambientais causados pela geração e descarte inadequado de resíduos sólidos nos dias de hoje. Materiais suporte poliméricos, como o polietileno, poliestireno tereftalato (PET), e pneus triturados são leves, fáceis de comprar, e reutilizáveis, e seu uso como meio de suporte pode reduzir a quantidade de resíduos em aterros sanitários e minimizar a energia necessária para a fluidização em RALFs.

Barros (2009) avaliou três tipos de materiais suporte para produção biológica de hidrogênio em RALF: poliestireno, pneu triturado e PET, tratando água residuária sintética com glicose (4000 mg.L^{-1}) como fonte de carbono, temperatura de 30°C , com controle de pH efluente em torno de 5,5 e variação do TDH de 8 a 1 h. O reator com pneu apresentou melhor

rendimento de hidrogênio ($2,25 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}$ de glicose) no TDH de 2 h e também um maior acúmulo de biomassa na partícula ($1,3 \text{ mg biomassa/g partícula}$). Os reatores com pneu e PET apresentaram uma melhor produção de etanol (400 mg.L^{-1}), no TDH de 6 h. Nas amostras de partícula de pneu, foram feitas análises de biologia molecular e revelaram que o pneu favoreceu o desenvolvimento de microrganismos produtores de hidrogênio, como *Clostridium*, *Bacillus* e *Enterobacter*.

3.6. Considerações finais sobre a revisão bibliográfica

Esta revisão bibliográfica resume sobre a digestão anaeróbia e a produção biológica de hidrogênio, os fatores que a influenciam e a sua produção em reator anaeróbio de leito fluidizado. Além disso, apresenta a importância dos estudos das rotas metabólicas, assim como a utilização de diferentes pH e o seu controle ou não.

Observou-se, a partir da revisão da literatura, que é possível produzir simultaneamente hidrogênio e etanol através de uma rota alternativa em que há a produção concomitante destes dois biocombustíveis. E também, notou-se que quando não há controle de pH, ou seja, em baixos valores, como por exemplo, 3,5, há uma maior propensão para a produção destes dois biocombustíveis simultaneamente.

Constatou-se ainda a importância da escolha dos materiais suportes a serem utilizados, que devem ser de baixa densidade, para garantir uma melhor fluidização e gastar menos energia, devem ser rugosos, para uma melhor adesão microbiana e de fácil aquisição.

Os sistemas biológicos apresentam-se como uma alternativa promissora para produção de hidrogênio, principalmente por englobar a remoção de material orgânico quanto de nutrientes. O mesmo pode ser afirmado para os reatores de leito fluidizado, os quais possuem alta concentração de biomassa e alto tempo de retenção celular, propiciando a construção de

sistemas de produção de hidrogênio e etanol de alto desempenho. E, com essa revisão da literatura, obteve-se melhor compreensão dos diversos assuntos relacionados a esta pesquisa de doutorado, auxiliando nas discussões dos resultados obtidos neste trabalho.

Neste contexto, o desenvolvimento de um sistema eficiente que possa operar como fonte de tratamento, tanto na remoção de matéria orgânica quanto no seu reaproveitamento, com baixo consumo de energia, é de grande interesse para a produção de hidrogênio e etanol.

CAPÍTULO 4

MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo serão apresentados a configuração do sistema utilizado para o desenvolvimento da parte experimental, juntamente com os métodos adotados para avaliar o desempenho dos reatores anaeróbios de leito fluidizado na produção de hidrogênio.

O estudo foi planejado para a comparação do comportamento de três reatores anaeróbios de leito fluidizado destinados à produção biológica de hidrogênio, nas mesmas condições de operação, com glicose como fonte de carbono, lodo de um reator UASB que tratava resíduos de uma suinocultura como inóculo e TDH de 8, 6, 4, 2 e 1 h, sendo diferentes entre eles apenas o material suporte utilizado. O reator operado com poliestireno como material suporte foi denominado R1, o reator operado com pneu triturado inservível como material suporte foi denominado R2 e o reator operado com politereftalato de etila (PET) como material suporte foi denominado R3.

4.1. Reator anaeróbio de leito fluidizado

Os reatores utilizados para a produção de H₂ foram construídos em acrílico transparente de 5 mm de espessura e apresentam as seguintes dimensões: altura de 190 cm e diâmetro interno de 5,3 cm, com volume total de 4192 cm³ (Figura 4.1). A temperatura foi mantida em 23 ± 2°C.

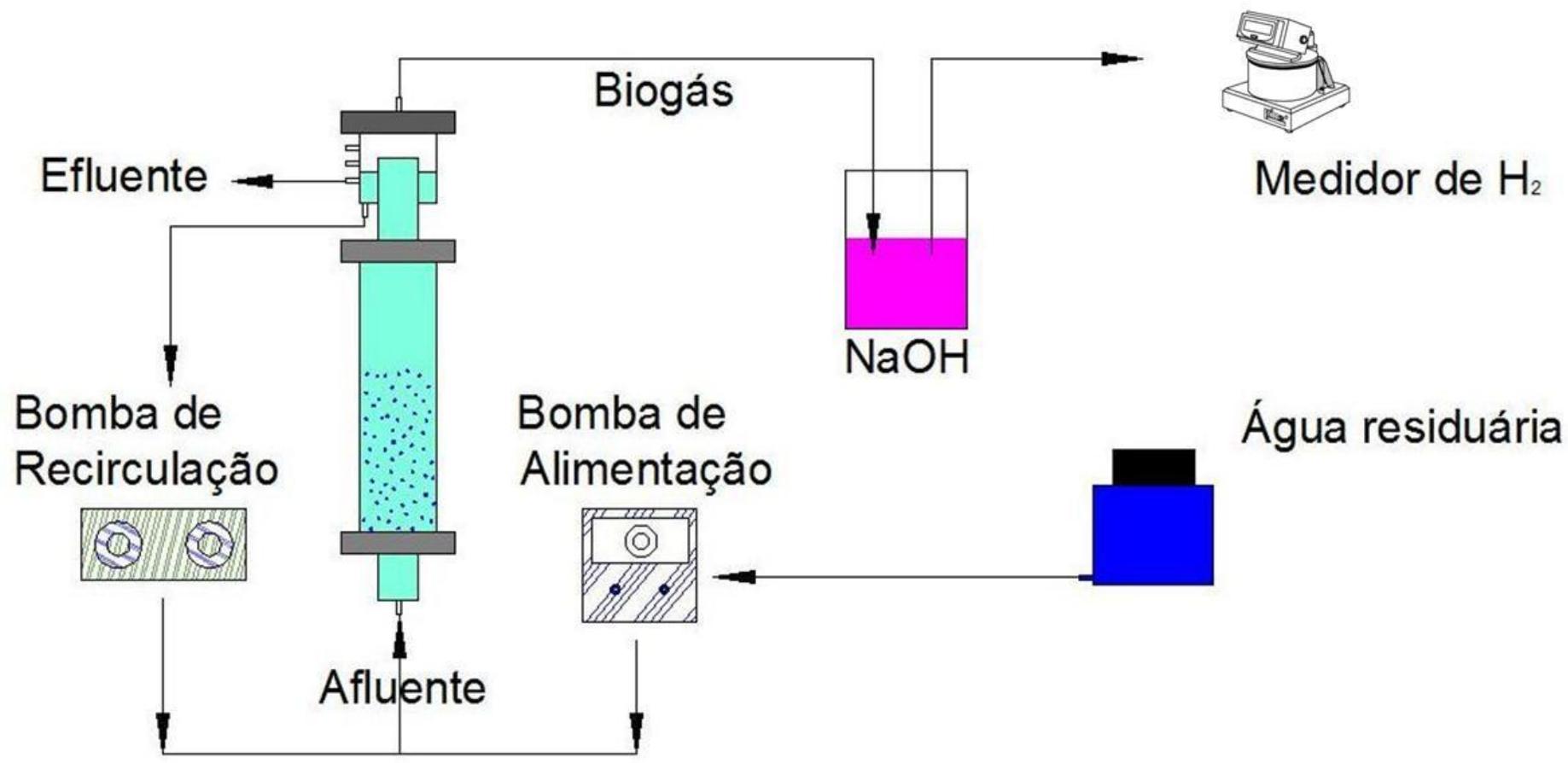


Figura 4.1 - Esquema da instalação do reator anaeróbio de leito fluidizado.

A bomba de alimentação foi a DOSITEC, modelo DLX MA/A, cuja vazão e pressão máxima foi de 1 L.h⁻¹ e 15 Bar, respectivamente, e bomba de recirculação foi a ECOSAN-Bomba dosadora, cuja vazão varia de 10 a 200 L.h⁻¹ e pressão de 5,77 Bar.

4.2. Água residuária e material suporte

A água residuária sintética foi composta por glicose como principal fonte de carbono (4000 mg.L⁻¹) e suplementada com nutrientes de acordo com Del Nery (1995). A Tabela 4.1 mostra a composição da água residuária utilizada.

Tabela 4.1 - Composição da água residuária sintética utilizada (DEL NERY, 1995).

Composto	Concentração (mg L⁻¹)
Glicose	4000,0
Ureia	125,0
Sulfato de níquel	1,0
Sulfato ferroso	5,0
Sulfato férrico	0,5
Cloreto de cálcio	47,0
Cloreto de cobalto	0,08
Óxido de selênio	0,07
Fosfato de potássio monobásico	85,0
Fosfato de potássio dibásico	21,7
Fosfato de sódio dibásico	33,4

Nos RALFs foram utilizadas como suportes de imobilização da biomassa partículas poliestireno, de pneu inservível triturado, e de PET. As condições fluidodinâmicas dos reatores, tais como velocidade de mínima fluidização e vazão de recirculação para os suportes foram calculadas a partir de dados experimentais de velocidade superficial e perda de carga (Tabela 4.2).

As Figuras 4.2, 4.3 e 4.4 ilustram, respectivamente as partículas de poliestireno, pneu inservível triturado e PET.



Figura 4.2 – Partículas de poliestireno para utilização como suporte para imobilização da biomassa.



Figura 4.3 – Partículas de pneu triturado para utilização como suporte para imobilização da biomassa.

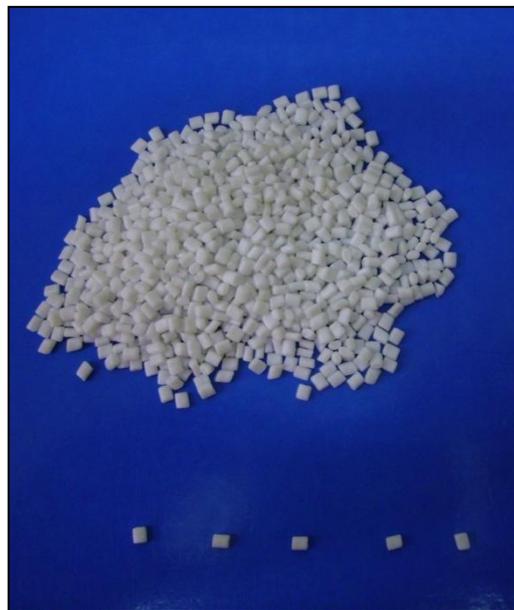


Figura 4.4 – Partículas de PET para utilização como suporte para imobilização da biomassa.

As partículas de poliestireno foram mergulhadas em solução de sulfocrômica por 40 minutos, em seguida lavadas com água, secas e mergulhadas em ácido nítrico concentrado por 50 minutos. Posteriormente, foram lavadas novamente e secas em estufa a 40°C. Este

procedimento foi aplicado quatro vezes às partículas de poliestireno para aumentar a rugosidade das partículas (BARROS et al., 2010). As partículas de pneu inservível triturado foram mergulhadas em hidróxido de sódio a $7,5 \cdot 10^{-3}$ M, durante 30 minutos, em seguida lavadas com água e secas em estufa a 40°C. Este procedimento foi aplicado três vezes às partículas de pneu triturado com o intuito de retirar os resíduos de óleo encontrados nestas partículas (BARROS, 2009). As partículas de PET foram mergulhadas em ácido clorídrico 10M durante 30 minutos, em seguida lavadas com água e secas em estufa a 40°C. Este procedimento foi aplicado três vezes às partículas de PET com a finalidade de aumentar a rugosidade das partículas para favorecer a adesão microbiana (BARROS, 2009).

Tabela 4.2 - Dimensão, densidade e velocidade de mínima fluidização para as partículas utilizadas.

Partícula	Forma	D_p (mm)	ρ_p (g.cm ⁻³)	V_{mf} (cm.s ⁻¹)	Rugosidade (%)
Poliestireno	Cilindro	2,2 x 2,2	1,05	0,74	14,59
Pneu triturado	Irregular	2,8 – 3,35	1,14	1,18	18,00
PET	Cilindro	2,2 x 2,2	1,25	1,35	10,23

Em que: D_p : Dimensão da partícula

ρ_p : Densidade da partícula

V_{mf} : Velocidade mínima de fluidização

A rugosidade das superfícies das partículas utilizadas foi estimada utilizando um procedimento adotado por Aguiar (1995). Este método se utilizou das micrografias das partículas obtidas em Microscópio Eletrônico de Varredura. Para cada partícula dessas micrografias foram inicialmente desenhadas duas circunferências, uma externa e uma interna,

e determinada o diâmetro de cada uma dessa circunferência (d_E e d_I , respectivamente), através do software Image Pro-Plus 4.5. Usando estes diâmetros, foi determinado um pseudo-diâmetro médio (d_β) utilizando a Equação (4.1):

$$d_\beta = \frac{d_E + d_I}{2}$$

(4.1)

Posteriormente, as circunferências foram desenhadas no interior da partícula (d_α), conforme pode ser observado na Figura 4.5:

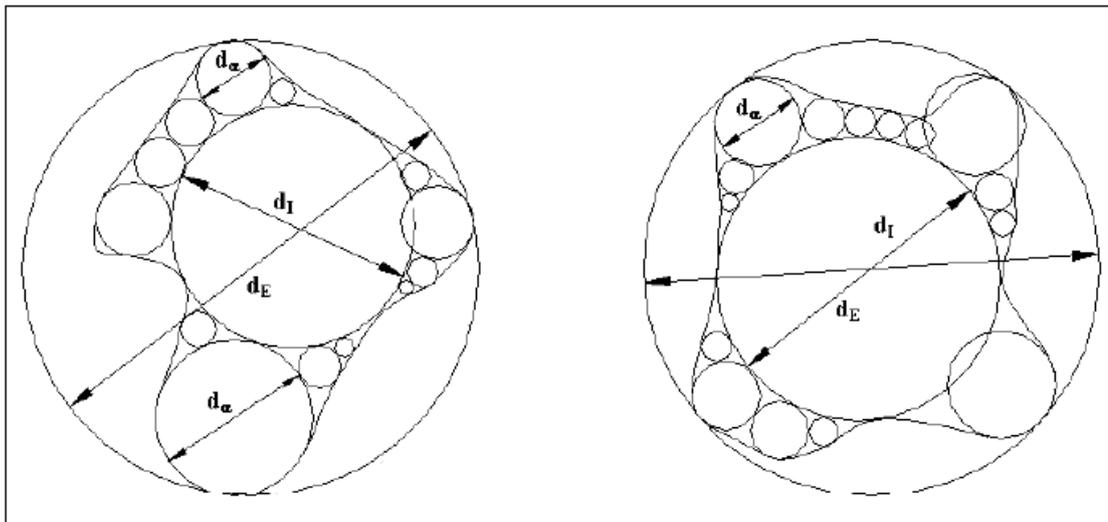


Figura 4.5 – Metodologia utilizada para a estimativa da rugosidade da superfície das partículas.

Finalmente, a rugosidade (α) foi determinada como sendo a razão entre o pseudo-diâmetro médio da partícula e a média de todas as rugosidades d_α :

$$\alpha = \frac{\bar{d}_\alpha}{\bar{d}_\beta} \quad (4.2)$$

Sendo que o diâmetro aritmético (\bar{d}_α), foi determinado pela Equação (4.3):

$$\bar{d}_\alpha = \frac{(d_{\alpha 1} + d_{\alpha 2} + \dots + d_{\alpha n})}{n} \quad (4.3)$$

4.3. Inóculo

Os reatores foram inoculados com lodo proveniente de reator anaeróbio de manta de lodo (UASB) da estação de tratamento piloto de água residuária de suinocultura (UNESP, Jaboticabal, Brasil). Essa biomassa foi submetida a um pré-tratamento térmico de acordo com a metodologia proposta por Kim et al. (2006). O pré-tratamento consistiu de um aquecimento prévio do lodo por 10 minutos a 90 °C com monitoramento de um termômetro e, em seguida o lodo foi colocado em banho de gelo até que a temperatura atingisse 25 °C. Este tratamento térmico possibilitou a eliminação de células vegetativas metanogênicas e acidogênicas não formadoras de endósporos, e mantiveram as células acidogênicas com capacidade de formar endósporos, estruturas de resistência a condições desfavoráveis.

O R1 foi preenchido com 930,26 g de poliestireno, o R2 com 621,03 g de pneu triturado e o R3 com 1375,09 g de PET. O uso de massas diferentes é devido à diferença de

densidade das partículas, foi utilizado uma quantidade de massa para que elas ficassem com o mesmo volume no reator. A inoculação foi efetuada introduzindo-se em cada RALF 10% de biomassa e o restante com água residuária sintética contendo 4000 g.L^{-1} de glicose. Neste experimento, adotou-se o sistema de recirculação do inóculo, com o objetivo de imobilizar e adaptar a biomassa no material suporte nas condições operacionais do reator. Durante 48 horas, cada reator foi operado em circuito fechado, em modo batelada, para ativação e imobilização da biomassa anaeróbia. Após este período, os reatores receberam afluente de forma contínua, com recirculação, com 4000 mg.L^{-1} de glicose. Os reatores foram monitorados durante 175 dias e operados em cinco fases, referentes aos TDH de 8, 6, 4, 2 e 1 h.

4.4. Métodos analíticos

As análises de pH, DQO, sólidos totais (ST), sólidos suspensos totais (SST) e sólidos suspensos voláteis (SSV) foram feitas de acordo com o APHA (1998).

A biomassa aderida às partículas de pneu triturado e PET foi determinada pelo procedimento proposto por Chen e Chen (2000). O procedimento para quantificação de polímeros foi o mesmo utilizado por Sader (2005). Neste procedimento, os polímeros extracelulares foram quantificados, em termos de proteínas, segundo o método de Lowry et al. (1951) utilizando albumina bovina (SAB) como padrão, e de carboidratos, o método de análise de glicose da LABORLAB.

A determinação de glicose na solução do substrato afluente e efluente de cada reator foi realizada pelo método da reação enzimática com glicose oxidase (LEITE et al., 2008).

A determinação do gás hidrogênio foi efetuada por meio de cromatografia gasosa de acordo com metodologia proposta por Maintinguer et al. (2008). A determinação do gás

hidrogênio foi efetuada por meio da retirada de 0,1 mL de amostra da fase gasosa, utilizando seringa “gastight” com trava. Foi utilizado cromatógrafo a gás, Shimadzu GC-2010, equipado com detector de condutividade térmica. A coluna utilizada foi a Supelco Carboxen 1010 Plot (30 m de comprimento e diâmetro interno de 0,53 mm) e detector de condutividade térmica, e o gás de arraste foi o argônio sob fluxo de $21,9 \text{ cm.s}^{-1}$. As temperaturas do forno, da coluna e do detector foram $30 \text{ }^\circ\text{C}$, $200 \text{ }^\circ\text{C}$ e $230 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente. A produção de H_2 foi medida por meio do medidor de vazão de hidrogênio MilliGas-counter da Ritter (Tipo: MGC-1).

As determinações dos ácidos orgânicos individualizados e álcoois foram feitas por cromatografia gasosa de acordo com a metodologia proposta por Maintinguer et al. (2008). Foi utilizado o cromatógrafo Shimadzu GC-17A com detector de ionização de chama e coluna NUKOL (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm de espessura de filme). O gás de arraste utilizado foi o hidrogênio com fluxo de $2,0 \text{ mL.min}^{-1}$ com temperatura de injeção de $250 \text{ }^\circ\text{C}$ e Split 20. A temperatura do forno foi ajustada para $100 \text{ }^\circ\text{C}$ por 3 minutos. Observou-se uma rampa de elevação de temperatura até $180 \text{ }^\circ\text{C}$ que foi mantida por 5 minutos. Em seguida, foi aplicado um “post-run” de $200 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 3 minutos. O fluxo de nitrogênio (gás auxiliar, “make up”) foi de 35 mL.min^{-1} e fluxo de hidrogênio de 30 mL.min^{-1} . O volume de injeção foi de $1,0 \mu\text{L}$.

4.5. Avaliação dos dados experimentais

Foram realizadas coletas semanais de amostras do afluente, efluente e saída de gás do reator durante a etapa experimental sendo que o desempenho dos reatores foi analisado através das análises citadas em tópicos anteriores. Foi avaliado o desempenho dos reatores,

principalmente, através da produção de H_2 e de ácidos graxos voláteis. As amostras foram armazenadas para uma possível análise futura.

No início e fim de cada etapa do processo foram feitas análises microbiológicas comparando as mudanças na ecologia microbiana. Finalmente, os dados das etapas estudadas nos reatores foram comparados, identificando a condição com melhor desempenho.

A Tabela 4.3 apresenta a frequência de coleta e análise de amostras para todas as fases de operação.

Tabela 4.3 – Frequência de coleta e análise de amostras para todas as fases de operação.

Análise	Frequência
pH	Diária
Glicose	3x semana
DQO	3x semana
Ácidos voláteis totais	3x semana
Ácidos orgânicos individuais	3x semana
Alcoóis	3x semana
Conteúdo do biogás (H_2 e CO_2)	3x semana
Produção volumétrica de H_2	3x semana
ST, SST, SSV	3x semana
Vazão	Diária
MEV	1x por fase

CAPÍTULO 5

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados os principais resultados das variáveis operacionais analisadas para o controle do desempenho de cada reator anaeróbio de leito fluidizado empregado neste estudo. As informações básicas foram mostradas em curvas de variação dos principais parâmetros analisados, abrangendo todo o período de coleta de dados e serão apresentadas tabelas com os valores médios correspondentes a cada fase de operação dos reatores. Além disso, também serão apresentados gráficos e tabelas comparando-se os resultados dos três reatores estudados, com materiais suporte diferentes: poliestireno (R1), pneu inservível triturado (R2) e PET (R3).

Os reatores foram operados em seis fases: I, II, III, IV e V, referentes, respectivamente aos tempos de detenção hidráulica (TDH) de 8, 6, 4, 2 e 1 h.

Os reatores anaeróbios de leito fluidizado foram operados por 175 dias e, durante este período, as análises foram avaliadas à medida que o sistema era operado em condições de TDH de 8 h (28 dias), 6 h (35 dias), 4 h (35 dias), 2 h (31 dias), 1 h (47 dias).

O TDH foi alterado à medida que o sistema alcançou um estado estacionário (3 dias), como a estabilidade de consumo de glicose e formação dos produtos desejados nos reatores.

Para haver a adaptação da biomassa, o experimento foi iniciado com a operação dos reatores em modo de batelada durante 48 h. Após isso, o sistema foi aberto em modo contínuo com TDH inicial de 8 h.

A variação do TDH foi aplicada sobre o sistema a partir de mudanças de vazão de entrada de água residuária. A concentração de glicose em todas as fases de operação foi de 4000 mg L⁻¹.

5.1. Conversão de glicose

A Figura 5.1 ilustra uma comparação entre a glicose afluyente média e a conversão média de glicose nos reatores, nas diferentes fases operadas.

A glicose afluyente dos três reatores foi a mesma, pois foram alimentados com o mesmo tanque de água residuária sintética, em torno de 3500 mg.L⁻¹.

No R1, a conversão de glicose diminuiu de 91 para 60% com a redução do TDH de 8 h para 1 h. Observa-se que a conversão de glicose no R2 nos TDH de 8 e 6 h foram em torno de 80%, e posteriormente, no TDH de 4 h houve uma queda e em seguida, em 2 h, um aumento para aproximadamente 75% e em 1 h uma queda novamente. Já no R3, a conversão de glicose aumentou de 74 para 82% com a redução do TDH de 8 h para 6 h e com a redução do TDH para 1 h, a conversão de glicose diminuiu para 61%.

Similarmente a este trabalho, Koskinen et al. (2007) também observaram uma queda da conversão de glicose com a redução do TDH e Chang e Lin (2004) utilizando sacarose como fonte de carbono também obtiveram resultado semelhante. Estas reduções drásticas de remoção de glicose no TDH de 1 h provavelmente ocorreram devido à sobrecarga de glicose nos reatores, ou talvez possa ser colocada a hipótese de que houve limitação cinética no sistema.

Essas constatações podem ser atribuídas aos elevados tempos de retenção celular

devido ao sistema de crescimento aderido, o qual proporcionou maior acúmulo de biomassa no sistema. O mesmo foi alcançado por Gavala et al. (2006) quando estudou a produção de hidrogênio em reator CSTR.

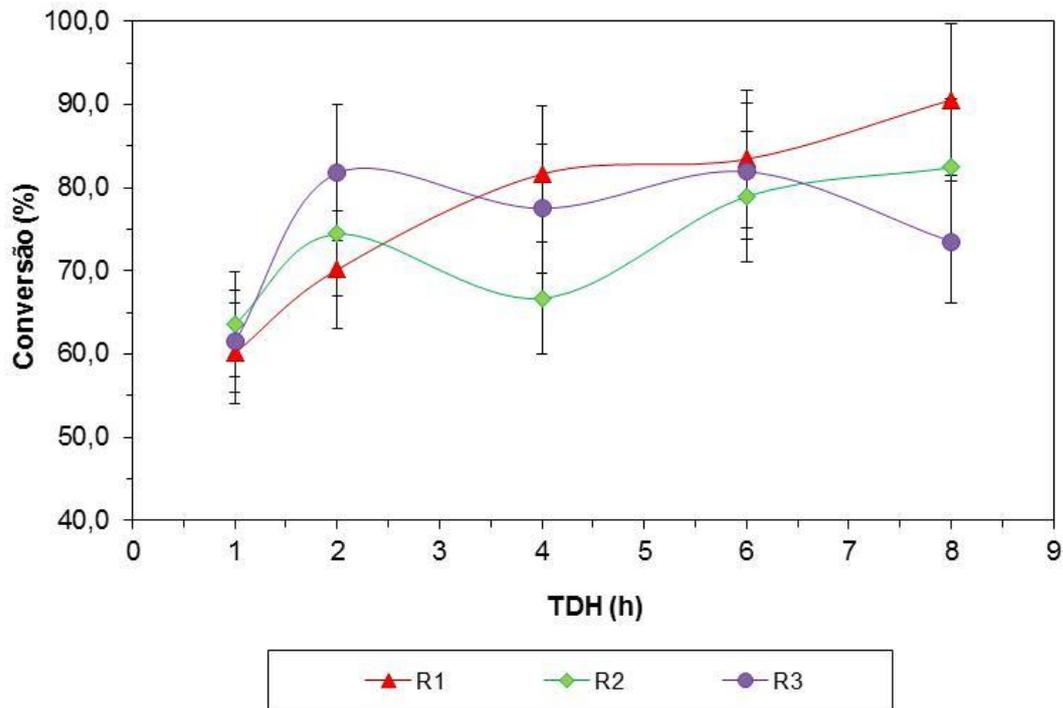


Figura 5.1 – Comparação da concentração média de glicose afluente e conversão média de glicose no R1 (poliestireno), no R2 (pneu) e no R3 (PET), em diferentes TDH.

A Tabela 5.1 apresenta os resultados médios obtidos e seus respectivos desvios para cada faixa de TDH aplicado em cada reator anaeróbio de leito fluidizado.

Tabela 5.1 - Resultados médios obtidos e seus respectivos desvios, para cada faixa de TDH aplicado no R1 (poliestireno), no R2 (pneu) e no R3 (PET).

	Fase	TDH (h)	Glicose afluyente (mg.L ⁻¹)	Glicose efluente (mg.L ⁻¹)	Conversão (%)	TDH (h)*
R1 (poliestireno)	I	8	3097 ± 449	322 ± 131	90,56 ± 4	8,48
	II	6	3320 ± 256	555 ± 150	80,43 ± 8	5,95
	III	4	3158 ± 304	555 ± 141	81,63 ± 9	4,00
	IV	2	2835 ± 457	838 ± 230	70,14 ± 14	1,97
	V	1	3287 ± 320	1321 ± 5	60,09 ± 5	1,04
R2 (pneu)	I	8	3097 ± 449	574 ± 277	82,41 ± 17	8,15
	II	6	3320 ± 256	707 ± 244	72,92 ± 8	5,98
	III	4	3158 ± 304	949 ± 318	71,27 ± 14	3,81
	IV	2	2835 ± 457	670 ± 202	74,41 ± 22	2,11
	V	1	3287 ± 320	1210 ± 606	63,60 ± 6	1,07
R3 (PET)	I	8	3097 ± 449	891 ± 349	73,51 ± 22	8,41
	II	6	3320 ± 256	603 ± 212	81,92 ± 9	5,81
	III	4	3158 ± 304	648 ± 74	77,51 ± 17	4,04
	IV	2	2835 ± 457	584 ± 324	77,16 ± 19	1,98
	V	1	3287 ± 320	1293 ± 526	61,47 ± 12	0,96

* TDH: tempo de detenção hidráulica baseado no volume total do reator.

Zhang et al. (2007), utilizando RALF, com 10000 mg.L⁻¹ de concentração de glicose, também observaram uma diminuição na conversão de 99,47% a 71,44%, com a redução do TDH de 4 para 0,5 h. No entanto, nos estudos de Wu et al. (2003) com uma concentração de 20 g DQO.L⁻¹ de sacarose, Lin et al. (2006) com uma concentração de sacarose variando entre

5 e 40 g DQO.L⁻¹, Shida et al. (2009) com concentração de glicose de 2000 mg.L⁻¹ e Amorim et al. (2009) com concentração de glicose com 2000 mg.L⁻¹, observa-se que a conversão de glicose foi acima de 90%, com o mesmo tipo de reator.

Segundo Gavala et al. (2006), a alta eficiência de consumo de glicose verificada neste estudo, principalmente entre os TDH de 8 e 2 h pode ser atribuída aos elevados tempos de retenção de sólidos devido ao sistema de crescimento aderido que proporciona maior acúmulo de biomassa no sistema.

Os valores de vazão para cada TDH teórico foram calculados a partir do volume total do reator (4192 mL). Optou-se por estabelecer uma faixa de tolerância de 10% acima e abaixo do valor da vazão.

5.2. Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidizado

A Figura 5.2 compara as produções volumétricas de hidrogênio (PVH) médias nos três reatores nos diferentes TDH utilizados ao longo dos dias de operação. A PVH foi calculada pela divisão da vazão de hidrogênio pelo volume reacional do leito preenchido pelo material suporte com a biomassa imobilizada.

Observa-se que em todos os reatores, a produção volumétrica de hidrogênio aumentou com a diminuição do TDH até 2 h. Porém, no R2 (pneu), a PVH diminuiu com a redução do TDH para 1 h, enquanto que o R1 (poliestireno) e o R3 (PET), a PVH aumentou com a redução do TDH para 1 h.

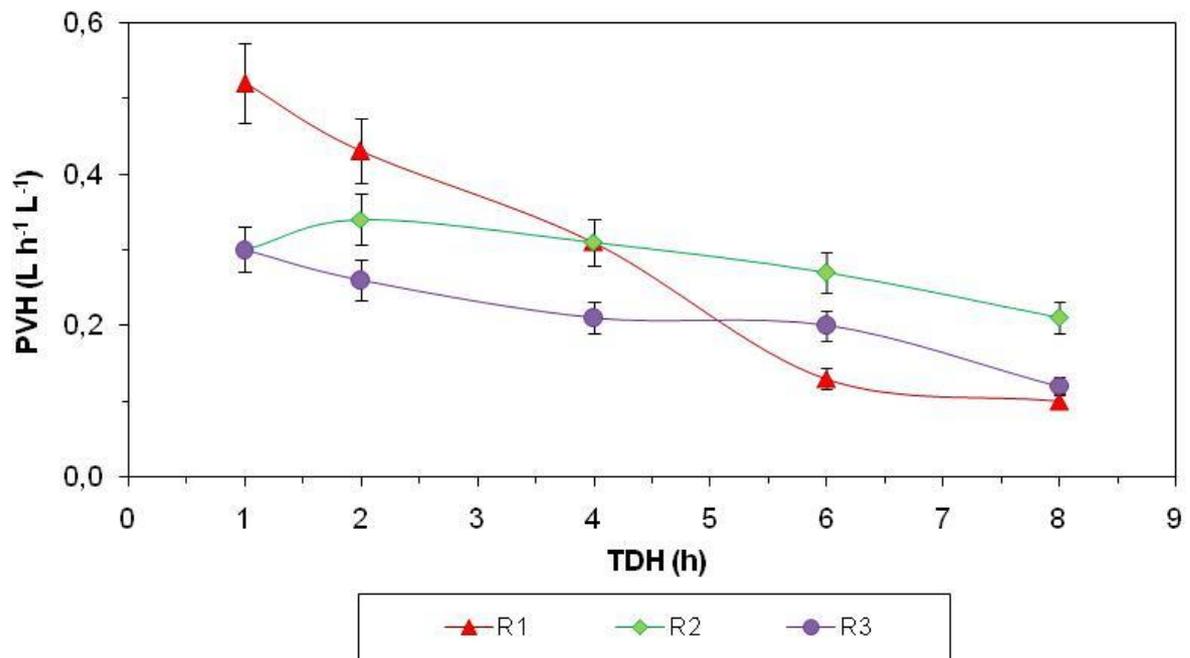


Figura 5.2 – Comparação das produções volumétricas médias de H₂, em diferentes TDH no R1 (poliestireno), no R2 (pneu) e no R3 (PET).

A Tabela 5.2 ilustra a produção volumétrica de hidrogênio média em cada TDH estudado, nos três materiais suporte utilizados.

Tabela 5.2 – Resultados médios obtidos de PVH e seus respectivos desvios, para cada faixa de TDH aplicado no R1 (poliestireno), no R2 (pneu) e no R3 (PET).

	Fase	TDH (h)	PVH (L.h ⁻¹ .L ⁻¹)
R1 (poliestireno)	I	8	0,10 ± 0,01
	II	6	0,13 ± 0,02
	III	4	0,31 ± 0,03
	IV	2	0,46 ± 0,05
	V	1	0,52 ± 0,05
R2 (pneu)	I	8	0,21 ± 0,02
	II	6	0,27 ± 0,03
	III	4	0,31 ± 0,03
	IV	2	0,34 ± 0,04
	V	1	0,30 ± 0,03
R3 (PET)	I	8	0,12 ± 0,01
	II	6	0,20 ± 0,02
	III	4	0,21 ± 0,02
	IV	2	0,26 ± 0,03
	V	1	0,30 ± 0,03

Observa-se, pela Figura 5.2 e pela Tabela 5.2, que o R1 (poliestireno) apresentou um melhor desempenho na produção volumétrica de hidrogênio, no TDH de 1 h. O R2 (pneu) e o R3 (PET) e foram praticamente iguais quanto à produção volumétrica de hidrogênio. No R1 e no R3 a PVH aumentou com a redução do TDH de 8 h a 1 h e no R2 a PVH aumentou com a

redução do TDH de 8 h para 2 h (Figura 5.2 e Tabela 5.2). Do mesmo modo, os valores de PVH aumentaram com a redução do TDH nos estudos de Lin et al. (2006), Zhang et al. (2007) e Shida et al. (2009), Barros et al. (2010 e 2011). Entretanto, no estudo de Barros et al. (2010 e 2011), com as mesmas condições operacionais desta pesquisa, porém sem controle de pH, com os mesmos materiais suporte, a melhor PVH foi de $1,07 \text{ L.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$, no reator com PET como material suporte no TDH de 1 h, diferentemente desta pesquisa, eu que a melhor PVH foi de $0,52 \text{ L.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$ no reator com poliestireno no TDH de 1 h.

O aumento da PVH com a redução do TDH pode ser explicado por haver o aumento da vazão de alimentação do reator (redução do TDH) e conseqüentemente, também há o aumento do volume de hidrogênio produzido. Outra hipótese também seria que o poliestireno tenha selecionado um microrganismo mais favorável à produção de hidrogênio.

Em reator anaeróbio de leito fluidizado, Wu et al. (2003) obtiveram produção volumétrica máxima de hidrogênio de $0,93 \text{ L.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$, no TDH de 2 h, com concentração de sacarose de 20 g.DQO L^{-1} ; Lin et al. (2006) de $2,27 \text{ L.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$, no TDH de 2,2 h, com concentração de sacarose de 40 g.DQO L^{-1} ; Wu et al. (2006) de $2,33 \text{ L.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$, no TDH de 0,5, com concentração de glicose de 20 g.DQO L^{-1} ; Zhang et al. (2007) de $2,22 \text{ L.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$, no TDH de 0,5 h com uma concentração de glicose de 10 g.L^{-1} ; Amorim et al. (2009) de $0,97 \text{ L.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$, no TDH de 1 h, com concentração de glicose de 2 g.L^{-1} .

A Figura 5.3 ilustra a comparação dos rendimentos médios para cada mol de glicose em diferentes TDH no R1 (poliestireno), no R2 (pneu) e no R3 (PET).

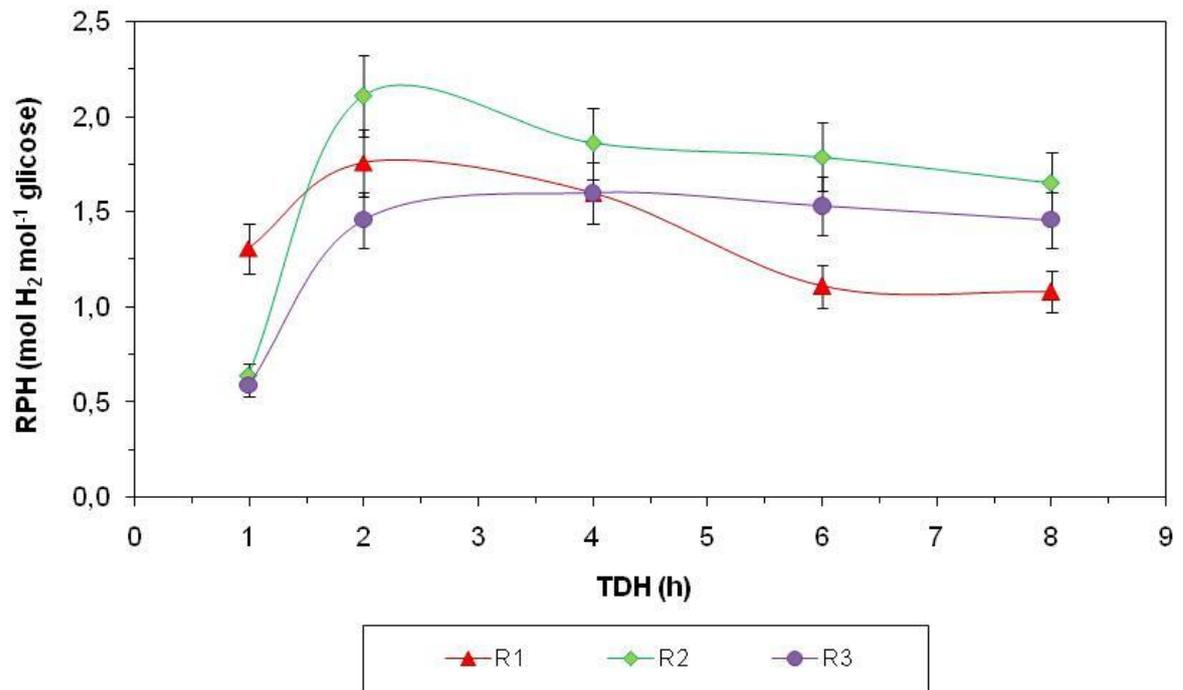


Figura 5.3 – Comparação dos rendimentos médios em diferentes TDH no R1 (poliestireno), no R2 (pneu) e no R3 (PET).

A Tabela 5.3 ilustra a rendimento de produção de hidrogênio média em cada TDH estudado, nos três materiais suporte utilizados.

Tabela 5.3 – Resultados médios obtidos de RPH e seus respectivos desvios, para cada faixa de TDH aplicado no R1 (poliestireno), no R2 (pneu) e no R3 (PET).

	Fase	TDH (h)	RPH (mol-H ₂ .mol ⁻¹ -glicose)
R1 (poliestireno)	I	8	1,08 ± 0,11
	II	6	1,11 ± 0,11
	III	4	1,60 ± 0,16
	IV	2	1,76 ± 0,18
	V	1	1,31 ± 0,13
R2 (pneu)	I	8	1,65 ± 0,17
	II	6	1,79 ± 0,18
	III	4	1,86 ± 0,19
	IV	2	2,11 ± 0,21
	V	1	0,64 ± 0,07
R3 (PET)	I	8	1,46 ± 0,15
	II	6	1,53 ± 0,16
	III	4	1,60 ± 0,16
	IV	2	1,46 ± 0,15
	V	1	0,59 ± 0,06

O reator que apresentou maior rendimento de produção de hidrogênio foi o preenchido com pneu triturado (R2), no TDH de 2 h (2,11 mol-H₂.mol⁻¹-glicose) (Figura 5.3 e Tabela 5.3). No R1 (poliestireno) e no R2 (pneu), o rendimento máximo foi no TDH de 2 h, e no R3 (PET), no TDH de 4 h, o que indica que pode ter ocorrido alteração metabólica quando o

TDH foi reduzido de 2 h para 1 h e provavelmente, mais substrato foi desviado para o crescimento e manutenção da biomassa do que para a formação dos produtos finais (ZHANG et al., 2007).

Amorim et al. (2009), Shida et al. (2009), Barros et al. (2010 e 2011) e Reis (2010), também houve uma queda no RPH no TDH de 1 h. Desta maneira, a queda do RPH neste estudo no TDH de 1 h também pode ser atribuído à redução do TDH e não porque houve uma queda na glicose afluente dos reatores. A queda do RPH no TDH de 1 h pode ter ocorrido porque faltou tempo para que a reação de conversão de glicose ocorresse, ou também pode ter havido uma lavagem nos reatores, carreando a comunidade microbiana para fora do reator e impedindo que houvesse uma degradação da matéria orgânica.

Comparando este estudo com outras pesquisas, pode-se observar que os resultados de rendimento de produção de hidrogênio estão compatíveis. Utilizando glicose como fonte de carbono, e operando reator anaeróbico de leito fluidizado, Zhang et al. (2007) obtiveram 1,19 mol-H₂.mol⁻¹-glicose de rendimento de produção de hidrogênio máximo, Shida et al. (2009) alcançou 2,29 mol-H₂.mol⁻¹-glicose e Amorim et al. (2009), 2,49 mol-H₂.mol⁻¹-glicose. Wu et al. (2003) e Lin et al. (2006), estudando reator anaeróbico de leito fluidizado e sacarose como fonte de carbono obtiveram rendimentos de produção de hidrogênio máximos de 2,67 e 4,28 mol-H₂.mol⁻¹-sacarose, respectivamente. Estes rendimentos correspondem a 33,75% e 53,5%, respectivamente, ao rendimento máximo teórico da sacarose, de 8 mol-H₂.mol⁻¹-sacarose. Sabendo que o rendimento teórico máximo da glicose é de 4 mol-H₂.mol⁻¹-glicose, os resultados encontrados neste estudo para o R1 (poliestireno), R2 (pneu) e R3 (PET), são, respectivamente de 44%, 52,75% e 40%.

Entretanto, no estudo de Barros et al. (2010 e 2011), com as mesmas condições operacionais desta pesquisa, porém sem controle de pH, com os mesmos materiais suporte, o melhor RPH foi de 2,25 mol-H₂.mol⁻¹-glicose, no reator com pneu como material suporte no

TDH de 2 h, diferentemente desta pesquisa, eu que a melhor RPH foi de $2,11 \text{ mol-H}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$ glicose também no reator com pneu no TDH de 2 h. Observa-se que o reator com pneu foi melhor para a produção de hidrogênio tanto com controle quanto sem controle de pH.

A Figura 5.4 ilustra a média do conteúdo de H_2 no biogás nos três reatores utilizados durante o experimento em diferentes TDH ao longo do período de operação.

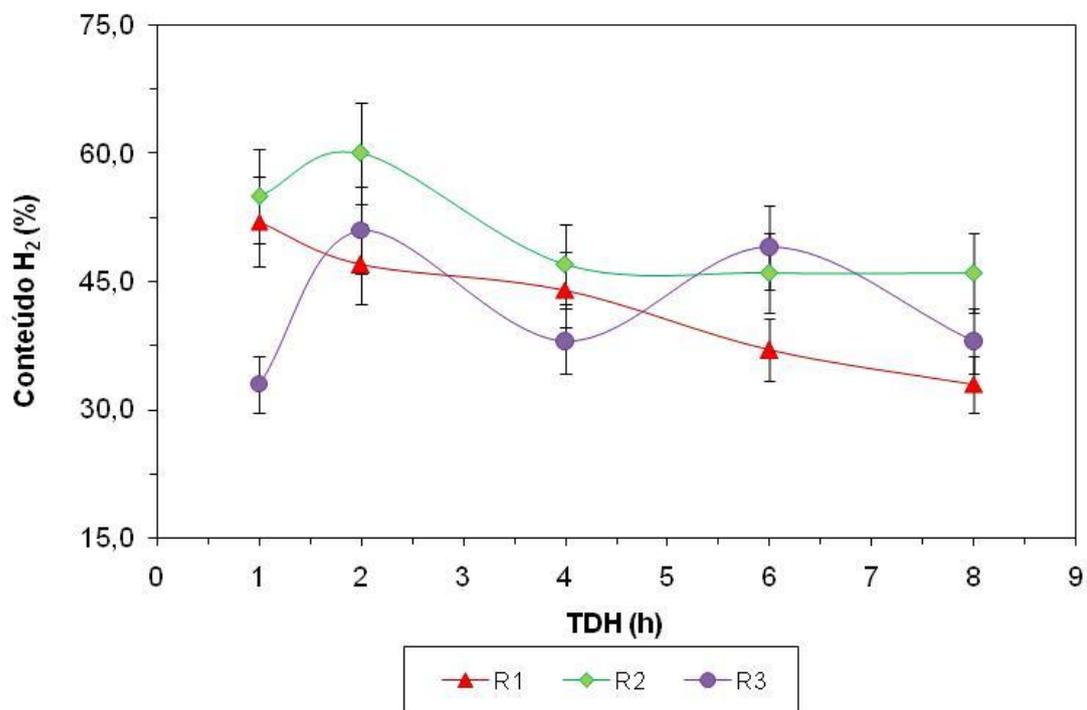


Figura 5.4 - Comparação do conteúdo de H_2 no biogás médio em diferentes TDH no R1 (poliestireno), no R2 (pneu) e no R3 (PET).

Em ambos os reatores, houve a presença de hidrogênio e gás carbônico no biogás, não sendo detectada a presença de metano, durante todas as fases do experimento. A ausência de metano no biogás pode ser atribuída ao tratamento térmico do inóculo e ao pH efluente em condições acidogênicas, o que inibe a atividade metanogênica responsável pelo consumo de hidrogênio no sistema (SHIDA, 2008).

A Tabela 5.4 ilustra o conteúdo médio de hidrogênio e gás carbônico gerado nos TDH estudados, nos três matérias suporte utilizados.

Tabela 5.4 – Resultados médios obtidos de conteúdo de hidrogênio e gás carbônico e seus respectivos desvios, para cada faixa de TDH aplicado no R1 (poliestireno), no R2 (pneu) e no R3 (PET).

	Fase	TDH	H₂	CO₂	CH₄
		(h)	(%)	(%)	(%)
R1 (poliestireno)	I	8	33 ± 3,5	67 ± 7,0	0
	II	6	37 ± 3,5	63 ± 6,5	0
	III	4	44 ± 4,5	56 ± 5,5	0
	IV	2	47 ± 4,5	53 ± 5,5	0
	V	1	52 ± 5,0	48 ± 5,0	0
R2 (pneu)	I	8	46 ± 4,5	54 ± 5,5	0
	II	6	46 ± 4,5	54 ± 5,5	0
	III	4	47 ± 4,5	53 ± 5,5	0
	IV	2	60 ± 6,0	40 ± 4,0	0
	V	1	52 ± 5,0	48 ± 5,0	0
R3 (PET)	I	8	38 ± 4,0	62 ± 6,0	0
	II	6	49 ± 5,0	51 ± 5,0	0
	III	4	38 ± 4,0	62 ± 6,0	0
	IV	2	51 ± 5,0	49 ± 5,0	0
	V	1	33 ± 3,5	67 ± 6,5	0

No R1 (poliestireno), a porcentagem de H₂ no biogás variou entre 33 e 52%, no R2 (pneu), entre 46 e 60% e no R3 (PET) entre 33 e 51%.

O R2 apresentou um maior conteúdo de hidrogênio atingindo valor máximo de 60% (Figura 5.4). Não foi detectado metano durante a operação dos reatores. Essa tendência de aumento do conteúdo de hidrogênio com a redução do TDH também foi observada na literatura para RALF (YU et al., 2002; LIN et al., 2006; AMORIM et al., 2009; BARROS et al., 2010 e 2011; REIS, 2010). Entretanto, no estudo de Barros et al. (2010 e 2011), com as mesmas condições operacionais desta pesquisa, porém sem controle de pH, com os mesmos materiais suporte, e melhor a porcentagem de H₂ no biogás foi de 53%, no reator com pneu como material suporte no TDH de 2 h, diferentemente desta pesquisa, eu que a melhor a porcentagem de H₂ no biogás foi de 67% no reator com PET no TDH de 1 h.

Yu et al. (2002) estudaram reator UASB, com hexose como fonte de carbono a uma DQO de 14 a 36 g.L⁻¹, TDH de 24 a 2 h, apresentando conteúdo de H₂ no biogás de 53 a 61%.

Chang et al. (2002) utilizaram reator de leito fixo, com três meios suporte diferentes (esponja vegetal, argila expandida e carvão ativado), com sacarose como fonte de carbono, com uma DQO de 20 g.L⁻¹, TDH entre 5 e 0,5 h, obtendo um porcentagem de H₂ entre 9,5 e 45,8%.

Wu et al. (2003) também observaram a redução de porcentagem de hidrogênio no biogás com a redução do TDH de 2 h para 1 h. Nesta mudança de TDH, a produção de dióxido de carbono não foi diminuída, somente do hidrogênio, com isso, provavelmente alguns microrganismos não produtores de hidrogênio começaram a dominar o sistema sob baixos TDH e converter o carbono do substrato em dióxido de carbono.

Lin et al. (2006) analisaram reator anaeróbio de leito fluidizado com tubo draft (RALFDT), com gel de silicone como material suporte, sacarose como substrato, com uma DQO de 5 a 40 g.L⁻¹, TDH de 2,2 a 8,9 h, alcançando um conteúdo de H₂ entre 39% e 47%.

Zhang et al. (2007) estudaram RALF, usando carvão ativado como meio suporte, com glicose como fonte de carbono com DQO de 10 g.L^{-1} , observaram que o conteúdo de H_2 no biogás foi reduzido de 61% a 57% quando o TDH foi reduzido de 4 para 0,5 h.

Amorim et al. (2009), utilizando RALF, com argila expandida como material suporte e glicose como fonte de carbono observaram que o conteúdo de H_2 no biogás aumentou de 8% para 35% com a redução do TDH de 8 h para 1 h.

A diferença encontrada neste estudo e nos demais estudos relatados demonstra a necessidade de controle na manutenção de populações acidogênicas e prevenção da contaminação de outros organismos não produtores de hidrogênio no sistema que competirão pelo substrato (SHIDA, 2008).

O desempenho dos diferentes sistemas depende de fatores como inóculo, método de imobilização da biomassa como os filmes fixos e crescimento em suspensão, composição da água residuária, método adotado para a partida do sistema, além das configurações do reator (SHIDA, 2008).

Além do pré-tratamento térmico de acordo com a metodologia adaptada de Kim et al. (2006), para eliminação de células vegetativas metanogênicas e acidogênicas não formadoras de endósporos, a manutenção do sistema em circuito fechado por 48 h, com concentração de glicose de 4000 mg.L^{-1} , pode ter favorecido o desempenho dos reatores, além do fato de ter passado pela etapa de adaptação à glicose durante esta fase.

A Figura 5.5 ilustra uma comparação entre os três reatores com a médias dos pH afluente e efluente no TDH empregados.

Não houve adição de um sistema tamponante nos reatores para o controle de pH. Os procedimentos realizados para eliminar novas ocorrências de microrganismos fermentativos no afluente foram realizar a troca da água residuária e utilizar álcool etílico 70%, como um

método de assepsia, nas lavagens do reservatório de armazenamento da água residuária, diariamente.

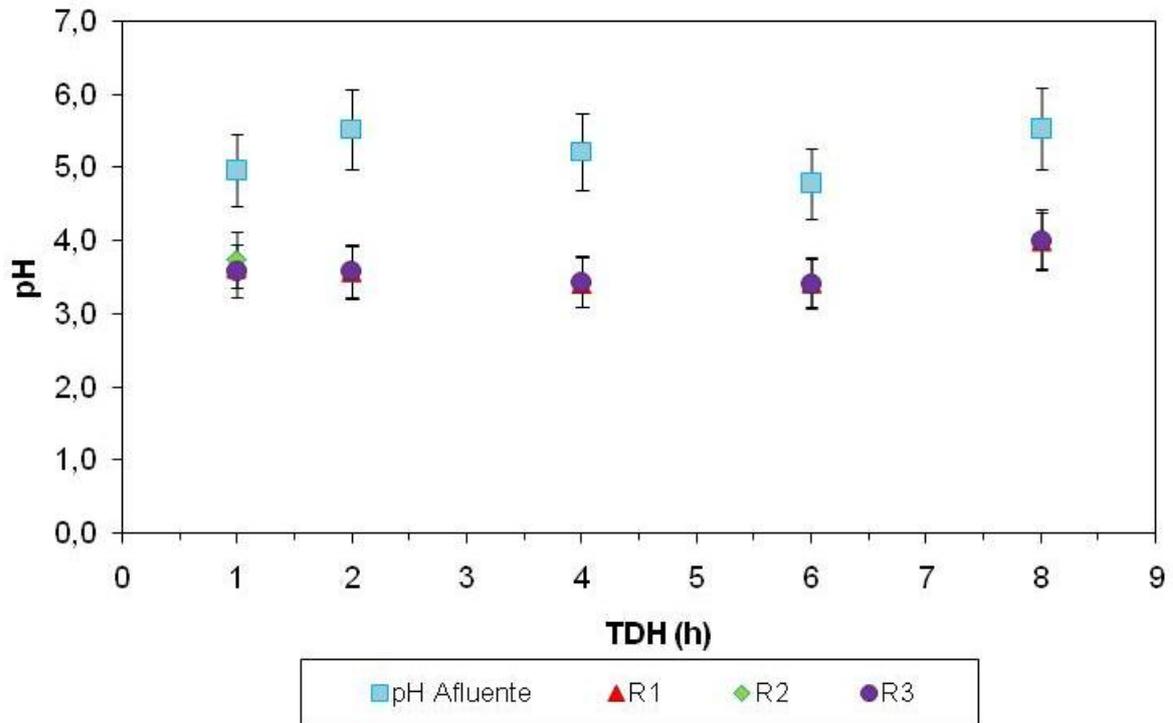


Figura 5.5 – Comparação entre o pH afluente médio e os pH efluentes médios no R1 (poliestireno), no R2 (pneu) e no R3 (PET) em diferentes TDH.

Pela Figura 5.5, pode-se dizer que a redução do TDH não influenciou no pH efluente de nenhum reator. O pH afluente dos reatores se manteve em torno de 5,0 e o pH efluente em torno de 3,5, em todas as fases de operação.

Para assegurar que a entrada de água residuária no sistema apresentasse um pH na faixa entre 6,0 e 7,0, para favorecer a produção de hidrogênio, vários pesquisadores utilizaram compostos alcalinizantes, como bicarbonato de amônia e bicarbonato de sódio (CHANG et al., 2002; LEE et al., 2003; WU, et al., 2003; LIN et al., 2006, WU et al., 2006; MOHAN et al., 2007). No entanto, alguns outros estudos mesmo utilizando compostos alcalinizantes, trabalharam com baixo pH (CHANG e LIN, 2004; MOHAN et al., 2007; LEITE et al., 2008).

Alguns autores não utilizaram compostos alcalinizantes e trabalharam com baixo pH (SHIDA et al, 2009; AMORIM et al., 2009). Essa contradição é observada na literatura quanto ao pH ideal para a produção de hidrogênio. Observou-se também, através da literatura, que pH baixo, como o caso deste trabalho é mais favorável à produção de etanol, o que notou-se neste pesquisa, em que os reatores foram operados com pH efluente em torno de 3,5 e houve uma alta produção de etanol, o que será discutidos posteriormente nos tópicos a seguir.

Wu et al. (2003) utilizando RALF e sacarose como substrato mantiveram pH entre 5,8 e 6,8 . Chen et al. (2005) utilizando diferentes configurações de reatores e sacarose como fonte de carbono chegaram à conclusão que o pH 5,0 foi o melhor para a produção de hidrogênio. Fan et al. (2004) estudando reatores em batelada e sacarose como fonte de carbono e Fang et al. (2002) pesquisando CSTR com glicose como fonte de carbono obtiveram um pH de 5,5 como ótimo para a produção de hidrogênio. Khanal et al. (2004) com reatores em batelada e sacarose como fonte de carbono também obtiveram pH ótimo de 5,5 para a produção de hidrogênio, porém, para a produção de ácidos orgânicos voláteis (ácido acético e ácido butírico), o pH ótimo foi entre 3,0 e 4,0. Wu et al. (2006) em RALF e reator anaeróbio de leito fluidizado com “draft tubo”, com sacarose como fonte de carbono controlaram o pH entre 6,4 e 7,0. Nestes estudos observou-se uma rota metabólica mais propensa à produção de ácido butírico e hidrogênio, diferentemente deste estudo, em que a rota predominante foi a etanólica.

Entretanto, para Mu et al. (2006) utilizando reator UASB e sacarose como fonte de carbono, o pH ótimo para a produção de hidrogênio foi de 4,2. Zhang et al. (2007), utilizou pH 4,0, Shida et al. (2009), pH entre 3,47 e 4,39 e Amorim et al. (2009) pH entre 3,68 e 4,05, ambos em reatores anaeróbios de leito fluidizado e glicose como fonte de carbono. Guo et al. (2008) não utilizaram controle de pH para minimizar custos com alcalinizantes, obtendo um pH efluente em torno de 4,42 para produção de hidrogênio. Também neste estudo não houve

adição de alcalinizantes, como bicarbonato de sódio, por exemplo e o pH se manteve em torno de 3,5. Os metabólitos solúveis dominantes no estudo destes pesquisadores foram ácidos acético e butírico, com uma baixa produção de etanol, o que pode indicar que as rotas dominantes foram dos ácidos acético e butírico.

Pesquisando lactose, soro de leite de glicose como fonte de carbono, Davila-Vazquez et al. (2008) pesquisaram o efeito do pH, entre 3,88 e 8,12. Para a lactose, pH de 7,5 foi o melhor para produção de hidrogênio, para o soro de leite, o melhor foi 6,0 para rendimento de produção de hidrogênio e 7,5 para produção volumétrica de hidrogênio. Para a glicose, o melhor pH foi de 7,5 para o rendimento de produção de hidrogênio e de 8,12 para a produção volumétrica de hidrogênio.

Mohan et al. (2007) utilizando ensaios em batelada e compostos químicos de águas residuárias como fonte de carbono verificaram que a queda do pH de 6,0 para 4,5 foi ideal para o funcionamento das bactérias acidogênicas e ao mesmo tempo para a inibição da atividade das arqueias metanogênicas.

Os resultados obtidos neste estudo para produção de hidrogênio foram próximos aos de Wu et al. (2003), Lin et al. (2006), Wu et al. (2006), em condições de pH favoráveis à produção de hidrogênio como relatado por Fang e Liu (2002).

É importante ajustar o pH na produção de hidrogênio devido aos efeitos do pH na atividade da hidrogenase e dos caminhos metabólicos (FANG e LIU, 2002).

De acordo com Wang e Wan (2009), o pH é um fator que influencia a produção de hidrogênio, já que pode afetar a atividade da hidrogenase assim como o metabolismo das rotas metabólicas. Assim, pode-se afirmar que Barros et al. (2010 e 2011), com pH em torno de 5,5 e adição de alcalinizante também obtiveram produções de hidrogênio parecidas com este estudo. Entretanto, utilizando pH inferior a 4,0, sem uso de alcalinizante, Zhang et al. (2007), Shida et al. (2009) e Amorim et al. (2009) também alcançaram produções de

hidrogênio similares a este estudo. Assim, pode-se afirmar que o uso ou não de alcalinizantes pouco afeta a produção de hidrogênio. A não controle do pH é mais favorável à produção de etanol, como será visto nos tópicos a seguir.

5.3. Metabólitos produzidos

As Figuras 5.6 a 5.8 apresentam o comportamento dos metabólitos produzidos no R1 (poliestireno), no R2 (pneu) e no R3 (PET) dos diferentes TDH empregados.

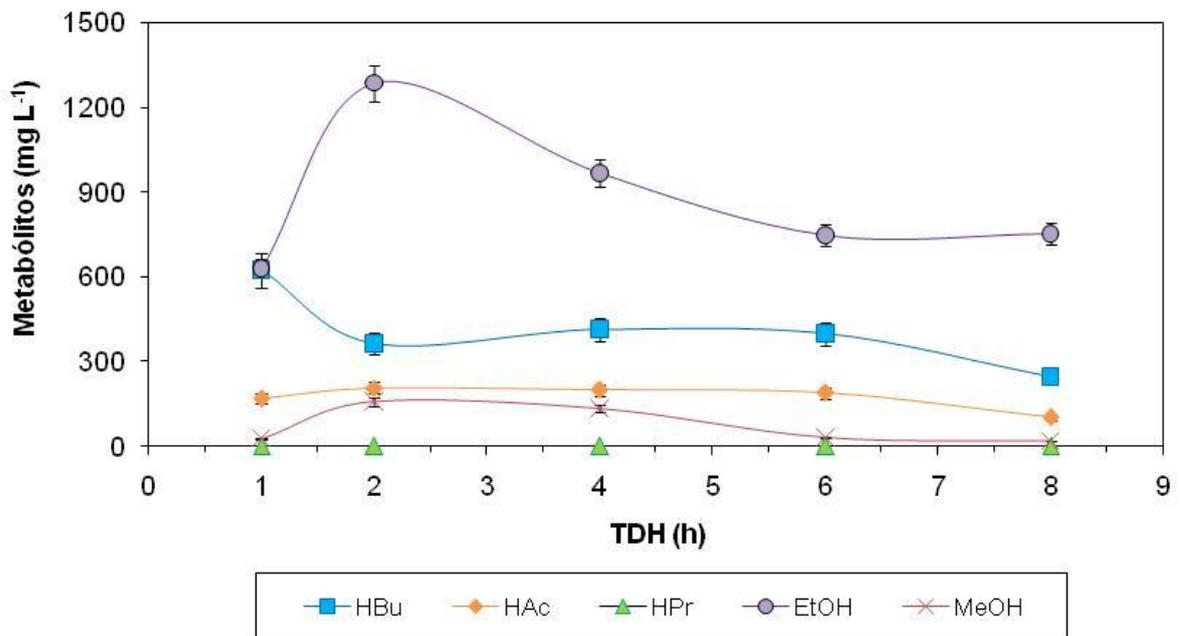


Figura 5.6 – Concentração de ácidos acético (HAc), butírico (HBu), propiônico (HPr), etanol (EtOH) e metanol (MeOH) produzidos pelo reator anaeróbico de leito fluidizado contendo poliestireno como material suporte (R1) nos diferentes TDH.

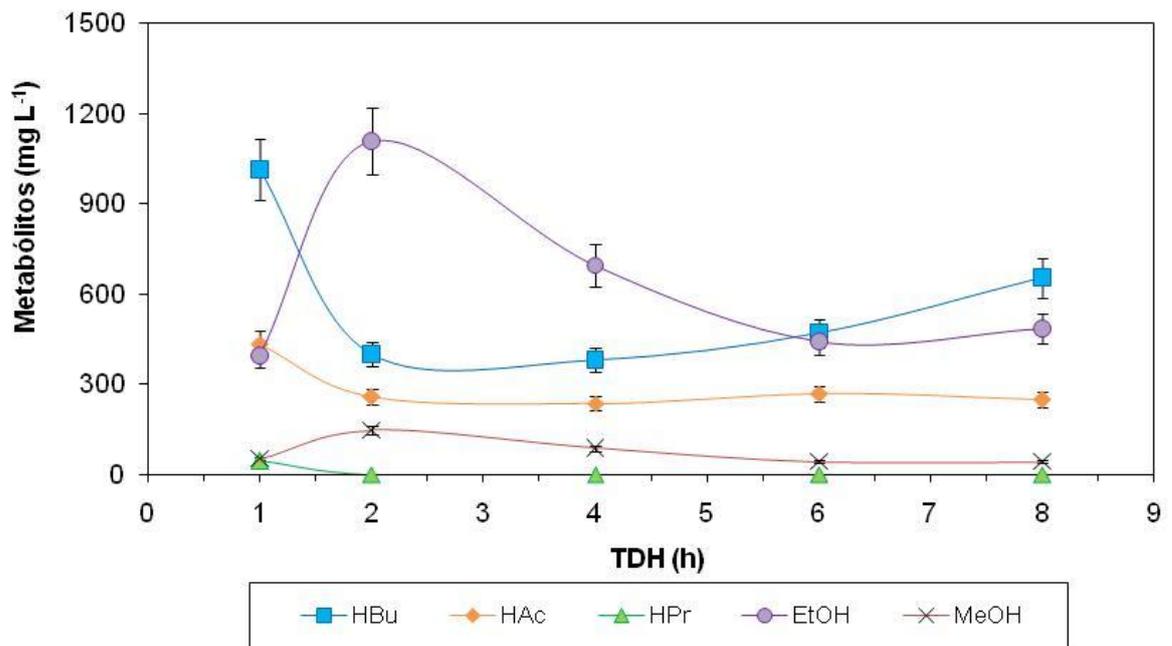


Figura 5.7 – Concentração dos ácidos acético (HAc), butírico (HBu), propiônico (HPr), etanol (EtOH) e metanol (MeOH) produzidos pelo reator anaeróbio de leito fluidizado contendo pneu inservível triturado como material suporte (R2) nos diferentes TDH.

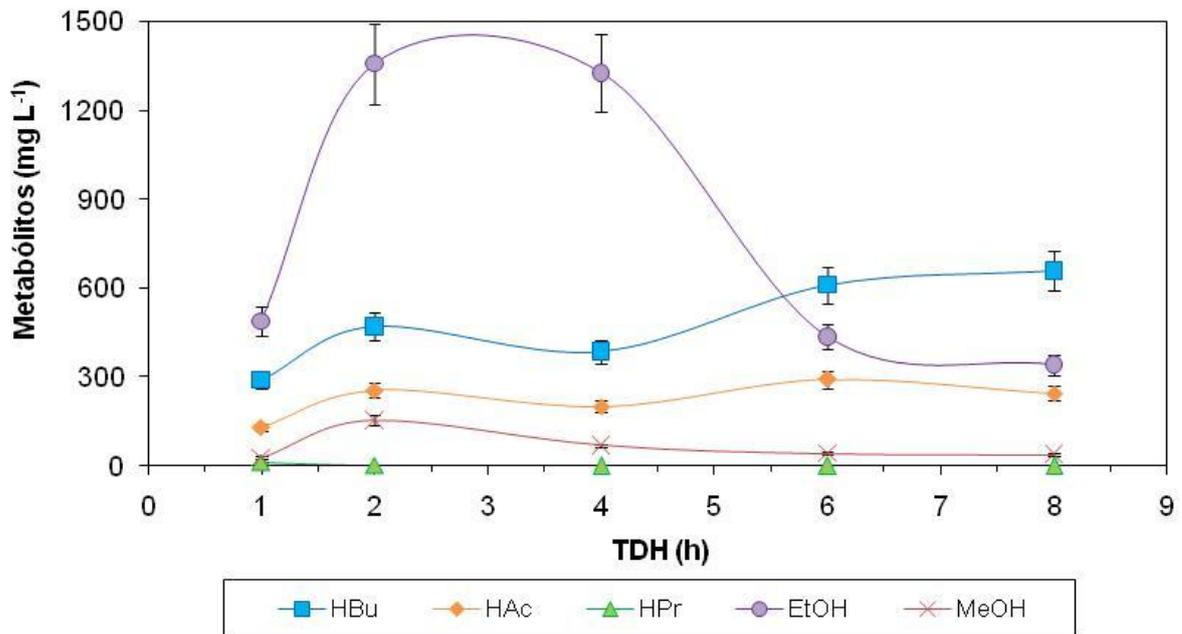
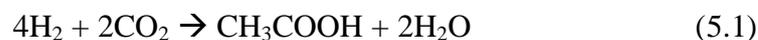


Figura 5.8 – Concentração dos ácidos acético (HAc), butírico (HBu), propiônico (HPr), etanol (EtOH) e metanol (MeOH) produzidos pelo reator anaeróbio de leito fluidizado contendo PET como material suporte (R3) nos diferentes TDH.

Nota-se uma predominância nos três reatores, em todas as fases, de ácido acético (HAc), ácido butírico (HBu), etanol (EtOH), metanol (MeOH) e uma baixa produção de ácido

No R1 (poliestireno) e no R3 (PET), a produção de ácido acético foi praticamente constante em todos os TDH. Porém, no R2 (pneu), no TDH de 1 h há o aumento de ácido acético, porém, houve a redução de produção de hidrogênio neste TDH. De acordo com Antonopoulou et al. (2010), uma explicação pode ser que uma considerável parte do hidrogênio produzida é provavelmente consumida por microrganismos consumidores de hidrogênio, como bactéria homoacetogênica que pode ser estabelecida no reator, produzindo ácido acético [Eq. (5.1)].



A homoacetogênese pode explicar o decaimento de produção de hidrogênio no TDH de 1 h no R2, já que pode estar havendo o consumo de hidrogênio e gás carbônico e produção de ácido acético no TDH de 1 h no R2, como visto das Figuras 5.2, 5.3 e 5.7.

A presença de ácido propiônico no sistema variou em todos os reatores (0 a 44,01 mg.L⁻¹). Essa constatação pode reforçar o aumento do rendimento da produção de hidrogênio, visto que se a rota de produção de ácido propiônico for favorecida resulta em consumo de 2 moles de H₂ para cada 2 moles de ácido propiônico produzido [Eq. (5.2)], podendo ainda ser relacionado com a provável inibição ocasionada pelo baixo pH e sensibilidade a curtos TDH, o qual pode ser reportado por outros pesquisadores (ZHANG et al., 2007).



Segundo Koskinen et al. (2008), a produção de H₂ a partir de carboidratos ocorre quando há a produção de acetato ou butirato, enquanto a produção de etanol resulta na não produção de H₂. Isso implica que quando a produção de H₂ é otimizada (produção de acetato), a produção de etanol diminui e vice-versa. Dependendo no microrganismo, os rendimentos de etanol e hidrogênio variam substancialmente, de traços a pequenas quantidades. Estes autores também obtiveram etanol como principal metabólito solúvel.

Wu et al. (2010) com a redução do TDH observaram que houve o aumento da produção de ácido acético e redução da produção de etanol, pois a produção de álcool foi limitada, já que é uma rota desfavorável à produção de H₂ [Eq. (5.3)]. Abreu et al. (2009) observaram que a presença de grande quantidade de etanol e pequenas quantidades de acetato, além da rota fermentativa butirato/etanol, podem ser a razão para o baixo rendimento de hidrogênio em sua pesquisa.

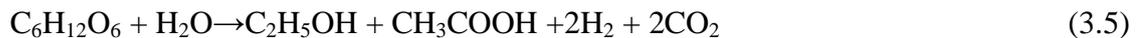


Cheong e Hansen (2006) e Antonopoulou et al. (2010) afirmaram que a seleção do pH apropriado é crucial para a produção de hidrogênio, devido ao efeito do pH na atividade hidrogenase a nas rotas metabólicas. Segundo estes autores, quando a produção de etanol aumentou rapidamente, a produção de hidrogênio foi interrompida. Além disso, esses autores testaram diferentes valores de pH (4,6; 5,7 e 6,8) e no pH de 4,6 houve uma maior produção de etanol e uma menor produção de ácido acético. Em pH de 6,8, houve o aumento de produção de ácido acético e uma redução de etanol, o que, segundo os autores, o etanol pode ter sido usado para produzir ácido acético.

Ren et al. (1997), Hwang et al. (2004), Wang et al. (2006) e Ren et al. (2007), Guo et al. (2008), Antonopoulou et al. (2010) obtiveram uma maior produção de etanol em pH inferior a 4,5, o que também pode explicar as altas concentrações de etanol neste estudo, em que o pH efluente foi em torno de 3,5, principalmente no TDH de 2 h. De acordo com Ren et al. (2007), a fermentação etanólica ocorre em $\text{pH} < 4,5$, pois favorece o desenvolvimento de microrganismos *Fusobacterium* sp., que são propícios para o produção de etanol.

A complexa distribuição de VFA pode ser resultado da estrutura diferente da comunidade microbiana e de diferentes tipos de fermentação no reator (KOSKINEN et al., 2007). Segundo Ren et al. (1997), a fermentação etanol produz ácido acético e etanol e pode preservar o balanço NADH/NAD^+ . Etanol é o principal produto da dessa fermentação e é neutro em pH em torno de 4,5. Assim, esse tipo de fermentação reduzirá produtos ácidos e fará suave e rapidamente a fermentação ácida. Por isso, isso minimiza a produção de ácido propiônico, o que melhora a estabilidade global da operação do tratamento anaeróbio. Na regeneração de NADH, a reação é também conduzida a converter piruvato a ácidos propiônico e lático, ou converter acetil-CoA a etanol e ácido butírico. De acordo com Wu et

al. (2007), espécies Clostridial (*Cl. acetobutylicum*) podem produzir hidrogênio e etanol/ácidos orgânicos (acetato), mas quando mais etanol e menos acetato são produzidos, a razão intracelular NADH/NAD⁺ reduz, levando a uma baixa produção de rendimento de H₂. Entretanto, neste trabalho observou-se uma produção simultânea de hidrogênio e etanol, provavelmente pela rota alternativa da Equação (3.5). Ainda conforme os mesmos autores, deve-se notar que a estrutura da comunidade bacteriana de uma cultura mista produzindo hidrogênio e etanol em uma quantidade tão importante pode ser muito diferente de uma cultura que produz apenas hidrogênio, pois a produção de hidrogênio e etanol pode ser eventos competitivos para uma perspectiva de transferência de elétrons metabólica para geração de energia.



Hwang et al. (2004) afirmaram que a rota alcoólica é mais observada com fermentação de carboidratos por levedura, que não produz hidrogênio, enquanto a rota ácida mista progride via vários microrganismos como *Escherichia coli* e *Enterobacter*, e produz hidrogênio. Segundo Cheong e Hansen (2006), *Clostridium kluyveri* pode desempenhar a fermentação ácida etanol-acético, que produz ácido butírico e hidrogênio com uma significativa quantidade de ácido capróico, etanol e ácido acético. *Clostridium sphenoides* fermenta algum substrato a etanol, ácido acético, hidrogênio, dióxido de carbono e uma pequena quantidade de ácido láctico, sem produção de ácido butírico. Com a redução do pH, houve o início de uma fase de produção de solventes, como o etanol (CHEONG e HANSEN, 2006). Estes autores ainda relataram que ácidos graxos voláteis não foram tão produzidos no crescimento em batelada de *C. acetobutyricum* e n-butanol, acetona e etanol apareceram como novos produtos da fermentação. De acordo com Ren et al. (2007), a maioria da fermentação

etanol inclui *Bacteroides sp.*, *Zymomonas sp.* e *Fusobacterium sp.* com potencial redox estrito para bactéria anaeróbia que sobrevive em pH entre 3 e 9. *Fusobacterium sp.* pode sobreviver em diferentes condições e produzir um alto teor de etanol e ácido butírico em pH 4,0. Cada tipo de fermentação foi verificada por diferentes populações microbianas e cada população alcançou o clímax em diferentes estágios e tipos de fermentação. A ecologia clássica acredita que a clímax da comunidade microbiana representa um estágio de equilíbrio (REN et al., 2007).

A Figura 5.9 apresenta o rendimento de produção de hidrogênio e o rendimento de produção de etanol em função do TDH para ambos os reatores.

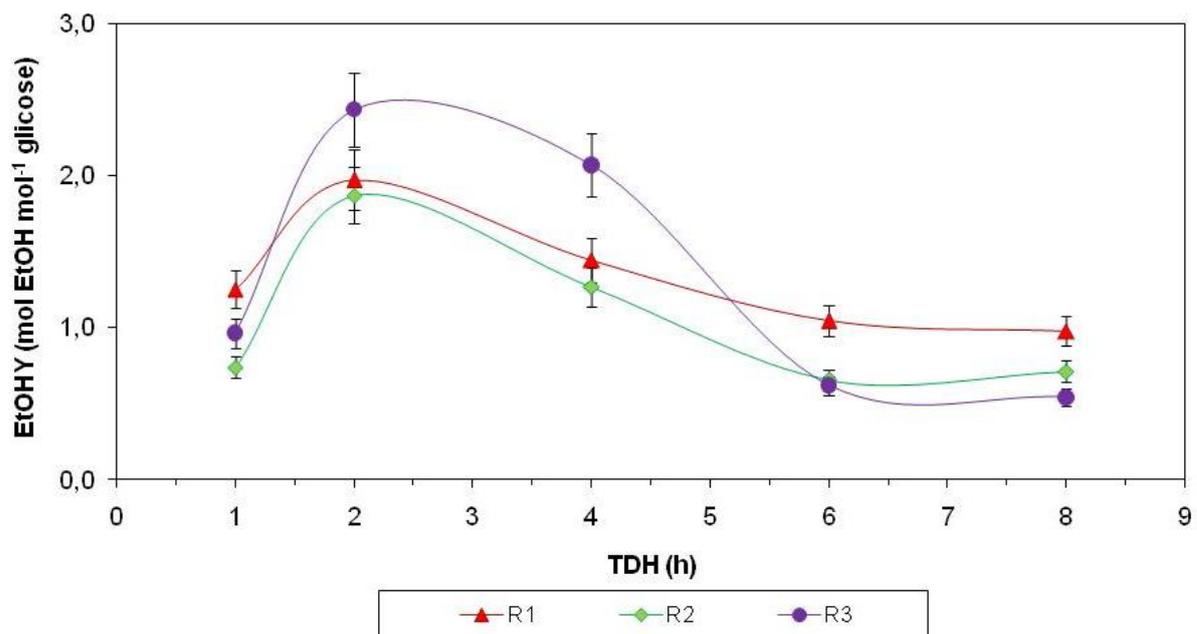


Figura 5.9 - Rendimento de produção de etanol em função do TDH no R1 (poliestireno), no R2 (pneu) e no R3 (PET).

De acordo com o estudo de Wu et al. (2007), Koskinen et al. (2008) e Wang et al., (2008), a produção de hidrogênio reduz com o aumento da produção de etanol. Rendimentos de H₂ e etanol foram de um modo geral inversamente proporcionais, independente do tipo de substrato ou do tipo do biorreator (WU et al., 2007). Entretanto, neste estudo a produção de

hidrogênio aumentou com o aumento da produção de etanol (Figura 5.9). Observa-se pelas Figuras 5.3 e 5.9 que no R1 (poliestireno), no TDH de 2 h, o rendimento de EtOH aumentou 1,37 vez, enquanto o RPH aumentou 1,02 vez. No R2 (pneu), no mesmo TDH, o rendimento de EtOH aumentou 1,47 vez, ao passo que o RPH aumentou 1,13 vez. Entretanto, no R3 (PET), no TDH de 2 h, o rendimento de EtOH cresceu 1,17 vez e o RPH reduziu 0,86 vez.

No R3, no TDH de 2 h, o EtOH_Y é maior que o teórico (2 moles), ou seja, 2,43 mol EtOH⁻¹ glicose, o que pode ser explicado pela homoacetogênese, que também leva à produção de etanol, tornando o rendimento do etanol produzido maior que o teórico.

Na Figura 5.10, observa-se a relação entre o rendimento de produção de H₂ e o rendimento de produção de EtOH (YH₂/YEtOH – seletividade) nos três reatores para ambos os TDH.

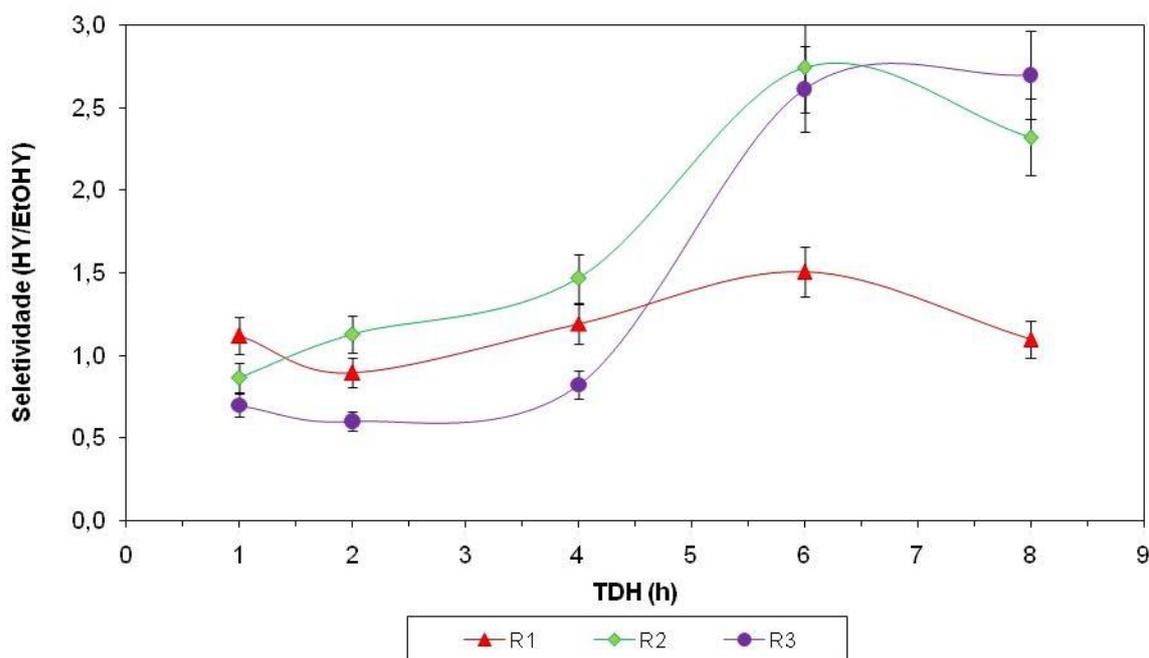
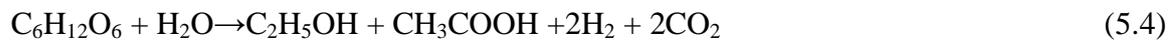


Figura 5.10 – Relação entre o rendimento de produção de H₂ e o rendimento de produção de EtOH (YH₂/YEtOH – seletividade) nos três reatores para ambos os TDH.

Pela Figura 5.10, observa-se que no R1 (poliestireno), houve o favorecimento da produção de hidrogênio em relação à produção de etanol em todos os TDH. No R2, até o

TDH de 2 h, houve o favorecimento da produção de hidrogênio em relação à produção de etanol, no TDH de 1 h houve um favorecimento da produção de etanol em relação ao hidrogênio. Já no R3 (PET), até o TDH de 6 h, houve o favorecimento da produção de hidrogênio em relação à produção de etanol, no TDH de 4, 2 e 1 h houve um favorecimento da produção de etanol em relação ao hidrogênio. Uma hipótese para o R3 ser melhor para a produção de etanol é que o PET possa ter selecionado um determinado tipo de microrganismo favorável à produção deste biocombustível.

De acordo com Hwang et al. (2004) e Zhu et al. (2009), há várias rotas para produção de ácidos orgânicos, etanol e hidrogênio [Eq. (5.4), (5.5) e (5.6)], além da produção de etanol através da Equação (3.4), ele também pode ser obtido por outra rota [Equação (5.4)] (Gaudy e Gaudy, 1980):



A partir da Equação (5.4), pode-se constatar que é possível produzir hidrogênio e etanol, pois por esta rota, eles são produzidos simultaneamente. Além disso, há produção de ácidos acético e butírico por outras rotas metabólicas, como indicado nas Equações (5.5) e (5.6).

Nesse contexto, Wu et al. (2007) pesquisaram a viabilidade da produção simultânea destes dois biocombustíveis, utilizando sacarose, glicose e frutose como fontes de carbono.

Para RALF, elastômero polietileno-octano de material suporte, temperatura de 35°C, pH entre 5,8 e 6,8 e sacarose, frutose e glicose como fonte de carbono, com uma concentração de 20 gDQO/L, concluíram que a glicose foi melhor para produção de hidrogênio (1,04 mol H₂/mol hexose) e a frutose para produção de etanol (0,65 mol EtOH/mol hexose). Entretanto, ambas as fontes de carbono se mostraram adequadas para produção simultânea de hidrogênio e etanol. E neste estudo, para os três reatores, houve uma maior produção de hidrogênio e de etanol quando comparado ao estudo de Wu et al. (2007).

Barros et al. (2010 e 2011) utilizando os mesmos materiais suporte e condições operacionais iguais, porém com controle de pH em torno de 5,5, observaram uma produção de hidrogênio melhor no reator com pneu com material suporte (2,25 mol H₂⁻¹.mol glicose) no TDH de 2 h e uma melhor produção de etanol nos reatores com poliestireno e PET como matérias suporte (400 mg.L⁻¹), no TDH de 6 h. Nesta pesquisa, sem controle de pH, também observou-se uma melhor produção de hidrogênio no reator com pneu como material suporte (2,11 mol H₂⁻¹.mol glicose) no TDH de 2 h. Porém, para produção de etanol, o reator com PET foi muito superior (1941 mg.L⁻¹) no TDH de 2 h. Assim, já se pode constatar, através desta pesquisa e comparando com Barros et al. (2010 e 2011), que o não controle do pH é mais favorável à produção simultânea de hidrogênio e etanol.

Além disso, Buitrón e Carvajal (2010) afirmam que em temperatura em torno de 25°C, há mais produção de etanol do que em temperatura em torno de 35°C, o que pode explicar a alta produção de etanol nesse estudo, já que a temperatura foi em torno da ambiente (25°C). No estudo de Barros et al. (2010 e 2011), os pesquisadores operaram os reatores com temperatura de 30°C e obtiveram concentrações menores de etanol, em torno de 400 mg. L⁻¹ e neste trabalho a concentração máxima de etanol foi de 1288 mg. L⁻¹. Assim, uma temperatura pode também ser a causa de uma maior produção de etanol do que em estudos semelhantes.

Outra questão importante a ser analisada é a relação HAc/HBu, que é frequentemente usada como um indicador da extensão da produção de hidrogênio (DANKO et al., 2008). Essa relação é apresentada na Figura 5.11, nos três reatores, em ambos os TDH.

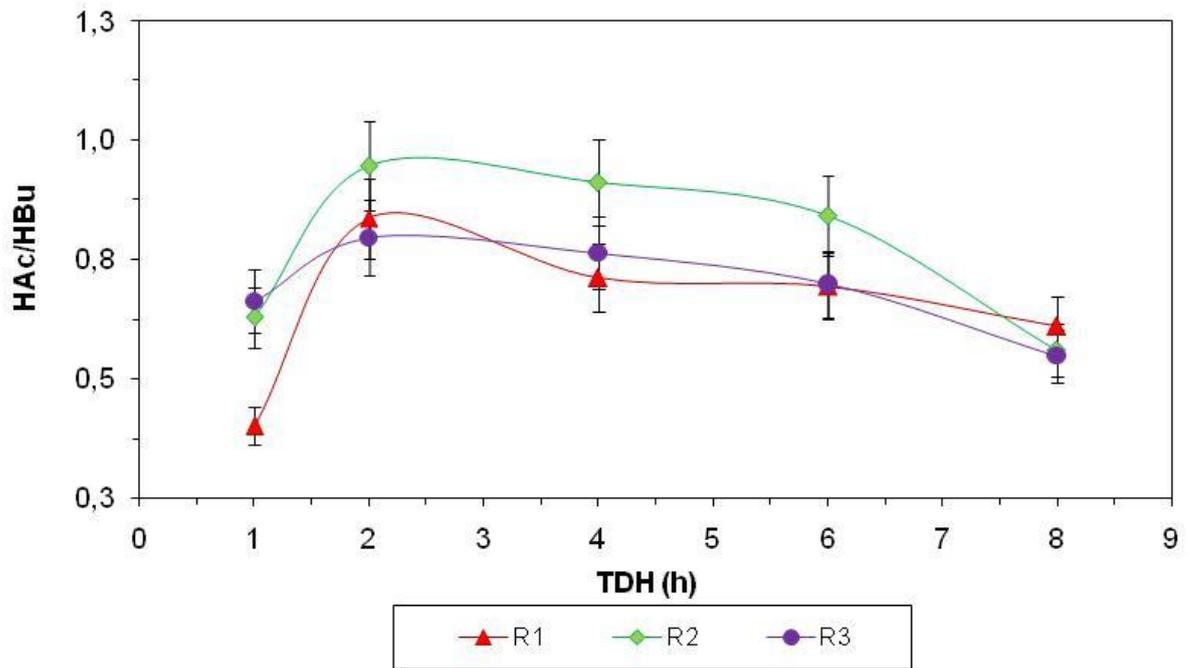


Figura 5.11 - Relação HAc/HBu, nos três reatores, em ambos os TDH.

Em processos mesofílicos usando comunidades microbianas, um ótimo desempenho da produção de hidrogênio por fermentação [Eq (5.7) e (5.8)] é dada frequentemente por uma alta relação HAc/HBu (KOSKINEN et al., 2007).



Neste estudo, a relação HAc/HBu no R1 (poliestireno) aumentou de 0,61 a 0,84 quando o TDH foi reduzido de 8 h para 2 h. Ao se reduzir o TDH para 1 h, esta relação reduziu para 0,40 (Figura 5.11). Já no R2 (pneu), esta relação aumentou de 0,56 para 0,95 quando o TDH foi reduzido de 8 h para 2 h e diminuiu para 0,63 ao se diminuir o TDH para 1 h (Figura 5.14). O R3 (PET) apresentou comportamento semelhante, sendo a relação aumentada de 0,55 para 0,80 com a redução do TDH de 8 h para 2 h e diminuindo com a redução do TDH para 1 h para 0,66 (Figura 5.11). O aumento da relação HAc/HBu com a redução do TDH também foi observado em outros estudos (CHANG et al., 2002; LEE et al., 2004; LIN et al., 2006; AMORIM et al., 2009, BARROS et al., 2010). Entretanto, Skonieczny e Yargeau (2009) não observaram essa correlação entre ácidos acético e butírico e mesmo assim houve a produção de hidrogênio e etanol.

Desta maneira, pode-se afirmar que apesar da relação HAc/HBu ser determinante na produção de hidrogênio (DANKO et al., 2008), ela não pode ser analisada como único fator para produção deste gás, mas sim deve ser analisado um conjunto de condições operacionais, como pH, temperatura, tratamento e concentração do inóculo (KAPDAN e KARGI, 2006; DAS e VERZIROGLU, 2008; WANG e WAN, 2009).

Assim, constata-se que para produção de hidrogênio, o melhor reator foi o R2 (pneu) e para a produção de etanol, o R3 (PET), ambos no TDH de 2 h. Isto pode ter acontecido devido a mudanças de rotas metabólicas causadas por estes dois suportes e até mesmo seleção de diferentes tipos de microrganismos, mais favoráveis à produção de hidrogênio ou à produção de etanol.

5.4. Biomassa, carboidratos, proteínas e avaliação da adesão microbiana aos materiais suporte

As Figuras 5.12, 5.13 e 5.14 ilustram os resultados obtidos da quantidade de biomassa aderida aos suportes em relação à massa de partícula, assim como a produção volumétrica de hidrogênio e o rendimento de produção de hidrogênio ao longo do TDH empregado, respectivamente no R1 (poliestireno), no R2 (pneu) e no R3 (PET).

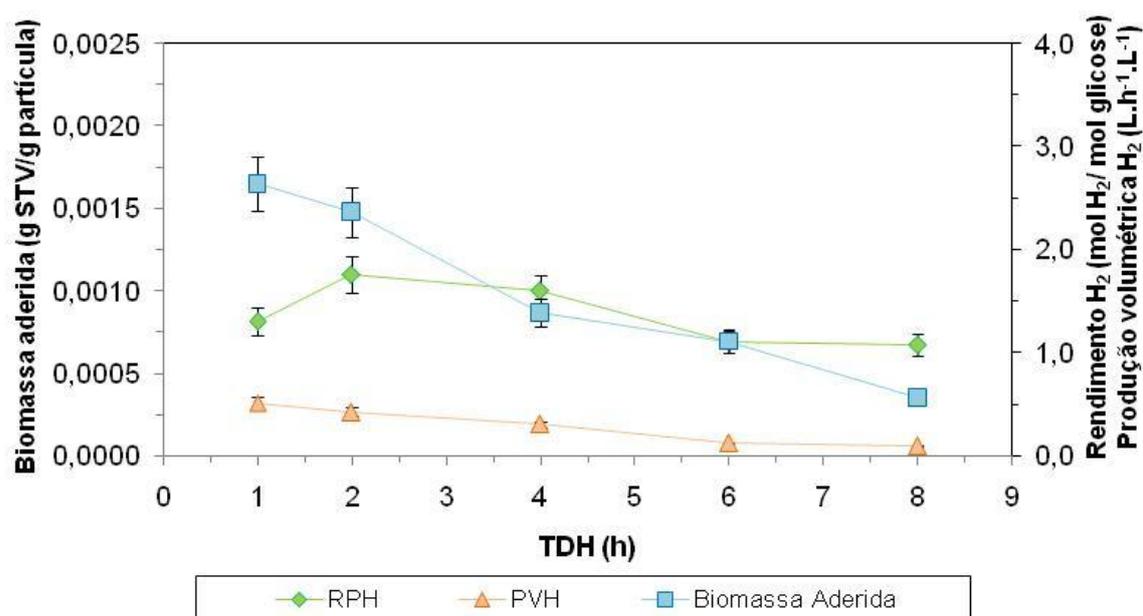


Figura 5.12 – Crescimento da biomassa aderida, rendimento de produção de hidrogênio e produção volumétrica de hidrogênio no R1 (poliestireno), em função do TDH.

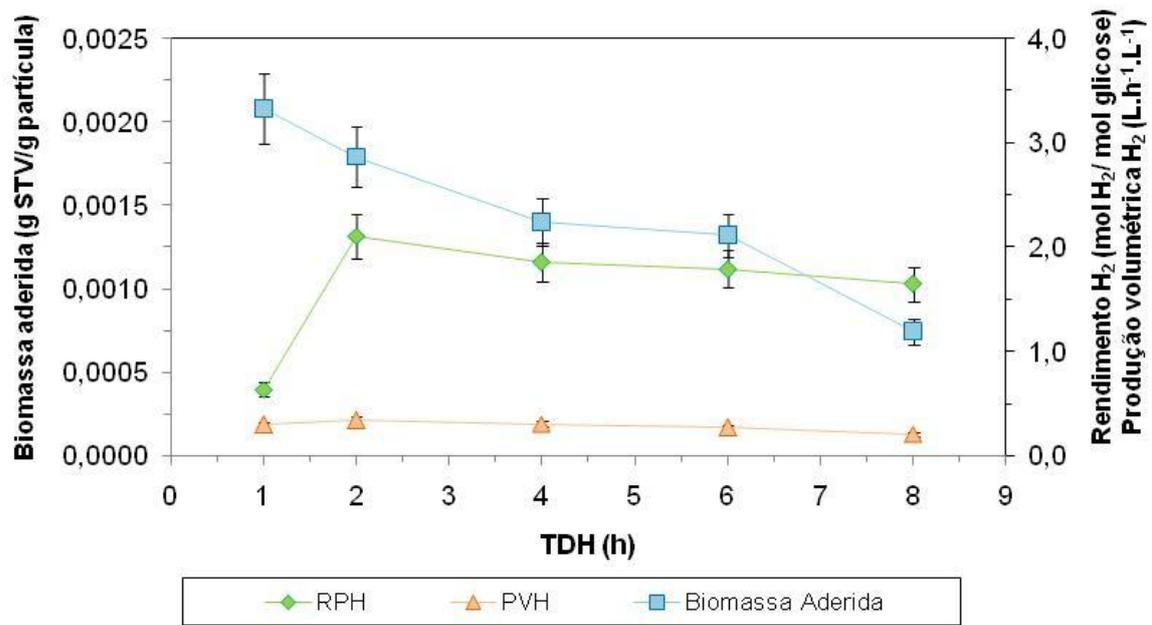


Figura 5.13 – Crescimento da biomassa aderida, rendimento de produção de hidrogênio e produção volumétrica de hidrogênio no R2 (pneu), em função do TDH.

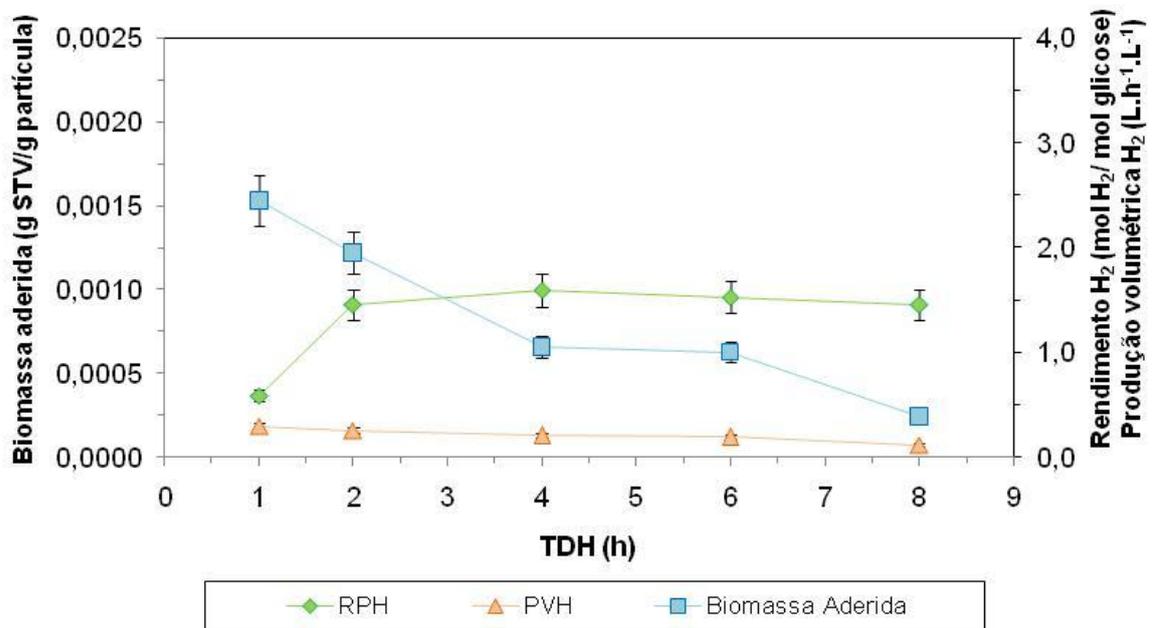


Figura 5.14 – Crescimento da biomassa aderida, rendimento de produção de hidrogênio e produção volumétrica de hidrogênio no R3 (PET), em função do TDH.

Pelas Figuras 5.12, 5.13 e 5.14, observa-se que o R2 (pneu) apresentou maior quantidade de biomassa aderida por massa de suporte (0,0021 g STV/g partícula) no TDH de 1 h. Essa constatação pode ser atribuída pelas características físicas do pneu triturado, o qual apresenta maior rugosidade (18%), contribuindo para a adesão microbiana. Essa maior quantidade de biomassa aderida no pneu triturado também pode explicar o melhor desempenho do reator contendo este material como suporte na produção de hidrogênio, já que pode haver uma quantidade maior aderida neste suporte de bactérias acidogênicas produtoras de hidrogênio.

De acordo com Barros et al. (2010), o acúmulo de biofilme sobre um suporte é um processo dinâmico, resultado de crescimento e desapego. A formação de biofilme é afetada por vários fatores externos, como composição e concentração do meio de alimentação, velocidade da fase líquida (tensão de cisalhamento), concentração de partículas, colisões partícula-partícula e colisões partícula-parede. Além disso, a natureza e as concentrações de substrato podem afetar o crescimento e a composição do biofilme.

Zhang et al. (2008) concluíram que a espessura do biofilme diminui com o aumento de biomassa granular no reator, devido à elevada produção de bactérias produtoras de hidrogênio. Se houver um aumento na espessura do biofilme, a fixação dos microrganismos no suporte pode se tornar mais fraca, sendo o biofilme separado do suporte por causa das colisões das partículas, deixando fragmento do biofilme nos suportes.

Assim, pode-se concluir que com o aumento da biomassa aderida aos suportes, houve uma elevada produção de microrganismos produtores de hidrogênio, podendo desta forma, se justificar o alto rendimento de hidrogênio no TDH de 2 h, cuja biomassa aderida foi maior. Além disso, similarmente a Barros et al. (2010), no aumento da biomassa com a redução do TDH pode ter ocorrido o aumento da espessura do biofilme aderido ao material suporte, que pode ter se tornado fraco. Assim, o biofilme pode ter se separado da partícula, causando a

redução da biomassa aderida no TDH de 1 h, o que resultaria na redução do RPH. Outra hipótese é a sobrecarga nos reatores, em que houve uma limitação na conversão de glicose, enquanto o PVH continuou a crescer e o TDH diminuir.

O melhor desempenho do reator contendo pneu (R1) também pode ser atribuído às características deste material suporte, que pode ser explicado por sua rugosidade ser maior (18,00%) que o poliestireno (14,59%) e o PET (10,23%). Essa maior quantidade de biomassa aderida no pneu triturado também pode explicar o melhor desempenho do reator contendo este material como suporte na produção de hidrogênio, já que pode haver maior quantidade aderida neste suporte de bactérias acidogênicas produtoras de hidrogênio. E ainda, por as partículas de pneu triturado serem mais rugosas que as de poliestireno e PET, essas rugosidades protegem o biofilme em desenvolvimento das forças de cisalhamento, permitindo uma colonização mais uniforme (BARROS et al., 2010).

Assim, pode-se afirmar que este estudo além de utilizar materiais baratos como suportes como poliestireno, pneu e PET, também reduziu custos com a não utilização de alcalinizantes para controle do pH, alcançando resultados satisfatórios para produção de hidrogênio e etanol como biocombustíveis

As Figuras 5.15, 5.16 e 5.17 mostram os polímeros extracelulares excretados na forma de carboidratos, a produção volumétrica de hidrogênio e o rendimento de produção de hidrogênio, respectivamente, no R1 (poliestireno), no R2 (pneu) e no R3 (PET), em função do TDH empregado.

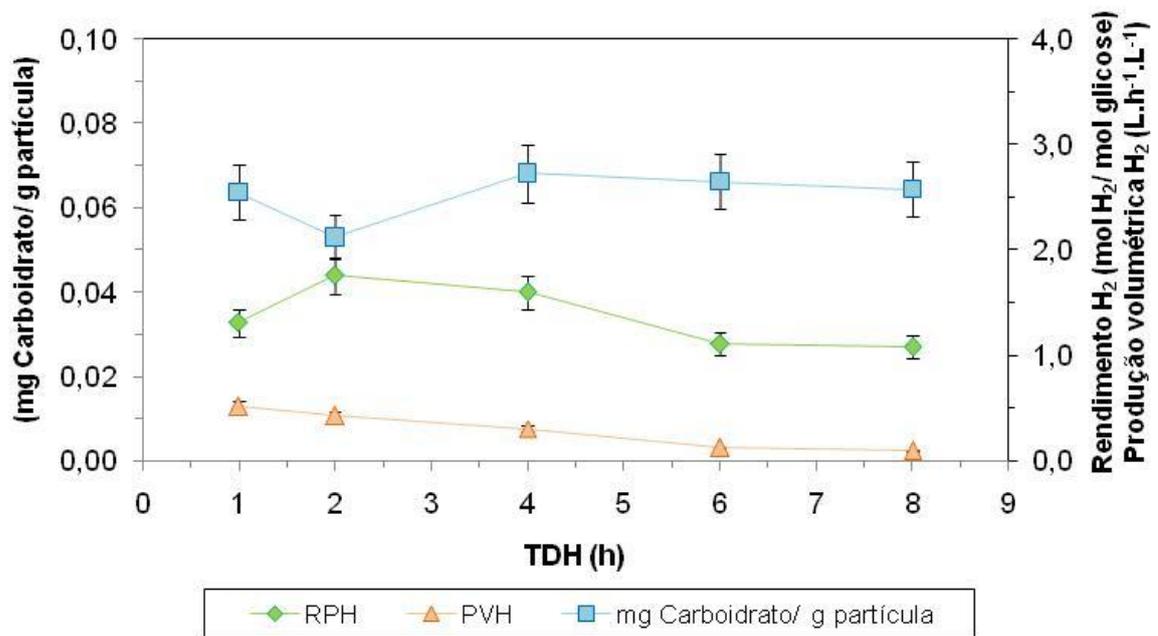


Figura 5.15 – Massa de polímeros extracelulares excretados na forma de carboidratos por grama de partícula, rendimento de produção de hidrogênio e produção volumétrica de hidrogênio no poliestireno (R1), em função do TDH.

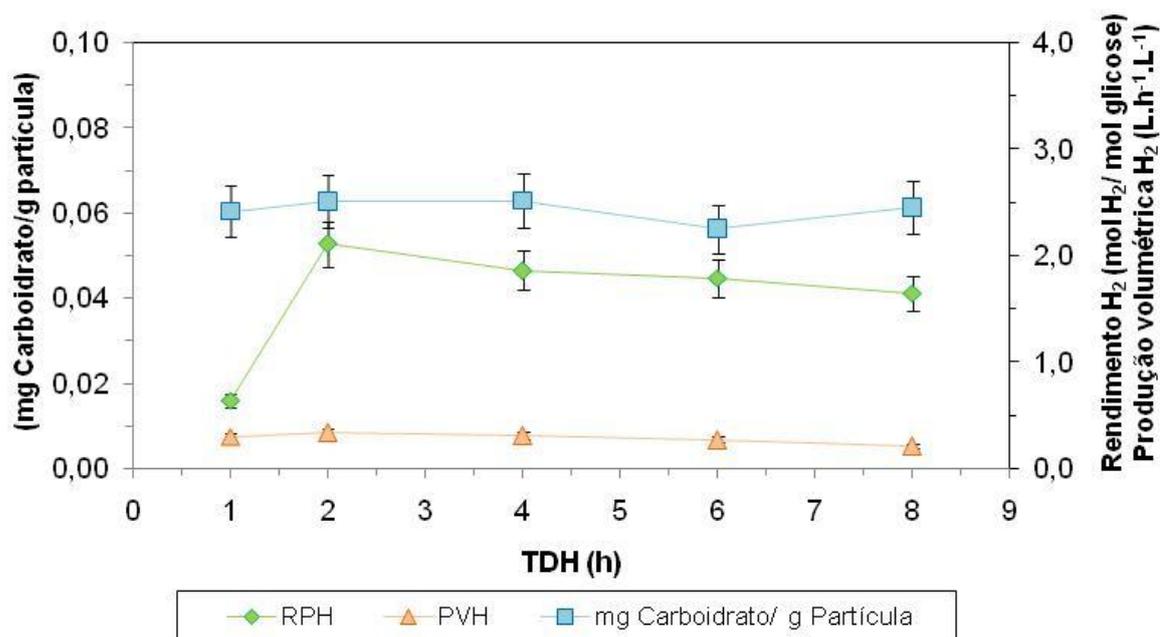


Figura 5.16 – Massa de polímeros extracelulares excretados na forma de carboidratos por grama de partícula, rendimento de produção de hidrogênio e produção volumétrica de hidrogênio no pneu triturado (R2), em função do TDH.

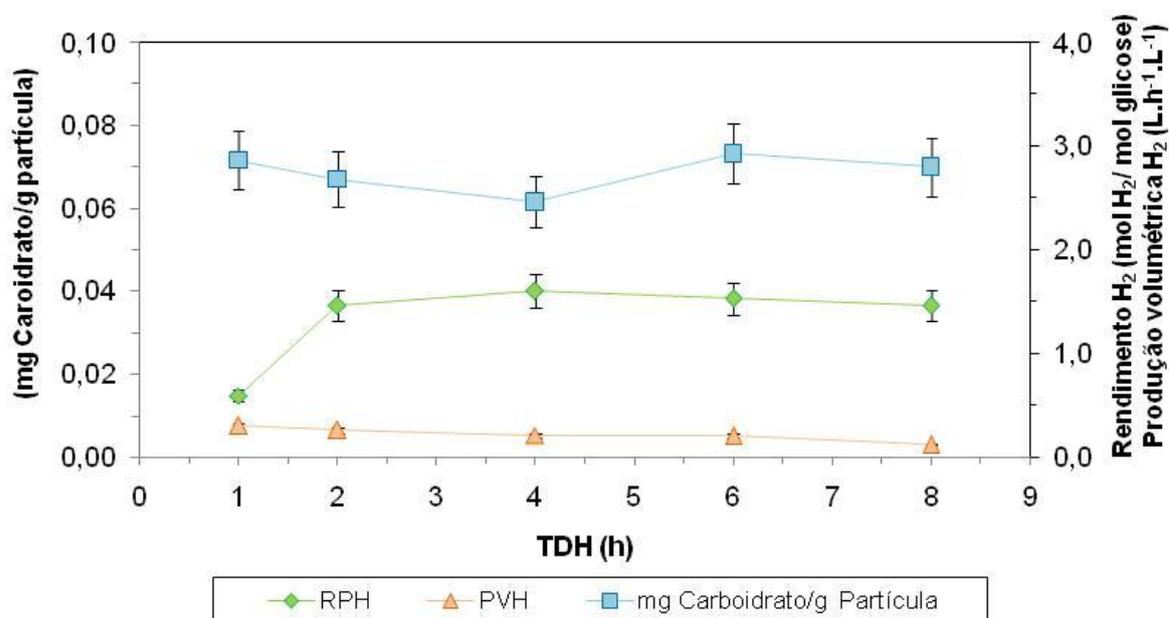


Figura 5.17 – Massa de polímeros extracelulares excretados na forma de carboidratos por grama de partícula, rendimento de produção de hidrogênio e produção volumétrica de hidrogênio no PET (R3), em função do TDH.

Nota-se que a formação de polímeros extracelulares excretados na forma de carboidratos não teve relação com o TDH em nenhum dos suportes.

No R1 (poliestireno) e no R2 (pneu), há um aumento da quantidade de carboidratos com a redução do TDH de 8 h para 4 h, depois há uma redução quando o TDH muda para 2 h, um aumento para 1 h.

No R2 (pneu), há um aumento da quantidade de carboidratos com a redução do TDH de 8 h para 4 h, depois há uma redução quando o TDH muda para 2 h, e novamente um aumento para 1 h. Não houve muita variação na produção de carboidratos ao longo do TDH no R3 (PET).

Os carboidratos excretados no poliestireno (R1) variaram entre 0,0531 e 0,0663 g carboidrato/g partícula, no pneu triturado (R2) entre 0,0563 e 0,0629 g carboidrato/g partícula e no PET (R3) entre 0,0617 e 0,0733 g carboidrato/g partícula.

Barros (2009), controlando o pH em torno de 5,5 também não observou relação na quantidade de carboidratos com a redução do TDH.

As Figuras 5.18, 5.19 e 5.20 demonstram os polímeros extracelulares excretados na forma de proteínas, a produção volumétrica de hidrogênio e o rendimento de produção de hidrogênio nos três diferentes suportes empregados: poliestireno (R1), pneu triturado (R2) e PET (R3), respectivamente, em função do TDH.

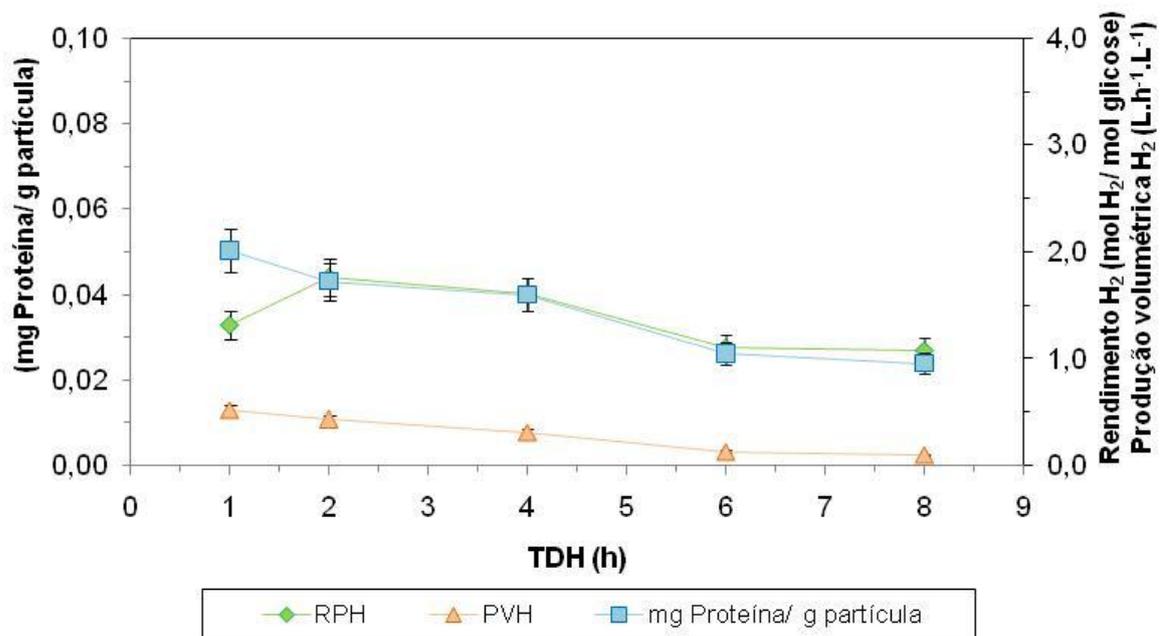


Figura 5.18 – Massa de polímeros extracelulares excretados na forma de proteínas por grama de partícula, rendimento de produção de hidrogênio e produção volumétrica de hidrogênio no poliestireno (R1), em função do TDH.

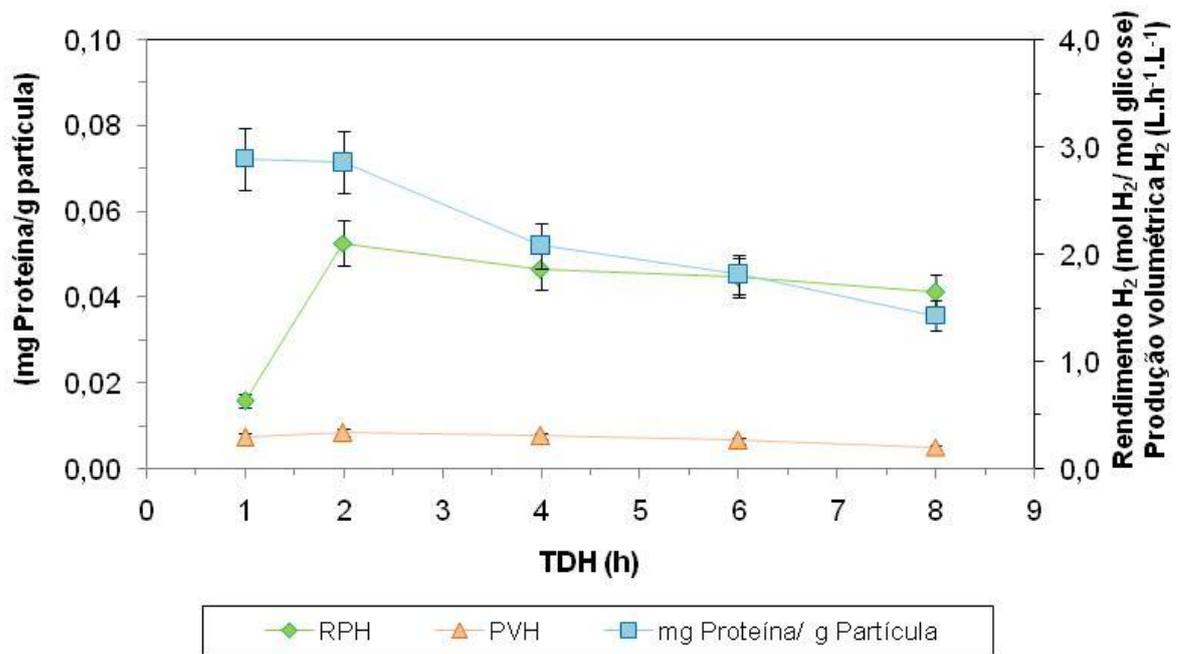


Figura 5.19 – Massa de polímeros extracelulares excretados na forma de proteínas por grama de partícula, rendimento de produção de hidrogênio e produção volumétrica de hidrogênio no pneu triturado (R2), em função do TDH.

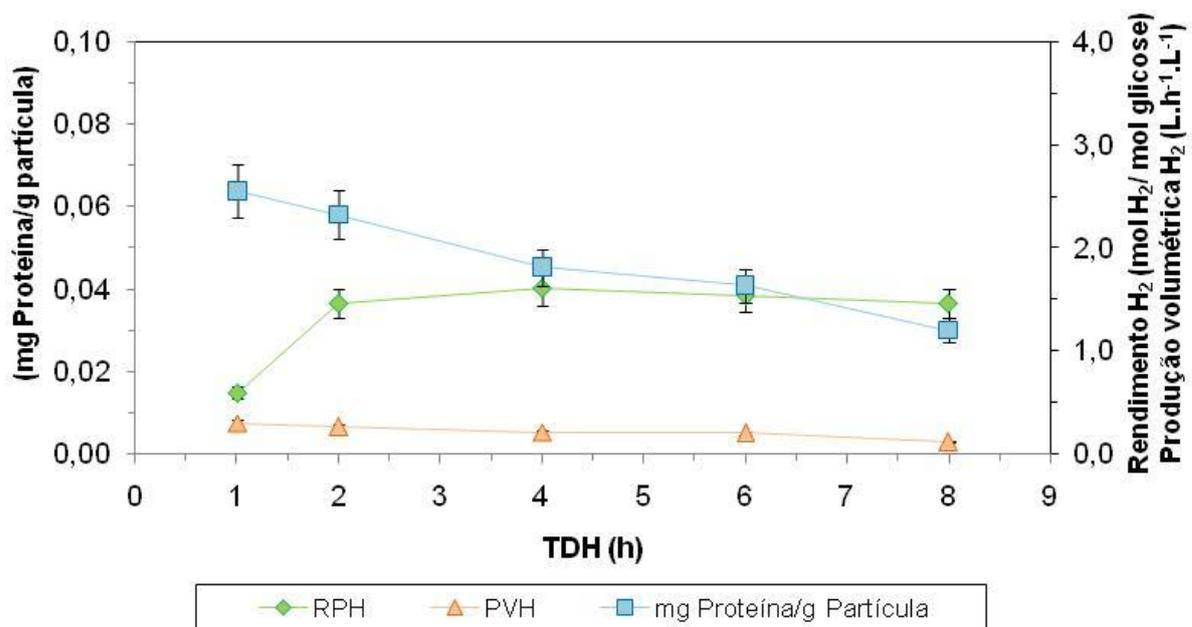


Figura 5.20 – Massa de polímeros extracelulares excretados na forma de proteínas por grama de partícula, rendimento de produção de hidrogênio e produção volumétrica de hidrogênio no PET (R3), em função do TDH.

Observa-se que em todos os suportes há um aumento da quantidade de polímeros excretados na forma de proteína com a redução do TDH de 8 h para 1 h, o que também pode ser observado no rendimento de produção de hidrogênio.

O poliestireno (R1) variou entre 0,0239 para 0,0502 g proteína/g partícula, o pneu triturado (R2) entre 0,0358 para 0,0725 g proteína/g partícula e o PET (R3) entre 0,0299 para 0,0638 g proteína/g partícula. O pneu triturado apresentou uma maior quantidade de polímeros na forma de proteínas em praticamente todas as fases.

O controle da produção de proteínas é importante, pois o acúmulo de exopolissacarídeos na estrutura do biofilme pode limitar os efeitos de transferência de massa do meio líquido para as partículas.

A produção de ácidos orgânicos e hidrogênio, bem como a ausência de metano no biogás desde o início do experimento demonstram que o procedimento de tratamento térmico do lodo realizado nesse estudo foi efetivo para o enriquecimento de bactérias acidogênicas produtoras de hidrogênio e para inibição de organismos consumidores de hidrogênio, como arqueias metanogênicas.

Além disso, a alta eficiência de consumo de glicose até o TDH de 2 h em todos os reatores mostrou que o período de 48 h em modo batelada foi adequado para a adaptação e desenvolvimento das atividades metabólicas da população acidogênica.

Os principais metabólitos solúveis encontrados no efluente nos três reatores foram ácidos orgânicos e etanol, havendo o predomínio do ácido butírico sobre o acético.

A Figura 5.21 mostra a comparação entre os três reatores da DQO afluentes e a eficiência de redução de DQO no TDH estudados.

Considera-se que a DQO afluyente é a glicose adicionada e a matéria carbonácea encontrada na ureia presente na composição da água residuária como fonte de nitrogênio. A

DQO efluente é dada pela glicose remanescente e os produtos solúveis encontrados no efluente formados na fermentação, como os ácidos orgânicos, álcoois e outros intermediários e a biomassa desprendida do material suporte. Portanto, o valor médio de eficiência de redução da DQO corresponde à parcela da matéria carbonácea que foi degradada totalmente a gás carbônico, já que nenhuma concentração de metano foi encontrada e à biomassa aderida ao material suporte.

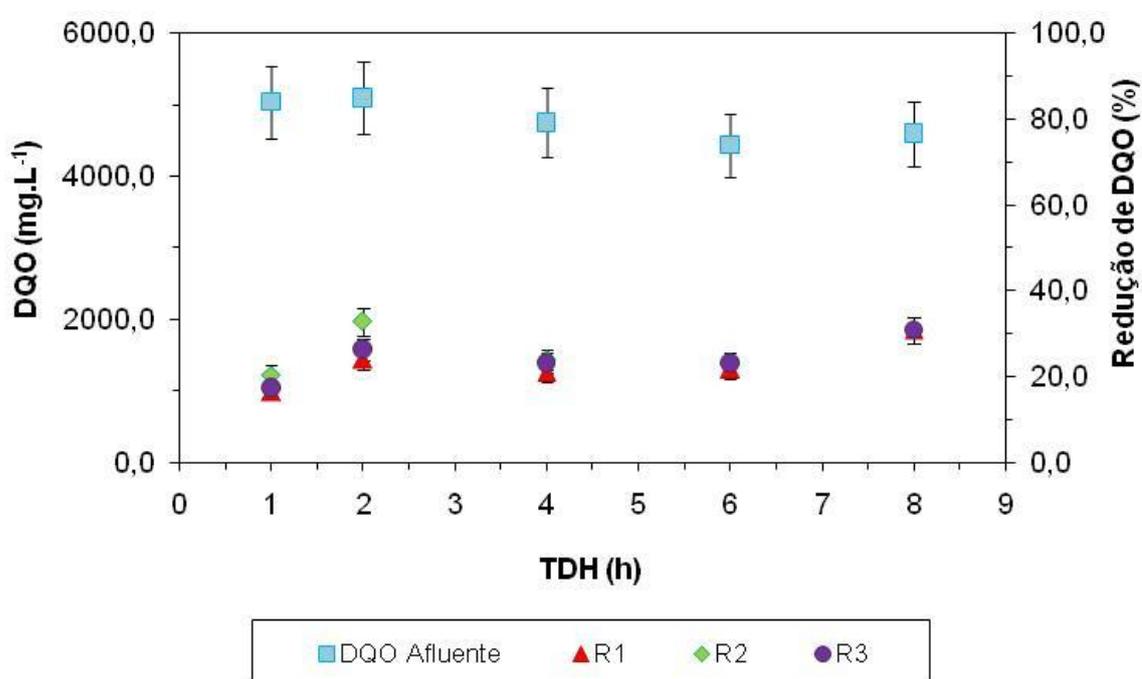


Figura 5.21 - Comparação da concentração média de DQO afluente e eficiência média de DQO no R1 (poliestireno), no R2 (pneu) e no R3 (PET), em diferentes TDH.

Considerando os valores diários de DQO, a média no afluente corresponde a 4788 mg.L⁻¹ e a média de DQO efluente no R1 foi de 3763 mg.L⁻¹, no R2 de 3580 mg.L⁻¹ e no R3 de 3683 mg.L⁻¹. A eficiência global de redução de DQO foi de 23% no R1, 26% no R2 e 24% no R3. As eficiências médias de redução para cada faixa de TDH aplicado nos três reatores estão expostas na Tabela 5.5.

Observa-se, pela Figura 5.21, que a eficiência de remoção de DQO entre aproximadamente 20 e 25% com a redução de TDH.

Tabela 5.5 - Porcentagem média de DQO removida e seus respectivos desvios padrões para o R1 (poliestireno), o R2 (pneu) e o R3 (PET) nos TDH aplicados.

	TDH	% Eficiência média removida de DQO
	(h)	
R1 (poliestireno)	8	31,00 ± 5,92
	6	21,76 ± 5,29
	4	20,96 ± 1,20
	2	23,99 ± 1,95
	1	16,47 ± 4,43
R2 (pneu)	8	31,00 ± 5,92
	6	23,13 ± 9,48
	4	23,90 ± 2,48
	2	32,75 ± 1,60
	1	20,48 ± 8,43
R3 (PET)	8	31,00 ± 5,92
	6	23,16 ± 4,18
	4	23,24 ± 5,07
	2	26,28 ± 5,06
	1	17,28 ± 7,68

As Tabelas 5.6, 5.7 e 5.8 apresentam as concentrações médias dos compostos presentes no efluente, como metabólitos solúveis, glicose remanescente no efluente e sólidos suspensos voláteis como medida indireta da biomassa, em todos os TDH empregados, respectivamente, nos reatores contendo poliestireno, pneu triturado e PET como materiais suporte.

Tabela 5.6 – Concentrações no meio líquido de ácidos acético, butírico, propiônico, etanol, metanol, glicose efluente e biomassa no reator com poliestireno como material suporte (R1).

TDH	HAc	HBu	HPr	EtOH	MtOH	Glicose ef	Biomassa
(h)	(mg.L⁻¹)						
8	103,23	247,77	0,00	754,95	19,70	322,00	137,00
6	189,52	400,34	0,00	748,15	31,67	555,00	163,00
4	200,87	414,06	0,00	968,27	134,91	555,00	286,00
2	208,79	365,88	0,00	1288,359	159,88	838,00	328,00
1	171,26	625,09	0,00	631,235	28,68	1321,00	351,00

Tabela 5.7 – Concentrações no meio líquido de ácidos acético, butírico, propiônico, etanol, metanol, glicose efluente e biomassa no reator com pneu triturado como material suporte (R2).

TDH	HAc	HBu	HPr	EtOH	MtOH	Glicose ef	Biomassa
(h)	(mg.L⁻¹)						
8	249,69	654,54	0,00	484,38	42,49	574,00	335,00
6	269,17	469,03	0,00	441,16	43,20	707,00	278,00
4	236,87	381,05	0,00	695,36	87,17	1011,00	247,00
2	258,53	400,56	0,00	1107,36	147,21	670,00	372,00
1	434,74	1013,61	44,01	394,15	52,73	1210,00	380,00

Tabela 5.8 – Concentrações no meio líquido de ácidos acético, butírico, propiônico, etanol, metanol, glicose efluente e biomassa no reator com PET como material suporte (R3).

TDH	HAc	HBu	HPr	EtOH	MtOH	Glicose ef	Biomassa
(h)	(mg.L⁻¹)						
8	246,75	660,44	0,00	342,65	39,37	891,00	193,00
6	291,62	612,29	0,00	437,81	43,51	603,00	218,00
4	201,32	386,36	1,66	1328,93	69,25	648,00	303,00
2	255,84	471,39	3,94	1359,234	155,29	584,00	344,00
1	131,59	291,21	13,9	489,17	28,91	1293,00	357,00

Observa-se pelas Tabelas 5.6, 5.7 e 5.8 que há um aumento da biomassa presente no efluente com a redução do TDH em todos os reatores, o que pode ser um aumento de desprendimento de biomassa do biofilme do material suporte.

Para a realização do balanço de carbono, é necessário converter estes valores das Tabelas acima para DQO, para se comparar a DQO teórica com a DQO medida. As Tabelas 5.9, 5.10 e 5.11 apresentam os valores calculados da DQO teórica dos ácidos acético, butírico, propiônico, do etanol, do metanol, da glicose efluente e da biomassa, além da soma destes valores, como DQO teórica total e da DQO medida, nos diferentes reatores, em todos os TDH empregados.

Tabela 5.9 – DQO teórica dos metabólitos, DQO da biomassa e DQO efluente medida no reator com poliestireno como material suporte (R1).

TDH	SMP	Glicose ef	Biomassa	DQO	Diferença
(h)	DQO (mg.L⁻¹)	DQO (mg.L⁻¹)	DQO (mg.L⁻¹)	Medida (mg.L⁻¹)	(mg.L⁻¹)
8	1640,18	343,25	184,00	4597,37	2430,36
6	2018,03	592,00	218,00	4437,02	1608,94
4	2516,11	592,00	383,00	4757,47	1266,49
2	2919,67	893,00	440,00	5104,45	851,95
1	2240,04	1408,00	470,00	5043,22	924,65

SMP: Soma das DQO dos metabólitos solúveis.

Tabela 5.10 – DQO teórica dos metabólitos, DQO da biomassa e DQO efluente medida no reator com pneu triturado como material suporte (R2).

TDH	SMP	Glicose ef	Biomassa	DQO	Diferença
(h)	DQO (mg.L⁻¹)	DQO (mg.L⁻¹)	DQO (mg.L⁻¹)	Medida (mg.L⁻¹)	(mg.L⁻¹)
8	2193,63	612,00	449,00	4597,37	519,20
6	1818,09	754,00	373,00	4437,02	443,49
4	2043,25	1078,00	331,00	4757,47	150,27
2	2764,96	714,00	498,00	5104,45	-419,32
1	3000,11	1290,00	509,00	5043,22	-1331,32

SMP: Soma das DQO dos metabólitos solúveis.

Tabela 5.11 – DQO teórica dos metabólitos, DQO da biomassa e DQO efluente medida no reator com PET como material suporte (R3).

TDH	SMP	Glicose ef	Biomassa	DQO	Diferença
(h)	DQO (mg.L⁻¹)	DQO (mg.L⁻¹)	DQO (mg.L⁻¹)	Medida (mg.L⁻¹)	(mg.L⁻¹)
8	1999,39	612,00	259,00	4597,37	410,22
6	2098,27	754,00	292,00	4437,02	734,36
4	2871,93	1078,00	406,00	4757,47	-61,08
2	3259,30	714,00	461,00	5104,45	-83,36
1	1414,53	1290,00	478,00	5043,22	1042,29

SMP: Soma das DQO dos metabólitos solúveis.

Pela Tabela 5.9, nota-se que há uma diferença entre DQO medida e DQO teórica entre 924,65 e 2430,36 mg.L⁻¹, no R1 (poliestireno). Já no R2 (pneu) (Tabela 5.10), essa diferença é

de -1331,32 a 519,20 mg.L⁻¹ e no R3 (PET) (Tabela 5.11) essa diferença é entre -83,36 e 734,36 mg.L⁻¹.

Quando essa diferença é positiva, pode ser atribuída a outros metabólitos não detectados como ácido fórmico, láctico, pois somente os met e também a desvios de medidas nos metabólitos solúveis, na glicose, na biomassa e na DQO medida. A possível não detecção desses ácidos é decorrente do método cromatográfico adotado (extração por headspace), pois somente os ácidos voláteis são detectados. Já quando a diferença é negativa, possa ser que haja erros experimentais.

Barros (2009), operando RALF com as mesmas condições operacionais desta pesquisa, entretanto sem o controle de pH, obteve diferenças menores entre a DQO medida e a DQO teórica e também não houve resultados negativos.

As Figuras 5.22, 5.23 e 5.24 ilustram a microscopia eletrônica de varredura (MEV), realizadas no Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, das morfologias das populações bacterianas aderidas aos materiais suporte no R1 (poliestireno), no R2 (pneu) e no R3 (PET), respectivamente.

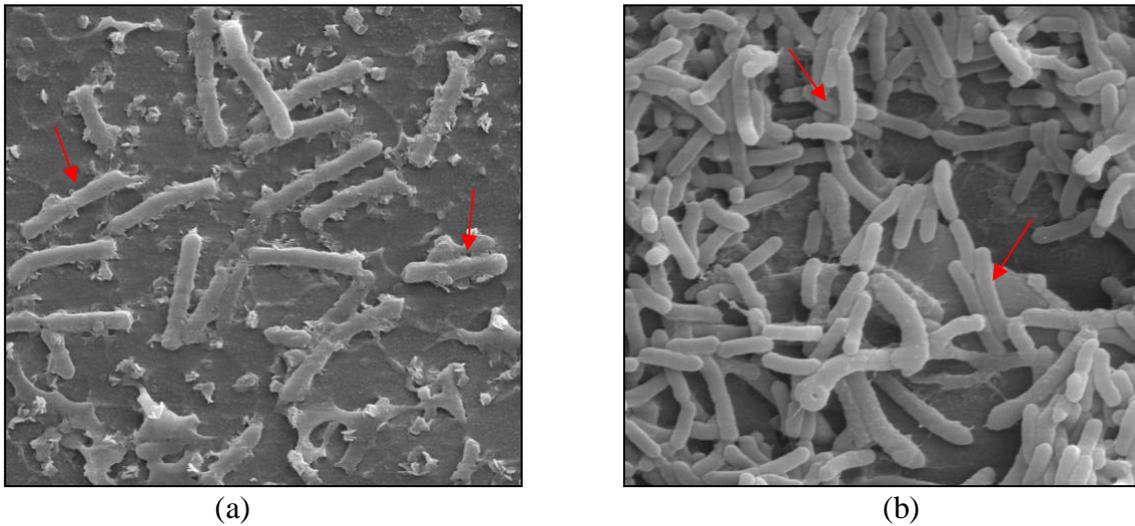


Figura 5.22 - Microscopia eletrônica de varredura dos microrganismos aderidos no poliestireno (R1) no TDH de 8 h (a) e no TDH de 2 h (b), com presença de bacilos, indicados por setas em vermelho, que são morfologias semelhantes à *Clostridium sp.* (aumento: 3000 x).

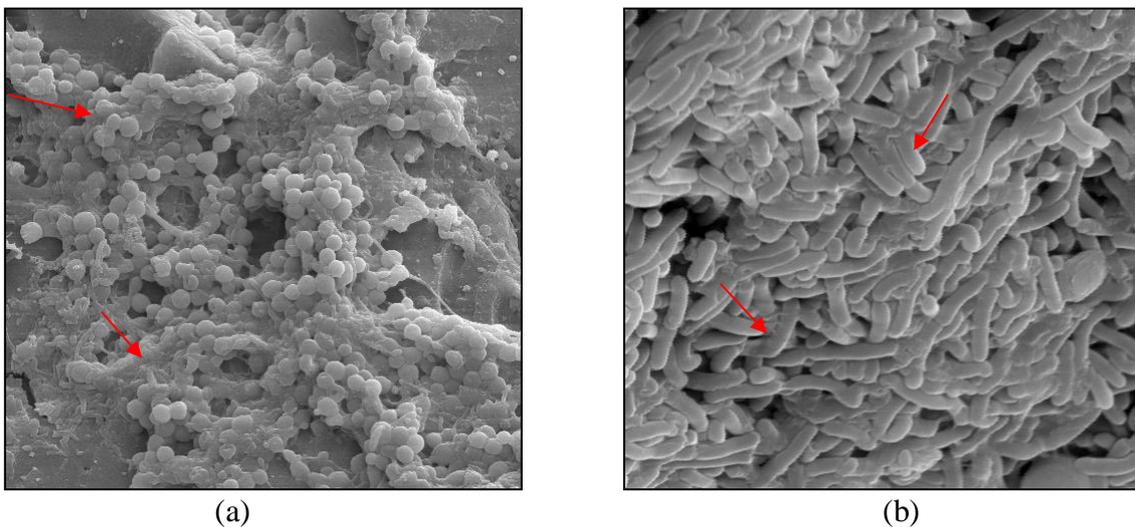


Figura 5.23 - Microscopia eletrônica de varredura dos microrganismos aderidos no pneu inservível triturado (R2) no TDH de 8 h (aumento: 1000 x) (a) e no TDH de 2 h (aumento: 5000 x) (b), com presença de bacilos, indicados por setas em vermelho, que são morfologias semelhantes à *Clostridium sp.*

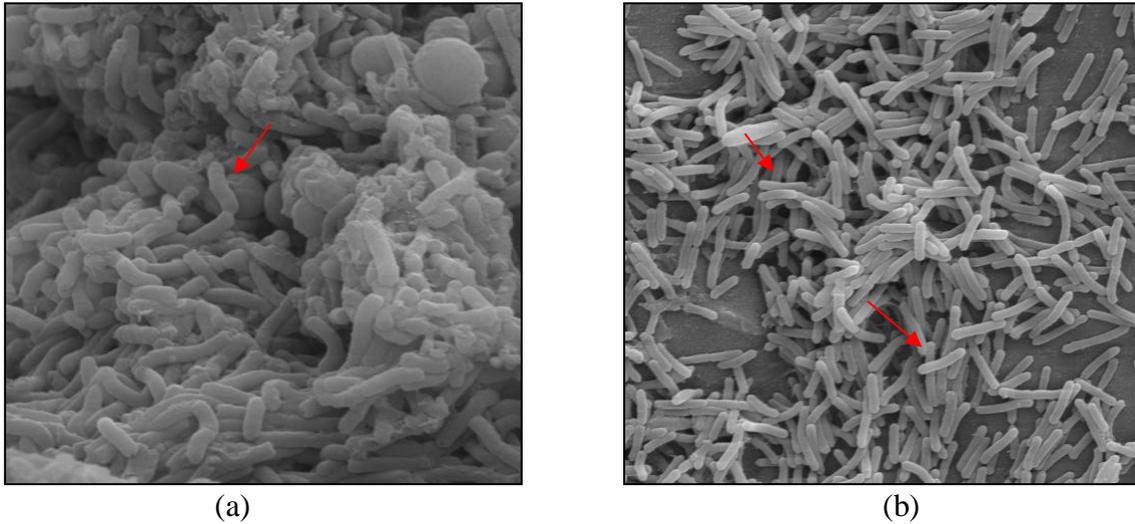


Figura 5.24 - Microscopia eletrônica de varredura dos microrganismos aderidos no PET (R3) no TDH de 8 h (aumento: 5000 x) (a) e no TDH de 2 h (aumento: 3000 x) (b), com presença de bacilos, indicados por setas em vermelho, que são morfologias semelhantes à *Clostridium sp.*

A produção de ácido butírico e ácido acético, bem como a produção de H_2 e CO_2 , compõem produtos semelhantes aos produtos formados na fermentação de carboidrato por espécies de *Clostridium* (COHEN et al., 1979).

Iyer et al. (2004) citam que no tratamento térmico anaeróbio do lodo, *Clostridium acetobutylicum* foi identificado a ser a espécie dominante, que foi responsável pela fermentação ácido butírico.

Em ambas as Figuras (5.22, 5.23 e 5.24), observa-se, visualmente, a presença de bacilos semelhantes a *Clostridium*. Além disso, podem ser observados alguns endósporos, caracterizados por um arredondamento em uma das extremidades.

Segundo Wood (1961)¹ *apud* Cohen et al. (1979), a fermentação ácido butírico pode ser realizada por *Clostridium butyricum*, *Clostridium tyrobutyricum* e *Clostridium lactoacetophilum*.

Acredita-se que a produção de hidrogênio é altamente relacionada aos microrganismos dominantes e às condições ambientais nos processos anaeróbios de fermentação para produção de hidrogênio, mas parece ser independente da configuração do reator.

Lin et al. (2007) mencionam que a fermentação da glicose por diferentes espécies de *Clostridium* produz ácidos acético e butírico, dióxido de carbono, hidrogênio e biomassa como principais produtos.

As micrografias obtidas por meio da microscopia eletrônica de varredura mostram que as partículas de poliestireno, pneu inservível triturado e PET adotadas como suportes de imobilização da biomassa foram adequadas. Durante a operação dos reatores anaeróbio de leito fluidizado, as morfologias predominantes encontradas foram bacilos, pôde-se encontrar morfologias semelhantes à *Clostridium sp.*, indicando que os ácidos produzidos são convertidos a hidrogênio. A presença destes grupos morfológicos decorre provavelmente da utilização de ácidos orgânicos, como acetato, butirato, e do metabolismo hidrogenotrófico (H₂/CO₂).

Barros et al. (2011), analisaram a influência do pneu triturado e do PET como materiais suporte na produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidizado e constataram que em pH efluente em torno de 5,5; e na árvore filogenética feita para o pneu triturado, já que este material suporte se apresentou melhor para a produção de hidrogênio. Uma centena de clones foram obtidos a partir do pneu por meio de análises de clonagem e sequenciamento de fragmentos do gene 16S rRNA do consórcio microbiano. No entanto, os

¹ WOOD, W.A. Fermentation of Carbohydrates and Related Compounds. In: *The Bacteria*, vol.II (edited by C. Gunsalus and R.V. Stainer) pp. 59-151. Academic, 1961.

clones com sequências menores do que ou iguais a 200 pares de bases não foram utilizados em análises filogenéticas. Os clones obtidos são mostrados nas Figuras 5.28 e 5.29.

Os valores de similaridade dos coeficientes encontrados entre clones e a base de dados NCBI variou de 96% a 100% e indicou a presença de bactérias filogeneticamente relacionadas, com base na avaliação parcial de seqüências do gene 16S rRNA.

A maioria dos clones, isto é, 61%, foram relacionados com *Clostridium*, *Bacillus* para 32%, 5% e *Enterobacter*, e 3% a *Sporolactobacillus* (Figura 5.25).

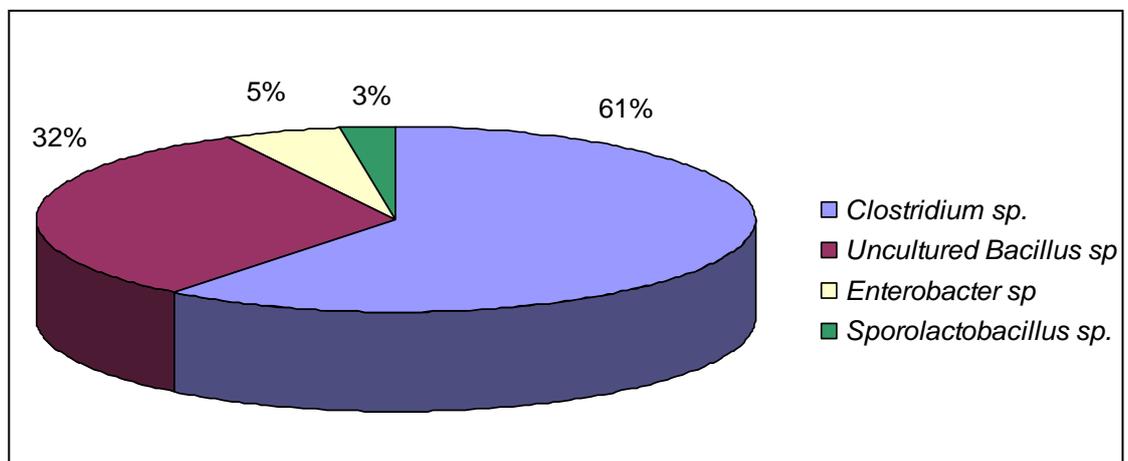


Figura 5.25 – Porcentagem filogenética dos clones para um domínio Bacteria em um consórcio microbiano (BARROS et al., 2011)

A Figura 5.26 mostra a árvore filogenética consensual obtida com os iniciadores para o domínio Bacteria a partir das sequências derivadas a partir de clonagem e sequencias do consórcio microbiano no reator contendo pneu triturado como material de suporte. A maioria dos clones (95%) pertenciam ao filo *Firmicutes* (Clostridia e aulas de bacilos) e apenas 5% a filo *Proteobacteria* (*Gammaproteobacteria*). *Clostridium* pertence à classe de *Clostridia*, *Bacillus* e enquanto *Sporolactobacillus* pertencem à classe Bacilli. *Enterobacter* pertence à classe *Gammaproteobacteria* (Figura 5.26) (BARROS et al. 2011).

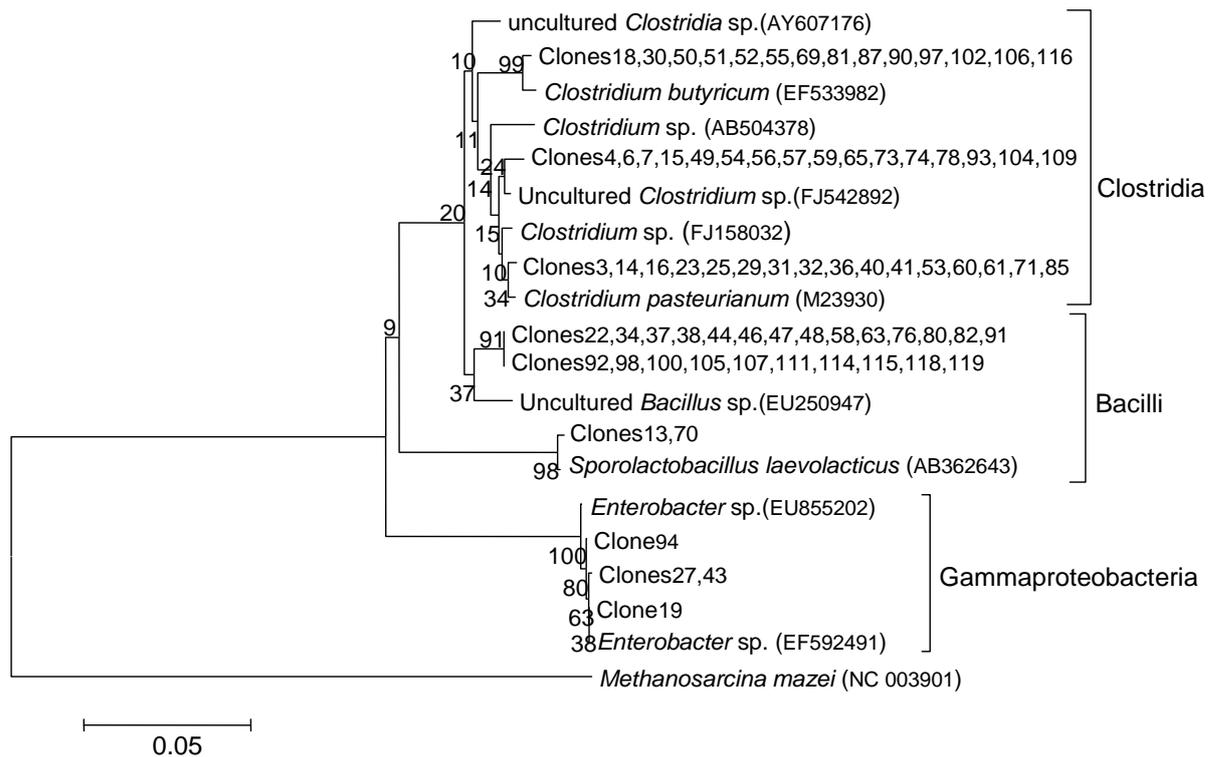


Figura 5.26 - Árvore filogenética baseada em sequências obtidas a partir de uma amostra de biomassa aderida ao material de suporte (pneu triturado) alimentado com glicose para a produção de hidrogênio. Os valores presentes nos nós da árvore indicam percentagens de ramos recorrentes (1000 bootstraps para reamostragem). *Methanosarcina mazei* foi empregado como grupo externo (BARROS et al., 2011).

5.5. Considerações finais

Este trabalho demonstrou que o hidrogênio e etanol podem ser produzidos concomitantemente a partir da conversão de substratos orgânicos, incentivando o potencial de utilização de processos fermentativo para a produção destes biocombustíveis. A estabilidade durante a operação contínua por longa duração do RALF para a produção de hidrogênio e etanol pode ser garantida pelo método de tratamento prévio do inóculo, material suporte e inóculo e o não controle do pH, propostos neste pesquisa. O biofilme formado favoreceu a

produção mesofílica do hidrogênio, uma vez que o tratamento térmico possibilitou a eliminação de células vegetativas metanogênicas e acidogênicas não formadoras de endósporos, e mantiveram as células acidogênicas com capacidade de formar endósporos, estruturas de resistência a condições desfavoráveis.

O rendimento máximo teórico da produção de hidrogênio prevê ácido acético como metabólito final da fermentação. Os ácidos orgânicos obtidos foram, principalmente, acético e butírico, que se confirmou, no presente trabalho que, a produção elevada de hidrogênio esteve associada à presença dos metabólitos solúveis da fermentação, tais como, ácido acético e ácido butírico, como observado por Zhang et al. (2007), Koskinen et al. (2007), Leite et al. (2008), Fernandes (2008), Peixoto (2008), Shida (2008), Barros (2009). Também houve o predomínio de etanol como metabólito solúvel da fermentação, o que garantiu a produção simultânea de hidrogênio e etanol sem o controle de pH, dois importantes biocombustíveis alternativos à utilização dos combustíveis fósseis.

CAPÍTULO 6

CONCLUSÕES

Todos os três reatores pesquisados apresentaram um desempenho semelhante, obtiveram produção volumétrica de hidrogênio, assim como conteúdo de hidrogênio no biogás aumentando com a redução do TDH, assim como o rendimento de produção de hidrogênio.

Ácidos acético, butírico e etanol foram os metabólitos solúveis dominantes nos três reatores, o que mostra que a comunidade microbiana nos reatores foi eficiente para produção de hidrogênio e etanol.

O reator anaeróbio de leito fluidizado contendo pneu triturado como material suporte se mostrou o mais adequado para a produção biológica de hidrogênio, pois, além de apresentar um maior rendimento de produção de hidrogênio ($2,11 \text{ mol-H}_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{glicose}$), apresentou um maior conteúdo de hidrogênio no biogás (60%) e uma maior produção de ácidos acético e butírico ($434,74$ e $1013,61 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, respectivamente). O melhor desempenho deste reator pode ser explicado pela rugosidade do pneu triturado ser maior do que a dos demais materiais empregados (poliestireno e PET), acumulando uma maior quantidade de biomassa aderida e, conseqüentemente, uma maior quantidade de bactérias acidogênicas produtoras de hidrogênio. Todavia, o reator contendo PET como material suporte apresentou um melhor desempenho quanto à produção de etanol ($1941,76 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$).

O não controle do pH e este ficando em torno de 3,5 mostrou-se adequado para produção concomitante de hidrogênio e etanol.

A presença de estrutura semelhantes a bacilos presentes nas micrografias apresentadas mostra que a fermentação da glicose produz ácidos acético e butírico, etanol, hidrogênio, biomassa e dióxido de carbono como principais produtos.

A eficiente conversão de glicose, produção de hidrogênio, dióxido de carbono e etanol mostra que o tratamento térmico do inóculo foi efetivo.

Apesar do reator com pneu ser melhor para a produção de hidrogênio e o reator com PET para a produção de etanol, foi possível produzir simultaneamente os dois biocombustíveis nos três reatores estudados, em todos os TDH utilizados, que são dois biocombustíveis alternativos aos combustíveis fósseis.

6.1. Sugestões para trabalhos futuros

Com o objetivo de propor pesquisas futuras para a continuidade da produção biológica de hidrogênio em reator anaeróbico de leito fluidizado, propõe-se:

- Análise do efeito da concentração de alcalinizante no reator para a produção biológica de hidrogênio;
- Análise de outras fontes de carbono para produção de hidrogênio;
- Análise de águas residuárias reais para a produção de hidrogênio;
- Análise da produção de hidrogênio em condições termofílicas;
- Análise de biologia molecular das comunidades microbianas presentes no reator.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, A. A.; DANKO, A. S.; COSTA, J. C.; FERREIRA, E. C.; ALVES, M. M. Inoculum Type Response to Different pHs on Biohydrogen Production from LAarabinose, a Component of Hemicellulosic Biopolymers. *Int. J. Hydrogen Energy*, v. 34, p. 1744-1751, 2009.
- ACEVES-LARA, C.A.; LATRILLE, E.; BUFFIERE, P.; BERNET, N.; STEYER, J.P. Experimental Determination by Principal Component Analysis of a Reaction Pathway of Biohydrogen Production by Anaerobic Fermentation. *Chemical Engineering and Processing*, v. 47, p. 1968–1975, 2008.
- AMORIM, E.L.C.; BARROS, A.R.; DAMIANOVIC, M.H.R.Z.; SILVA, E.L. Anaerobic Fluidized Bed Reactor with Expanded Clay as Support for Hydrogen Production thorough Dark Fermentation of Glucose. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 34, p.783-790, 2009.
- AMORIM, E.L.C. Efeito da Concentração de Glicose e da Alcalinidade na Produção de Hidrogênio em Reator Anaeróbio de Leito Fluidificado. Tese de Doutorado. EESC/USP, São Carlos – SP, 2009.
- ANTONOPOULOU, G.; GAVALA, H.N; SKIADAS, I.V; ANGELOPOULOU, K.; LYBERATOS, G. Biofuels generation from sweet sorghum: Fermentative hydrogen production and anaerobic digestion of the remaining biomass. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 110-119, 2008.

ANTONOPOULOU, G.; GAVALA, H. N.; SKIADAS, I. V.; LYBERATOS, G. Influence of pH on Fermentative Hydrogen Production from Sweet Sorghum Extract. *Int. J. Hydrogen Energy*, v. 35, p. 1921-1928, 2010.

APHA Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (1998) 20th ed. American Public Health Association / American Water Works Association / Water Environment Federation, Washington, DC, USA.

BARROS, A. R. Evaluation of Different Support Materials of Hydrogen Production in Anaerobic Fluidized Reactor. Department of Chemical Engineering, M.Sc. Thesis, Federal University of São Carlos, Brazil; 2009 [In Portuguese].

BARROS, A.R.; AMORIM, E.L.C; REIS, C. M.; SHIDA, G.M; E. L.C.; SILVA, E. L. Biohydrogen Production in Anaerobic Fluidized Bed Reactors: Effect of Support Material and Hydraulic Retention Time. *Int. J. Hydrogen Energy*, v. 35, p. 3379-3388, 2010.

BARROS, A.R.; ADORNO, M.A.T.; SAKAMOTO, I.K.; MAINTINGUER, S.I.; VARESCHE, M.B.; SILVA, E.L. Performance Evaluation and Phylogenetic Characterization of Anaerobic Fluidized Bed Reactors Using Ground Tire and PET as Support Materials for Biohydrogen Production. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 3840–3847, 2011.

- BREURE, A.M.; VAN ANDEL, J.G. Hydrolysis and acidogenic fermentation of a protein, geltin in an anaerobic continuous culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v. 19, p. 230-240, 1984.
- BUITRÓN, G.; CARVAJAL, C. Biohydrogen Production from Tequila Vinasses in an Anaerobic Sequencing Batch Reactor: Effect of Initial Substrate Concentration, Temperature and Hydraulic Retention Time. *Bioresour. Technol.*, v. 101, p. 9071-9077, 2010.
- CHANG, J.S.; LEE, K.S.; LIN, P.J. Biohydrogen Production with Fixed-Bed Bioreactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 27, p. 1167 – 1174, 2002.
- CHANG, F.Y.; LIN, C.Y. Biohydrogen Production Using an Up-Flow Anaerobic Sludge Blanket Reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, v, 29, p. 33 – 39, 2004.
- CHEN, C.Y.; CHEN, S.D. Biofilm Characteristics in Biological Denitrification Biofilm Reactors. *Water Science Technology*, v.41, n.4, p.147-154, 2000.
- CHEN, W.M.; TSENG, Z.J.; LEE, K.S.; CHANG, J.S. Fermentative Hydrogen Production with *Clostridium butyricum* CGS5 Isolated from Anaerobic Sewage Sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 30, p. 1063 – 1070, 2005.
- CHEONG, D. Y.; HANSEN, C. L. Acidogenesis Characteristics of Natural, Mixed Anaerobes Converting Carbohydrate-Rich Synthetic Wastewater to Hydrogen. *Process Biochemistry*, v. 41, p. 1736-1745, 2006.

CHERNICHARO C.A.L. Reatores anaeróbios (Princípios do tratamento biológico de águas residuárias, 5). Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – UFMG, 1997.

COHEN, A.; ZOETEMEYER, J.; VAN DEURSEN, A.; VAN ANDEL, J.G. Anaerobic Digestion of Glucose with Separated Acid Production and Methane Formation. *Water Research*. v. 13, p. 571-580, 1979.

COHEN, A.; VAN GEMERT, J.M.; ZOETEMEYER, R.J.; BREURE, A.M. Main characteristics and stoichiometric aspects of acidogenesis of soluble carbohydrate containing wastewater. *Proc. Biochem*, v. 19, p. 220-228, 1984.

DANKO, A. S.; ABREU, A. A.; ALVES, M. M. Effect of Arabinose Concentration on Dark Fermentation Hydrogen Production Using Different Mixed Cultures. *Int. J. Hydrogen Energy*, v. 33, p. 4527-4532, 2008.

DAS, D.; VEZIROGLU, T.N. Hydrogen Production by Biological Processes: A Survey of Literature. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 26, p. 13-28, 2001.

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

- DAVILA-VAZQUEZ, G.; ALATRISTE-MONDRAGÓN, F.; LEÓN, RODRÍGUEZ, A.; RAZO-FLORES, E. Fermentative Hydrogen Production in Batch Experiments Using Lactose, Cheese Whey and Glucose: Influence of Initial Substrate Concentration and pH. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 33, p. 4989 – 4997, 2008.
- DE LA TORRE, I.; GOMA, G. Characterization of anaerobic microbial culture with high acidogenic activity. *Biotechnol Bioeng*. v. 23, p. 178-185, 1981.
- DONANYOS, M.; KOSOVA, B.; ZABRANSKA, J. Production and utilization of volatile fatty acids in various types of anaerobic reactors. *Water Sci. Technol.*, v. 17, p. 1985-1991, 1985.
- FAN, Y.; LI, C.; LAY, J.J.; HOU, H.; ZHANG, G. Optimization of Initial Substrate and pH Levels for Germination of Sporing Hydrogen-Producing Anaerobes in Cow Dung Compost. *Bioresource Technology*, v. 91, p. 189–193, 2004.
- FANG, H.H.P.; LIU, H. Effect of pH on Hydrogen Production from Glucose by a Mixed Culture. *Bioresource Tecnology*, v. 82, p. 87-93, 2002.
- GAUDY, A.F.; GAUDY, E.T. Microbiology for environmental scientists and engineers. McGraw-Hill, 1980.
- GAVALA, H.N.; SKIADAS, I.V.; AHRING, B.K. Biological Hydrogen Production in Suspended and Attached Growth Anaerobic Reactor Systems. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 31, p. 1164 – 1175, 2006.

GUO, W.Q.; REN, N.Q.; CHEN, Z.B.; LIU, B.F.; WANG, X.J.; XIANG, W.S. DINJ, J. Simultaneous Biohydrogen Production and Starch Wastewater Treatment in an Acidogenic Expanded Granular Sludge Bed Reactor by Mixed Culture for Long-Term Operation. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 33, p. 7397 - 7404, 2008.

HALLENBECK, P. C.; GHOSH, D. Advances in Fermentative Biohydrogen Production: the Way Forward? *Trends in Biotechnology*, v. 27, p. 287-297, 2009.

HAWKES, F.R.; DINSDALE, R.; HAWKES, D.L.; HUSSY, I. Sustainable Fermentative Hydrogen Production: Challenges for Process Optimisation. *International Journal of Hydrogen Energy*. v. 27, n. 11-12, p. 1339-1347, 2002.

HAWKES, F.R.; FORSEY, H.; PREMIER, G.C.; DINSDALE, R.M.; HAWKES, D.L.; GUWY, A.J.; MADDY, J.; CHERRYMAN, S.; SHINE, J.; AUTY, D. Fermentative Production of Hydrogen from a Wheat Flour Industry co-Product. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 5020–5029, 2008.

HARPER, S.R.; POHLAND, F.G. Recent Development of Hydrogen Management during Anaerobic Biological Wastewater Treatment. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 28, p. 585-602, 1986.

HWANG, M. H.; JANG, N. J.; HYUM, S. H.; KIM, I. S. Anaerobic Bio-Hydrogen Production from Ethanol Fermentation: the Role of pH. *Journal of Biotechnology*, v. 111, p. 297-309, 2004.

- IYER, P.; BRUNS, M.A.; ZHANG, H.S.; VAN GINKEL, S.; LOGAN, B.E. H₂-producing bacterial communities from a heat-treated soil inoculum. *Appl Microbiol Biotechnol.*, v. 66, p. 166—173, 2004.
- KAPDAN, I.K.; KARGI, F. Bio-Hydrogen Production from Waste Materials. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 38, p. 569-582, 2006.
- KATAOKA, N.; MIYA, A.; KIRIYAMA, K. Studies on Hydrogen Production by Continuous Culture System of Hydrogen-Producing Anaerobic Bacteria. *Water Sci. Technol.* v. 36, n. 6–7, p. 41–47, 1997.
- KHANAL S.K., CHEN W.H., LI L., SUNG S. Biological Hydrogen Production: Effects of pH and Intermediate Products. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 29, p. 1123 – 1131, 2004.
- KIDA, K.; MORIMURA, S.; SONODA, Y.; OBE, M.; KONDO, T. Support Media for Microbial Adhesion in an Anaerobic Fluidized-Bed Reactor. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 69, n. 6, p. 354-359, 1990.
- KIM, S.; HAN, S.; SHIN, H. Effect of Substrate Concentration on Hydrogen Production and 16s Rdna-Based Analysis of the Microbial Community in a Continuous Fermenter. *Process Biochemistry*, v. 41, p. 199–207, 2006.
- KISAALITA, W.S.; PINDER, K.L.; LO, K.V. Acidogenic fermentation of lactose. *Biotechnol Bioeng.*, v. 30, p. 80-88, 1987.

- KOSKINEN, P.E.P.; KAKSONEN, A.H.; PUHAKKA, J.A. The Relationship Between Instability of H₂ Production and Compositions of Bacterial Communities Within a Dark Fermentation Fluidized-Bed Bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 97, n. 4, 2007.
- KOSKINEN, P. E. P.; BECK, S. R.; ORLYGSSON, J.; PUHAKKA, L. A. Ethanol and Hydrogen Production by Two Thermophilic, Anaerobic Bacteria Isolated from Icelandic Geothermal Areas. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 101, p. 679-690, 2008.
- LAY, J.J.; LEE, Y.J.; NOIKE, T. Feasibility of Biological Hydrogen Production Fromorganic Fraction of Municipal Solid Waste. *Water Res.* v. 33, p. 2576–86, 1999.
- LEE, K-S.; LO, Y-S.; LO, Y-C.; LIN, P-J.; CHANG, J-S. H₂ production with Anaerobic Sludge using Activated-Carbon Supported Packed-Bed Bioreactors. *Biotechnology Letters*, v. 25, p. 133-138, 2003.
- LEE, K.S.; WU, J.F.; LO, Y.S.; LIN, P.J.; CHANG, J.S. Anaerobic hydrogen production with an efficient carrier-induced granular sludge bed bioreactor. *Biotechnol Bioeng.*, v. 87, p. 648-657, 2004.
- LEITE, J.A.C. Produção de Ácidos Graxos Voláteis por Fermentação Acidogênica em Reator Anaeróbico de Leito Fixo e Extração em Resina de Troca Iônica e com Solvente Orgânico. Tese de Doutorado. EESC/USP, São Carlos – SP, 2005.

- LEITE, J.A.C.; FERNADES, B.S.; POZZI, E.; BARBOZA, M.; ZAIAT, M. 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.
- LEVIN, D.B; PITT, L.; LOVE, M. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 29, p. 1 – 39, 2004.
- LI, Z.; WANG, H.; TANG, Z.; WANG, X.; BAI, J. Effects of pH Value and Substrate Concentration on Hydrogen Production from the Anaerobic Fermentation of Glucose. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 33, p. 7413 - 7418, 2008.
- LIN, C.Y.; CHANG, R.C. Hydrogen Production during the Anaerobic Acidogenic Conversion of Glucose. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* v. 74, p. 498–500, 1999.
- LIN, C.N.; WU, S.Y.; CHANG, J.S. Fermentative Hydrogen Production with a Draft Tube Fluidized Bed Reactor Containing Silicone-Gel-Immobilized Anaerobic Sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 31, p. 2200 – 2210, 2006.
- LIN, P.Y.; WHANG, L.M.; WU, Y.R.; REN, W.J.; HSIAO, C.J.; LI, S.L.; CHANG, J.S. Biological Hydrogen Production of the Genus *Clostridium*: Metabolic Study and Mathematical Model Simulation. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 32, p. 1728 - 1735, 2007.

- MAINTINGUER, S.I.; FERNANDES, B.S.; DUARTE, I.C.S.; SAAVEDRA, N.C.; ADORNO, M.A.T.; VARESCHE, M.B. Fermentative Hydrogen Production by Microbial Consortium. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 33, p. 4309 - 4317, 2008.
- MOHAN, S.V.; BABU, V.L.; SARMA, P.N. Anaerobic Biohydrogen Production from Dairy Wastewater Treatment in Sequencing Batch Reactor (AnSBR): Effect of Organic Loading Rate. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 41, p. 506–515, 2007.
- MOSEY, F.E. Mathematical Modeling of the Anaerobic Digestion Process: Regulatory Mechanisms for the Formation of Short-Chain Volatile Fatty Acids from Glucose. *Water Science Technology*, v. 15, p. 209-232, 1983.
- MU, Y.; YU, H.K.; WANG, G. The Role of pH in the Fermentative H₂ Production from an Acidogenic Granule-Based Reactor. *Chemosphere*, v. 64, p. 350–358, 2006.
- NANDI, R.; SENGUPTA, S. Microbial production ou hydrogen: an overview. *Crit Rev Microbiol.*, v. 24, p. 61-84, 1998.
- PEIXOTO, G. Produção de Hidrogênio em Reator Anaeróbio de Leito Fixo e Fluxo Ascendente a partir de Água Residuária de Indústria de Refrigerantes. Dissertação de Mestrado, EESC/USP, São Carlos – SP, 2008.
- REIS, C.M. Efeito da Velocidade Ascensional e do Tempo de Detenção Hidráulica na Produção de Hidrogênio em Reator Anaeróbio de Leito Fluidizado. Dissertação de Mestrado (DEQ-UFSCar), São Carlos, 2010.

- REN, N.; WANG, B.; HUANG, J. C. Ethanol-Type Fermentation from Carbohydrate in High Rate Acidogenic Reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 54, p. 428-433, 1997.
- REN, N. Q.; CHUA, H.; CHAN, S. Y.; TSANG, Y. F.; WANG, Y. J.; SIN, N. Assessing Optimal Fermentation Type for Bio-Hydrogen Production in Continuous-Flow Acidogenic Reactors. *Bioresour. Technol.*, v. 98, p. 1774-1780, 2007.
- SHIDA, G.M. Produção de Hidrogênio e Ácidos Orgânicos por Fermentação Acidogênica em Reator Anaeróbico de Leito Fluidificado. Dissertação de Mestrado, EESC/USP, São Carlos – SP, 2008.
- SHIDA, G. M.; BARROS, A. R.; REIS, C. M.; AMORIM, E. L. C.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z.; SILVA, E. L. Long-Term Stability of Hydrogen and Organic Acids Production in an Anaerobic Fluidized-Bed Reactor Using Heat Treated Anaerobic Sludge Inoculum. *Int. J. Hydrogen Energy*, v. 34, p. 3679–88, 2009.
- SKONIECZNY, M. T.; YARGEAU, V. Biohydrogen Production from Wastewater by *Clostridium beijerinckii*: Effect of pH and Substrate Concentration. *Int. J. Hydrogen Energy*, v. 34, p. 3288-3294, 2009.
- UENO, Y.; KAWAI, T.; SATO, S.; OTSUKA, S.; MORIMOTO, M. Biological Production of Hydrogen from Cellulose by Nature Anaerobic Microflora. *J Ferment Bioeng.* v. 79, p. 395–7, 1995.

VAN GINKEL S.; SUNG S.W.; LAY J.J. Biohydrogen Production as a Function of pH and Substrate Concentration. *Environ Sci Technol.*, v. 35, p. 4726–30, 2001.

VAN GINKEL, S.W.; LOGAN, B. Increased Biological Hydrogen Production with Reduced Organic Loading. *Water Research*, v. 39, p. 3819–3826, 2005.

YU, H.; ZHU, Z.; HU, W.; ZHANG, H. Hydrogen Production from Rice Winery Wastewater in an Upflow Anaerobic Reactor by Using Mixed Anaerobic Cultures. *Int. J. Hydrogen Energy*. v. 27, n. 11–12, p. 1359–65, 2002.

WANG, L.; ZHOU, Q.; LI, F. T. Avoiding Propionic Acid Accumulation in the Anaerobic Process for Biohydrogen Production. *Biomass and Bioenergy*, v. 30, p. 177-182, 2006.

WANG, B.; WAN, W.; WANG, J. Inhibitory Effect of Ethanol, Acetic Acid, Propionic Acid and Butyric Acid on Fermentative Hydrogen Production. *Int. J. Hydrogen Energy*, v. 33, p. 7013-7019, 2008.

WANG, J.; WAN, W. Factors Influencing Fermentative Hydrogen Production: A review. *Int. J. Hydrogen Energy*, v. 34, p. 799-811, 2009.

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

- WU, S.Y.; LIN, C.N.; SHEN, Y.C.; LIN, C.Y.; CHANG, J.S. Exploring Biohydrogen-Production Performance in Three-Phase Fluidized Bed Bioreactors Using Different Types of Immobilized Cells. 16th World Hydrogen Energy Conference, ref 150, 2006.
- WU, K.J.; CHANG, C.F.; CHANG, J.S. Simultaneous Production of Biohydrogen and Bioethanol with Fluidized-Bed and Packed-Bed Bioreactors Containing Immobilized Anaerobic Sludge. *Process Biochemistry*, v. 42, p. 1165–1171, 2007.
- WU, X.; YANG, H.; GUO, L. Effect of Operation Parameters on Anaerobic Fermentation Using Cow Dung as a Source of Microorganisms. *Int. J. Hydrogen Energy*, v. 35, p. 46-51, 2010.
- ZHANG, Z.P.; TAY, J.H.; SHOW, K.Y.; YAN, R.; LIANG, D.T.; LEE, D.J.; JIANG, W.J. Biohydrogen Production in a Granular Activated Carbon Anaerobic Fluidized Bed Reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 32, p. 185 – 191, 2007.
- ZHANG, Z.P.; SHOW, K.Y.; TAY, J.H.; LIANG, D.T.; LEE, D.J. Biohydrogen Production with Anaerobic Fluidized Bed Reactors—A Comparison of Biofilm-Based and Granule-Based Systems. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 33, 1559-1564, 2008.
- ZHU, H.; PARKER, W.; BASNAR, R.; PRORACKI, A.; FALLETTA, P.; BÉLAND, M.; SETO, P. Buffer Requirements for Enhanced Hydrogen Production in Acidogenic Digestion of Food Wastes. *Bioresour. Technol.*, v. 100, p. 5097-5102, 2009.