

HELBERTH JÚNNIOR SANTOS LOPES

Valoração de resíduos e subprodutos agroindustriais utilizando reatores anaeróbios em fermentação escura para produção de hidrogênio, etanol e ácidos orgânicos.

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

Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Silva

São Carlos

2015

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

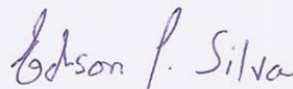
L864v Lopes, Helberth Júnniior Santos
 Valoração de resíduos e subprodutos agroindustriais
 utilizando reatores anaeróbios em fermentação escura
 para produção de hidrogênio, etanol e ácidos orgânicos
 / Helberth Júnniior Santos Lopes. -- São Carlos :
 UFSCar, 2015.
 123 p.

 Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de
 São Carlos, 2015.

 1. Hidrogênio. 2. Etanol. 3. Xilose. 4.
 Hidrolisado. 5. Glicerol. I. Título.

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE HELBERTH JÚNIOR SANTOS LOPES APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 17 DE ABRIL DE 2015.

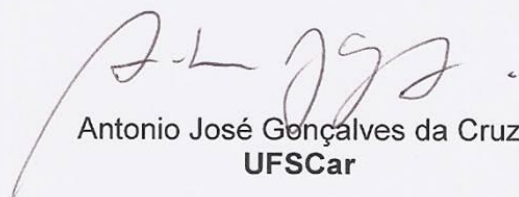
BANCA EXAMINADORA:



Edson Luiz Silva
Orientador, UFSCar



Marcelo Zaiat
USP



Antonio José Gonçalves da Cruz
UFSCar

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho
primeiramente a meus queridos pais
Sebastião Nunes e Meres de Lourdes.*

AGRADECIMENTOS

A Deus e Nossa Senhora Aparecida pela proteção, sabedoria e por permitir mais esta conquista.

A toda minha família pelo carinho e torcida para que esta importante etapa se concretizasse. Em especial meus pais, Sebastião e Meres, e minha irmã Heidy pelo apoio, amor e carinho incondicional.

Ao Prof. Dr. Edson Luiz Silva por acreditar em meu trabalho, pela atenção, suporte teórico prático, comprometimento e incentivo. Muito obrigado por estar presente durante todo o trabalho de maneira solícita e por tornar possível o que foi idealizado sem medir esforços.

A Professora Márcia Damianovic pela avaliação do meu projeto de mestrado e pelas orientações dadas.

Aos Professores Roberto Giordano e Marcelo Zaiat por terem participado da minha qualificação e contribuído com orientações essenciais para finalizar este trabalho.

Ao Dr. Nelson Gallo do Instituto de Física de São Carlos/USP pela atenção e realização das análises de microscopia eletrônica de varredura.

A Professora Paula Rosa por também ter contribuído de maneira ímpar para que este trabalho fosse concretizado.

Aos caríssimos professores Roberto Giordano, José Antônio e Dilson Cardoso pelas disciplinas ministradas. Vocês contribuíram imensamente para minha formação.

Aos anjos da guarda do Departamento de Engenharia química/UFSCar, o super Oscar da Silva e Adilson, por todo apoio, atenção e por serem SEMPRE solícitos.

A todo o Departamento de Engenharia química/UFSCar. Em especial a Raquel pela atenção durante o mestrado e a Thais, Aline e Alessandra pelo apoio e auxílio durante obtenção dos resultados.

Aos companheiros do Laboratório de Controle Ambiental- II/UFSCar (Cristiane, Morgana, Talita, Lucas, Janaína, Samantha, Camila, Tiago, Aline, Carolina, Gabriel e Lívia) pelo companheirismo e contribuição para que este trabalho fosse concretizado. Muito obrigado pelo convívio, boas conversas e experiências compartilhadas.

Aos colegas do DEQ-UFSCar (Homero, Ana Claudia, Eduardo, Bruna, Conrado e Felipe), em especial Vitor e João, muito obrigado pela grande amizade construída.

Ao grande amigo Pedro Mourthé, muito obrigado pelas conversas e pelo apoio durante o mestrado.

Aos meus irmãos Rennan, Sammuél, Vitor, Samuel, Francisco, Marcos e Paulo muito obrigado pela amizade sincera.

A Biocapital, em especial a Carla de Campos por ter gentilmente fornecimento o glicerol bruto utilizado durante o mestrado.

A CAPES e FAPESP pelo apoio e investimento para que este e muitos outros trabalhos pudessem ser concretizados no Laboratório de Controle Ambiental-II/UFSCar.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de hidrogênio, etanol e ácidos orgânicos a partir de diferentes substratos, incluindo resíduos e subprodutos agroindustriais como: soro de queijo, celulose hidrolisada e glicerol bruto e fontes orgânicas simples como: glicose e xilose comerciais. Foram operados três reatores contínuos. Um reator anaeróbio de leite fluidizado (RALF) termofílico, denominado R1, foi operado para avaliar a produção de hidrogênio a partir de hidrolisado celulósico na concentração 2000mg.L^{-1} sob diferentes tempos de detenção hidráulica (TDH), partindo de 24 até 8 h. Outro RALF termofílico (R2) foi utilizado para avaliar a possibilidade de co-fermentação de xilose e glicose para a produção de hidrogênio e etanol. O R2 foi operado em TDH decrescente partindo de 16 até 1 h e concentração fixada em 2000mg.L^{-1} de cada carboidrato. Foi avaliada, também, a produção de hidrogênio e ácido propiônico em reator granular de leite expandido (EGSB en. Expanded granular sludge bed) (R3) operando com co-fermentação de soro de queijo (SQ) e glicerol bruto (GB) em diferentes razões: 5:1, 5:2, 5:3, 5:4 e 5:5 (m/m) e TDH decrescente de 8 até 0,5 h. Para o R1 o rendimento máximo obtido foi $1,1\text{ mol H}_2\text{ mol}^{-1}$ glicose valor este observado em TDH de 8 h. No R2 foi verificado consumo de ambos os substratos em todos os TDH aplicados, porém a conversão de glicose foi superior a da xilose. O rendimento máximo de hidrogênio, $0,401\text{ mol H}_2\text{ mol}^{-1}$ glicose equivalente, foi verificado em TDH de 16 h enquanto o máximo rendimento de etanol, $0,25\text{mol EtOH.mol}^{-1}$ glicose equivalente, foi obtido em TDH de 0,5 h. Em relação ao EGSB, o máximo rendimento de hidrogênio, $0,120\text{ mmol.g-1DQO}$, foi verificado sob relação SQ:GB 5:1 e TDH de 8 h. O máximo rendimento de ácido propiônico, $0,99\text{g.g}^{-1}$ substrato, também foi verificado em TDH de 8 h, porém em relação SQ:GB 5:3. Ao final do trabalho foi feita comparação entre os três reatores. Em relação ao rendimento de hidrogênio o maior resultado foi obtido pelo R1 com o valor de $2,02\text{ mmolH}_2.\text{g}^{-1}\text{DQO}$ aplicada, resultado este verificado em TDH de 8 h. Já em relação ao rendimento energético o maior valor foi observado no R2, $47\text{ KJ.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$, obtido em TDH de 0,5h.

Palavras chave: hidrogênio, etanol, ácido propiônico, hidrolisado, xilose, glicose, soro de queijo em pó, glicerol.

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate hydrogen, ethanol and organic acids productions from several substrate, including, agribusiness byproducts, such as cheese whey, hydrolyzed cellulose and crude glycerol, and simple substrates, such as glucose and xylose. Three continuous reactors were operated. A thermophilic Anaerobic Fluidized Bed Reactor (AFBR), denominated R1, was operated to evaluate hydrogen production from hydrolyzed cellulose. The substrate concentration was 2000mg.L⁻¹ different Hydraulic Retention Times (HRT) ranging from 24 to 6h. Another thermophilic RALF (R2) was used in order to evaluate xylose and glucose co-fermentation to produce hydrogen and ethanol. R2 was operated with HRT starting in 16 h and decreased to 1 h. The substrates concentration was 2000mg.L⁻¹ of each carbohydrate. Hydrogen and propionic acids production was evaluated in Expanded Granular Sludge Bed (EGSB) reactor, operating with Cheese Whey (CW) and Crude Glycerol (CG) co-fermentation in several ratios: 5:1, 5:2, 5:3, 5:4 and 5:5 (m/m) and decreasing HRT from 8 to 0.5h. For R1, maximum yield was 1.1 mol H₂.mol⁻¹ glucose, obtained in HRT of 8h. In R2, the consumption of both substrates was verified. However, glucose consumption was higher than xylose. Maximum hydrogen yield, 0,401 mol H₂ mol⁻¹ glucose equivalent was achieved in HRT of 16h. Maximum ethanol yield, 0,25mol EtOH.mol⁻¹ glucose equivalent, occurred in 0.5h HRT. The EGSB reactor maximum hydrogen yield, 0,120 mmol.g⁻¹DQO, was obtained using a 5:1 CW/RG ratio and HRT of 8h. Maximum propionic acid, 0,99g.g⁻¹substrate, was also verified in HRT of 8h, however, with a 5:3 CW/CG ratio. At the end of the work it was made comparison of three reactors. Toward the hydrogen yield the greatest result was obtained by R1 with the value of 2,02 mmolH₂.g⁻¹DQO applied, this result occurred in HRT of 8h. In relation to energy efficiency the highest value was observed in R2, 47kJ.h⁻¹.L⁻¹, obtained in HRT of 0,5h.

Keywords: Hydrogen, ethanol, propionic acid, hydrolysed, xylose, glucose, cheese whey, glycerol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1- Etapas da digestão anaeróbia	7
Figura 2.2-Diferentes rotas metabólicas durante a produção de hidrogênio e ácidos orgânicos.....	9
Figura 2.3- Projeção da produção brasileira de leite	11
Figura 2.4: Biodiesel produzido no Brasil.....	15
Figura 2.5: Matérias prima para o biodiesel nacional	15
Figura 2.6: Diagrama da produção de biodiesel.....	16
Figura 2.7: Via redutiva e oxidativa do glicerol.....	18
Figura 2.8:Rendimento de hidrogênio a partir do glicerol.	18
Figura 2.9: Oxidação bioquímica da xilose	31
Figura 3.1:Esquema do reator anaeróbio de leito fluidizado (RALF).....	44
Figura 3.2: RALF termofílico em operação contínua.....	44
Figura 3.3: Esquema operacional do reator granular de leito expandido (EGSB).	46
Figura 3.4: Reator EGSB em operação durante a co-fermentação de SQP e glicerol bruto.....	46
Figura 3.5- Fluxograma das etapas operacionais dos reatores	51
Figura 4.1: Conversão de carboidratos no R1 alimentado com hidrolisado celulósico. 56	
Figura 4.2: Redução de DQO no R1 alimentado com hidrolisado celulósico.....	57
Figura 4.3: Concentração afluente e efluente de sulfato.	59
Figura 4.4- Relação DQO/sulfato para o R1 alimentado com hidrolisado celulósico ...	60
Figura 4.5: Composição do biogás no R1 alimentado com hidrolisado celulósico.....	61
Figura 4.6: Produtividade volumétrica de hidrogênio e TCO aplicada no R1	62
Figura 4.7: Metabólitos solúveis produzidos em cada fase de operação do R1	66
Figura 4.8: Rendimento de hidrogênio do R1	67
Figura 4.9: Conversão e concentração afluente e efluente de glicose para o R2	69
Figura 4.10: Conversão e concentração afluente e efluente de xilose para o R2	70
Figura 4.11: Perfil das conversões de glicose e xilose durante a operação do R2.	71
Figura 4.12: Redução de DQO no R2.....	73
Figura 4.13- Composição do biogás produzido pelo R2.	74
Figura 4.14- Produtividade volumétrica de hidrogênio do R2	75
Figura 4.15: Metabólitos solúveis produzidos em cada fase de operação do R2	78
Figura 4.16: Rendimento de hidrogênio do R2	79
Figura 4.17: Seletividade EtOH/HY verificada para o R2.	81

Figura 4.18: Conversão de lactose no R3	83
Figura 4.19: Conversão de glicerol no R3.....	83
Figura 4.20: Remoção de DQO no R3.	87
Figura 4.21: Composição do biogás obtido no R3	88
Figura 4.22: Produtividade volumétrica de hidrogênio do R3	90
Figura 4.23: Metabólitos solúveis produzidos em cada fase de operação do R3	93
Figura 4.24: Rendimento de hidrogênio do R3.	94
Figura 4.25 - HY e PropY durante a operação do R3.....	96
Figura 4.26- Efeito da relação SQ:GB e TDH na seletividade para o R3.	96
Figura 4.27: pH afluente e efluente do R1.....	97
Figura 4.28: pH afluente e efluente do R2.....	97
Figura 4.29: pH afluente e efluente do R3.....	97
Figura 4.30- Estrutura do grânulo metanogênico.	99
Figura 4.31- MEV das amostras do R2 em TDH de 0,5 h a) aumento de 10000x b) aumento de 5000x.....	99
Figura 4.32- MEV das amostras do R3 sob TDH de 0,5 h a) aumento de 10000x b) corte transversal do grânulo com aumento de 100x.	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Substratos puros utilizados na fermentação anaeróbia	10
Tabela 2.2: Resíduos empregados na fermentação anaeróbia.	10
Tabela 3.1: Propriedades da cinasita	45
Tabela 3.2: Meio proposto por Del Nery (1987)	47
Tabela 3.3: Composição do SQ de acordo com a Elegê®	48
Tabela 3.4: Condições operacionais do R1 alimentado com hidrolisado celulósico.....	52
Tabela 3.5: Condições operacionais do R2 alimentado com glicose e xilose.	52
Tabela 3.6: Condições operacionais do R3 alimentado com SQ e glicerol bruto	53
Tabela 4.1 - Conversão e concentração afluente e efluente de hidrolisado para o R1. ...	56
Tabela 4.2: Redução e concentração afluente e efluente de DQO para o R1.....	58
Tabela 4.3: Concentração afluente efluente de sulfato.....	59
Tabela 4.4- Composição do biogás ao longo da operação do R1.....	61
Tabela 4.5- Ácidos orgânicos e álcoois verificados no RALF alimentado com hidrolisado celulósico.	66
Tabela 4.6: Conversão e concentração de carboidratos para o R2.	70
Tabela 4.7: Redução e concentração afluente e efluente de DQO para o R3.....	73
Tabela 4.8: Relação produtividade de hidrogênio e TCO aplicada pra o R2.	75
Tabela 4.9- Ácidos orgânicos e álcoois verificados no RALF alimentado com xilose e glicose.	78
Tabela 4.10: Rendimento de hidrogênio e etanol para o R2.	81
Tabela 4.11: Conversão e concentração afluente e efluente para lactose utilizada no R3.	85
Tabela 4.12: Conversão e concentração afluente e efluente para o glicerol utilizado no R3	85
Tabela 4.13: Conversão e concentração afluente e efluente de DQO para o R3.....	87
Tabela 4.14- Ácidos orgânicos e álcoois verificados no EGSB alimentado com soro de queijo e glicerol.	93
Tabela 4.15- Valores médios de sólidos suspensos voláteis (SSV) ao longo das fases operacionais	98
Tabela 4.16: Comparação entre os valores de HY obtidos no R1, R2 com a literatura.	101
Tabela 4.17- Comparação dos rendimentos em $\text{mmolH}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{DQO}$ entre o R1, R2, e R3 com a literatura.	102

LISTA DE ABREVIATURAS

C5- pentose

C6-hexose

CSTR- *continuous stirred tank reactor*

DQO- demanda química de oxigênio

EGSB- *expanded granular sludge bed reactor*

EtOHY-*ethanol yield*

F-furfural

GB- glicerol bruto

glieq- equivalentes de glicose

HMF- 5-hidroximetilfurfural

HY- *hydrogen yield*

MEV- microscopia electronica de varredura

P_{H₂}- pressão parcial de hidrogênio

PVH- produção volumétrica de hidrogênio

PropY- rendimento de ácido propiônico

R1- reator alimentado com hidrolisado celulósico (2g.L⁻¹)

R2- reator alimentado com xilose (2g.L⁻¹) e glicose (2g.L⁻¹)

R3- reator alimentado com soro de queijo (5g.L⁻¹) e glicerol bruto (1-5g.L⁻¹)

RALF- reator anaeróbico de leito fluidizado

SL- seletividade

SQ- soro de queijo

SST- sólidos suspensos totais

SSV- sólidos suspensos voláteis

ST- sólidos totais

T- temperatura (°C)

TCO- taxa de carregamento orgânico

TDH- tempo de detenção hidráulica

UASB- upflow anaerobic sludge blanket reactor

Vmf- velocidade de minima fluidização

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	OBJETIVOS.....	5
2	Revisão bibliográfica	6
2.1	Hidrogênio: Produção e aplicação.....	6
2.2	Processo anaeróbio aplicado à produção de hidrogênio.....	6
2.3	Fontes orgânicas aplicadas na obtenção do hidrogênio fermentativo.....	9
2.3.1	Soro de queijo.....	11
2.3.2	Glicerol bruto	14
2.3.3	Produção de biocombustível a partir da biomassa lignocelulósica.....	20
2.3.4	Hidrolisado celulósico.....	22
2.3.5	Aplicação de co-substrato na produção de hidrogênio.....	26
2.3.6	Co-fermentação de xilose e glicose.....	30
2.4	Temperatura mesofílica e termofílica aplicada à produção de hidrogênio	33
2.5	Biorreatores aplicados à produção de hidrogênio	37
2.5.1	Reator anaeróbio de leito fluidizado	37
2.5.2	Reator granular de leito expandido	40
3	MATERIAIS E MÉTODOS	42
3.1	Reator anaeróbio de leito fluidizado	43
3.1.1	Material suporte.....	45
3.2	Reator granular de leito expandido	45
3.2.1	Tratamento dos grânulos	47
3.3	Substratos	47
3.3.1	Hidrolisado.....	47
3.3.2	Glicose e xilose	48
3.3.3	Soro de queijo e glicerol.....	48
3.4	Inóculo.....	49

3.4.1	RALF.....	49
3.4.2	EGSB.....	49
3.5	Procedimento de partida dos reatores.....	49
3.6	Condições operacionais.....	51
3.6.1	Reator alimentado com hidrolisado celulósico.....	51
3.6.2	Reator alimentado com glicose e xilose.....	52
3.6.3	Reator alimentado com soro e glicerol.....	52
3.7	Análises Físico-químicas.....	53
3.8	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	54
3.9	Cálculo dos principais parâmetros.....	55
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
4.1	RALF alimentado com hidrolisado celulósico – R1.....	55
4.1.1	Conversão de carboidratos no R1.....	55
4.1.2	Demanda química de oxigênio.....	57
4.1.3	Relação DQO/sulfato.....	58
4.1.4	Composição do biogás produzido no R1.....	60
4.1.5	Produção volumétrica de hidrogênio.....	62
4.1.6	Metabólitos solúveis produzidos.....	63
4.1.7	Rendimento de hidrogênio (HY).....	67
4.2	RALF alimentado com glicose e xilose – R2.....	69
4.2.1	Conversão de carboidrato.....	69
4.2.2	Demanda química de oxigênio.....	72
4.2.3	Composição do biogás produzido no R2.....	73
4.2.4	Produção volumétrica de hidrogênio (PVH).....	74
4.2.5	Metabólitos solúveis produzidos.....	76
4.2.6	Seletividade (SL) e rendimento de hidrogênio (HY).....	79
4.3	EGSB alimentado com soro de queijo e glicerol bruto – R3.....	82

4.3.1	Conversão de substrato no R3	82
4.3.2	Demanda química de oxigênio	86
4.3.3	Composição do biogás produzido no R3.....	88
4.3.4	Produção volumétrica de hidrogênio.....	89
4.3.5	Metabólitos solúveis produzidos	91
4.3.6	Seletividade (SL) Rendimento de hidrogênio para o R3.....	94
4.4	pH e sólidos suspensos	96
4.5	Microscopia Eletrônica de varredura	98
4.6	Análise comparativa e avaliação energética.....	100
5	CONCLUSÕES	103
6	SUGESTÕES.....	105
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106
	ANEXO A- Fluxograma das etapas de hidrólise e remoção de sulfato.	122
	ANEXO B- Balanço de DQO para o R1, R2 e R3.	123

1 INTRODUÇÃO

A utilização do hidrogênio como alternativa energética renovável é uma possibilidade que pode ser considerada diante de algumas vantagens como: alto rendimento na combustão e baixo impacto ambiental. O hidrogênio possui alto poder calorífico, 122 kJ.g^{-1} , o que é 2,75 vezes mais alto que alguns hidrocarbonetos utilizados como combustíveis (Robledo-Narváez et al., 2013). Considerado uma fonte de energia sem geração de gases nocivos ao meio ambiente como SO_2 e CO_2 , o hidrogênio possui como produto de sua combustão apenas vapor d'água (Ren et al., 2010).

Atualmente é crescente o número de estudos com o objetivo de utilizar resíduos e subprodutos agroindustriais como substrato na produção de hidrogênio e ácidos orgânicos. Tais estudos avaliam as diversas possibilidades de se obter energia renovável e um vasto leque de metabólitos solúveis a partir de diferentes fontes de carbono geradas em setores industriais.

Dentre os resíduos agroindustriais existe a biomassa celulósica, gerada em enormes quantidades no Brasil por setores como açúcar e álcool e papel e celulose. Por ser o composto orgânico mais abundante da terra, a celulose possui grande potencial para se tornar a principal fonte de matéria prima na obtenção de energia renovável (Binder e Raines, 2010). Para conversão do material celulósico em hidrogênio, na maioria dos processos é necessária a hidrólise da celulose, almejando-se alcançar redução considerável da sua cristalinidade e solubilização dos açúcares (Ren et al. 2009). Como exemplo do emprego de material celulósico hidrolisado na obtenção de hidrogênio tem-se os trabalhos de Chang et al. (2011), aplicando a palha de arroz hidrolisada como fonte de carbono, e Pattra et al. (2008), utilizando o bagaço da cana-de-açúcar hidrolisado como substrato para fermentação escura.

Uma diversidade de subprodutos é gerada na indústria alimentícia, principalmente na produção de leite e derivados, com destaque para o Brasil que está entre os cinco maiores produtores de leite do mundo (IBGE, 2014). O soro de queijo é principal subproduto gerado durante o processamento do queijo, uma vez que ele é produzido na proporção 10:1 (soro/queijo) (Davila-Vazquez et al., 2009). Assim, o Brasil se encontra entre um dos maiores do mundo em geração de soro de queijo com base no processamento de leite.

Em função do grande volume necessário para armazenamento e difícil logística, o soro de queijo é submetido a processos de concentração, dando assim origem ao soro

de queijo em pó (Kargi, Eren e Ozmihci, 2012). O soro de queijo em pó é considerado um concentrado de lactose, ou seja, uma fonte rica em carboidratos que podem ser utilizados como substrato em bioprocessos. Na literatura podem ser encontrados trabalhos visando a produção de hidrogênio a partir de subprodutos gerados na indústria de laticínios como, soro de queijo (Azbar et al., 2009; Venetsaneas et al., 2009) e soro de queijo em pó (Davila-Vazquez et al., 2008; Rosa et al., 2014).

Análogo à indústria de alimentos, a indústria de biodiesel também processa grande volume de matéria prima, o que conseqüentemente acarreta em quantidades consideráveis de resíduo gerado. O glicerol é o principal resíduo gerado durante a produção do biodiesel, visto que a cada 9 kg de biodiesel produzidos é gerado 1 kg de glicerol bruto (Temudo et al., 2008). No Brasil, em 2013, a produção de biodiesel foi contabilizada em 18,5 milhões de barris equivalente de petróleo (bep) (ANP, 2014). Tendo conhecimento da produção nacional de biodiesel e as expectativas futuras para este setor, pode-se afirmar que grande volume de glicerol será gerado, o que demanda tecnologias para gestão deste resíduo como a utilização do glicerol para obtenção de energia. Além das pesquisas visando a produção de hidrogênio a partir do glicerol (Liu et al., 2013; Kivisto, Santal e Karp, 2013; Trchounian, Sargsyan e Trchounian, 2014), também podem ser encontrados na literatura trabalhos visando a produção de metabólitos solúveis como 1,3-propanodiol (Ying et al., 2006), 2,3-butanodiol (Metsoviti et al., 2012) e ácido propiônico (Dishisha, Alvarez e Hatti-Kaul, 2012) a partir deste resíduo.

A estratégia de co-fermentação de substratos distintos, segundo De Gioannis et al. (2013), visa não só a adequação ambiental de diferentes fontes por um único processo, mas também utilizar diferentes características destes substratos para compor meio de cultivo balanceado em relação à nutrientes e razão carbono/nitrogênio. Outra vantagem do processo de co-fermentação é a redução de logística, pois é possível tratar resíduos gerados por diferentes setores localizados em um mesmo polo. É crescente o número de trabalhos utilizando co-substrato. Por exemplo, Lay et al. (2013) ao verificarem a produção de hidrogênio pela co-fermentação de aguapé com água residual de fábrica de bebidas. Tem-se, também, o estudo realizado por Lin, Wu e Wang (2013), neste trabalho verificou-se a produção de hidrogênio e metano a partir da co-fermentação do lodo de indústria de papel e celulose e resíduo alimentar.

Sabe-se que a biomassa celulósica possui diferentes açúcares em sua composição e que o máximo aproveitamento destes carboidratos resultaria em mais

substrato disponível para obtenção de energia e metabólitos solúveis com valor agregado. Nesse âmbito, surge a possibilidade de co-fermentação de pentoses e hexoses presentes na estrutura lignocelulósica, principalmente xilose e glicose. Existem trabalhos que estudaram a produção de hidrogênio a partir de fontes de carbono simples como xilose (Lin, Wu e Hung, 2008) e glicose (Amorim et al., 2009; Reis e Silva 2011, Laurent et al. 2012), existem ainda, trabalhos sobre a co-fermentação de xilose e glicose na obtenção do hidrogênio fermentativo como Xu et al. (2009) e Ren et al. (2008).

Para a obtenção de hidrogênio e ácidos orgânicos há a possibilidade de se utilizar diferentes tipos de reatores como: batelada (Ho, Chen, Lee, 2012), reator contínuo de tanque agitado (Kestin, Giusti, Azbar, 2012), de leito fixo (Lee et al. 2003), anaeróbio de leito fluidizado (Zhang et al., 2008) e granular de leito expandido (Liu et al., 2011).

Por apresentar características favoráveis ao cultivo biológico e produção de biogás, o reator anaeróbio de leito fluidizado e o granular de leito expandido vêm ganhando respaldo em estudos visando à obtenção de hidrogênio. Estes reatores fornecem adequada transferência de massa de modo que a interação biomassa substrato ocorra efetivamente, além disso, tanto o RALF quanto o EGSB favorecem o desprendimento do biogás gerado, o que reduz a possibilidade de inibição por produto. Além de proporcionar homogeneização adequada estes reatores são capazes de operar com alta densidade celular, o que possibilita a aplicação de reduzidos tempos de detenção hidráulica (Zhang et al., 2008; Liu et al., 2011; Muñoz-Páez et al., 2013; Singh et al., 2013).

Embasado na possibilidade de se obter energia a partir de material celulósico e a necessidade de estudos sobre a produção de hidrogênio em sistemas contínuos, o presente trabalho avaliou a produção de hidrogênio a partir da celulose microcristalina hidrolisada em RALF termofílico. Neste trabalho também foi verificado o efeito do tempo de detenção hidráulica e do íon sulfato presente no hidrolisado durante a produção de hidrogênio.

Devido à escassez de trabalhos avaliando a produção de hidrogênio e metabólitos solúveis a partir da fermentação de xilose e glicose, outro RALF termofílico foi utilizado para avaliar a co-fermentação desses açúcares visando a produção de hidrogênio e etanol. Neste trabalho também foi avaliado o comportamento da produção dos metabólitos em diferentes tempos de detenção hidráulica (TDH). Na literatura poucos trabalhos abordam a produção de hidrogênio a partir de glicose e xilose, ainda

menor é o numero de trabalhos visando à produção de hidrogênio a partir da co-fermentação destes açúcares em modo contínuo. Assim, o presente trabalho visa contribuir com informações sobre tema ainda pouco investigado.

Além dos dois RALF apresentados, foi operado um reator EGSB para avaliar a produção de hidrogênio e ácido propiônico durante a co-fermentação de soro de queijo e glicerol bruto. Para tal investigação, a operação do EGSB foi feita sob diferentes razões soro de queijo em pó:glicerol bruto e tempos de detenção hidráulica.

1.1 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a produção de hidrogênio, etanol e ácidos orgânicos em reatores anaeróbios alimentados com diferentes resíduos e subprodutos agroindustriais sendo eles: glicose, xilose, celulose hidrolisada, glicerol bruto e soro de queijo.

Para alcançar o objetivo geral os seguintes objetivos específicos foram seguidos:

- Acompanhar e avaliar a produção de hidrogênio baseado em parâmetros como composição do biogás, produtividade volumétrica e rendimento.
- Caracterizar a produção e distribuição dos ácidos orgânicos e solventes como: etanol e ácidos acético, butírico e propiônico verificados durante a operação dos reatores apresentados.
- Avaliar o desempenho do RALF alimentado com hidrolisado celulósico na concentração 2g.L^{-1} em diferentes TDH, partindo de 24 até 8 h, durante a produção de hidrogênio e metabólitos solúveis.
- Analisar o efeito do íon sulfato presente no hidrolisado durante a operação do reator.
- Verificar a possibilidade de co-fermentação de xilose e glicose baseado na capacidade de assimilação de ambos açúcares pelo inóculo utilizado e avaliar a produção de hidrogênio e etanol utilizando RALF termofílico e operado sob TDH de 12 até 0,5 h.
- Avaliar as diferentes proporções de soro de queijo em pó e glicerol bruto, e diferentes TDH (8 até 0,5 h) durante a produção de hidrogênio e ácido propiônico em EGSB operado sob condições mesofílicas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Hidrogênio: Produção e aplicação

Mais leve dos gases o hidrogênio é encontrado de forma abundante na natureza, seja na combinação com o oxigênio dando origem a água, nos hidrocarbonetos ou nos organismos vivos (Léon, 2008). Economicamente o hidrogênio movimenta cerca de 40 bilhões de dólares por ano, o que representa, em massa, 15 milhões de toneladas de hidrogênio comercializadas (Gadow et al., 2013). Somado a isto, 3% da energia global é obtida com base no hidrogênio. Segundo análises sobre o painel energético mundial, estima-se que essa fração esteja crescendo de 5 a 10% ao ano (Kirtay, 2011).

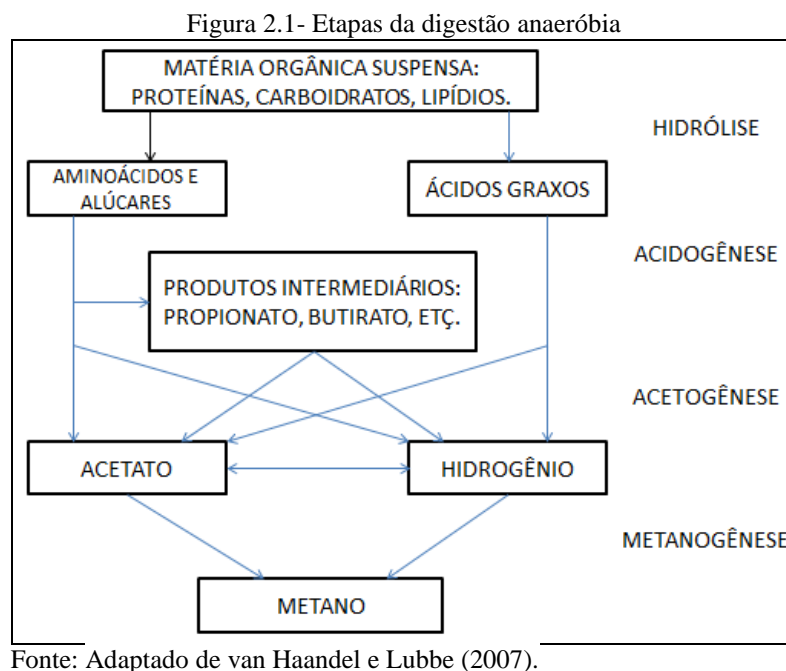
Apesar da crescente demanda energética, grande parte do hidrogênio produzido atualmente é destinada a indústria de fertilizantes e petróleo. Aproximadamente 49% do hidrogênio é destinado à produção de amônia, outros 37% para refino de petróleo e 6% para obtenção de metanol (Balat, 2008). O hidrogênio também pode ser utilizado em células-combustível. Neste processo a eficiência energética dos motores pode alcançar de 50 a 70%, o que é maior quando comparado com motores convencionais, que possuem em média 35% de eficiência (Robledo-Narváez, 2013).

Os métodos convencionais de obtenção do hidrogênio são: Reforma a vapor do metano e oxidação parcial não catalítica de combustíveis fósseis (Kirtay, 2011). O carvão e o coque de petróleo podem servir como matéria prima na produção de H₂, porém o hidrogênio originado de fontes fósseis gera quantidades consideráveis de dióxido de carbono, principal causador do efeito estufa (Balat, 2008). Apesar do baixo custo dos materiais utilizados na reforma a vapor, este processo ocorre em altas temperaturas, cerca de 1200 °C o que contribui para o alto custo operacional. Já a eletrólise da água, por mais que seja uma tecnologia limpa, somente é viável caso a energia elétrica seja barata (Kapdan e Kargi, 2006). Frente aos atuais processos de obtenção de H₂, tornam-se necessárias novas tecnologias e matérias primas para que ele possa se tornar uma alternativa energética de baixo custo e impacto ambiental.

2.2 Processo anaeróbio aplicado à produção de hidrogênio

A digestão anaeróbia é comumente empregada no tratamento de efluente e geração de metano. Este processo pode ser aplicado para produção do biohidrogênio, desde que algumas precauções sejam tomadas, por exemplo, a supressão da

metanogênese (Nissilä et al., 2011). Em anaerobiose, o hidrogênio é produzido como co-produto durante a conversão do substrato em ácidos carboxílicos, que posteriormente, serão convertidos em metano. Ao focar especificamente na produção de hidrogênio, a fase acidogênica deve ser manipulada para favorecer o rendimento deste gás, caso contrário o hidrogênio produzido será consumido durante a metanogênese (Kapdan e Kargi, 2006). A Figura 2.1 apresenta a completa decomposição da matéria orgânica durante a digestão anaeróbia.



Existem três vias para produção biológica do hidrogênio: biofotólise, fotofermentação e fermentação anaeróbia em ausência de luz, ou simplesmente fermentação escura. A biofotólise consiste na absorção e transformação da energia solar em energia química, seguida da decomposição da molécula de água e posterior protonação do íon H^+ , gerando então a molécula de hidrogênio (Pandey *et al.*, 2013). A foto fermentação ocorre pela ação de bactérias fotossintéticas, que também utilizam energia da luz para produção de hidrogênio, porém, o substrato das bactérias fotossintéticas são ácidos orgânicos como butírico e acético (Hallenbeck e Benemann, 2002). No processo de fermentação escura, o carboidrato atua como substrato para bactérias acidogênicas, que por sua vez, convertem os substratos em ácidos orgânicos, CO_2 e hidrogênio (Loubette e Junker, 2006). De acordo com Ren et al. (2009) os processos biológicos vêm ganhando

respaldo, pois através destes, é possível se utilizar diferentes resíduos na produção de H_2 .

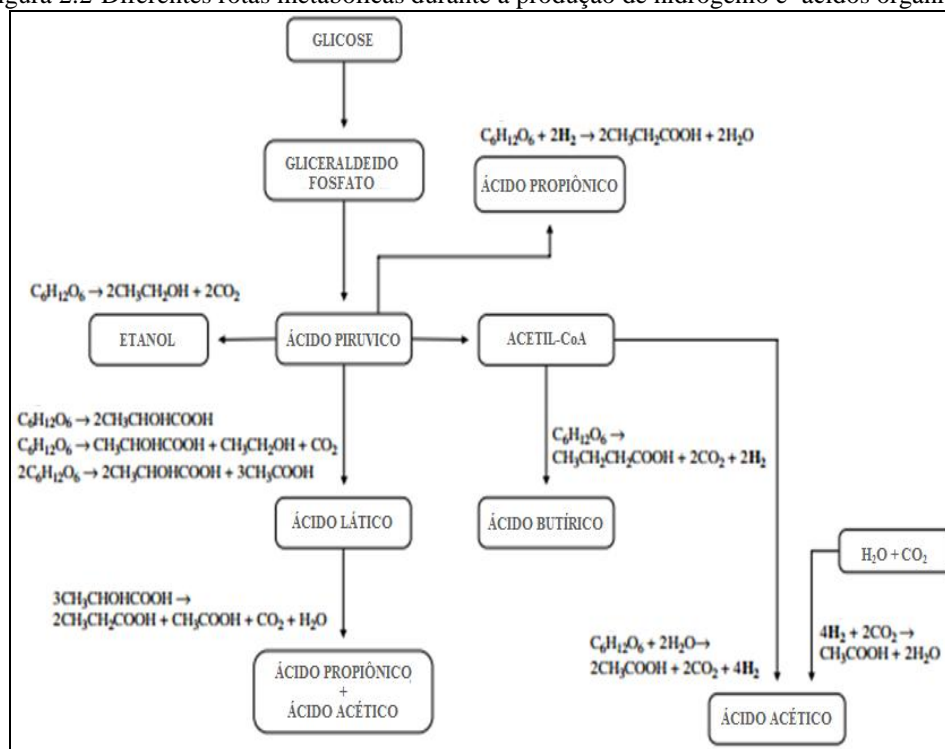
Os processos anaeróbios podem ser uma interessante estratégia na obtenção de hidrogênio em larga escala, assim sendo, muitos estudos estão sendo realizados seguindo esta proposta. A digestão anaeróbia apresenta vantagens, como a maioria das bactérias utilizadas possuem boas taxas de produção de H_2 , a fermentação ocorrer na ausência ou presença de luz e o sistema fermentativo não ser complexo (Muños-Páez et al., 2013).

As culturas utilizadas na obtenção do hidrogênio fermentativo podem ser classificadas de acordo com as bactérias constituintes, caracterizando cultura pura ou mista. Podem ser classificadas também de acordo com a temperatura ótima de cultivo, por exemplo, as mesofílicas (298-313K), termofílicas (313-338K) e hipertermofílicas (338-353K) (Kirtay, 2011).

Diferente da biofotólise em que há a produção de H_2 puro, na fermentação escura o biogás produzido geralmente é composto por H_2 e dióxido de carbono, podendo conter frações mínimas de metano, monóxido de carbono e sulfeto de hidrogênio (Levin, Pitt e Love, 2004). Durante a produção de hidrogênio, diferentes ácidos orgânicos podem ser encontrados em fase líquida. A identificação destes ácidos é de suma importância em estudos sobre a produção do hidrogênio, pois através desta identificação pode-se inferir qual rota metabólica foi predominante no desenvolvimento do processo. A Figura 2.2 apresenta as etapas de oxidação da glicose e os possíveis produtos formados.

Como o processo fotossintético pode utilizar o acetato e butirato produzidos durante a fermentação escura como substrato para produção de hidrogênio, um sistema integrado entre a fermentação escura e a foto-fermentação pode resultar em maior produtividade e economia processual.

Figura 2.2-Diferentes rotas metabólicas durante a produção de hidrogênio e ácidos orgânicos.



Fonte: Adaptado de Antonopoulou et al. (2008).

2.3 Fontes orgânicas aplicadas na obtenção do hidrogênio fermentativo

Grande número de trabalhos empregando processos anaeróbios está direcionado à produção de hidrogênio. Seguindo esta mesma tendência, cresce a variedade de fontes de carbono empregadas na obtenção do biogás. Estas fontes de carbono podem variar de acordo com a atividade agroindustrial ou clima de um país ou região.

Os substratos utilizados na fermentação anaeróbia podem ser classificados em dois grupos. O primeiro grupo é o das fontes orgânicas simples, comumente obtidas em laboratórios e utilizadas para compor afluentes sintéticos. A glicose (Heyndrick et al., 1986; Shen, Bagley e Liss, 2009; Liu et al., 2012) é o substrato mais comum nos estudos sobre a produção do hidrogênio fermentativo. A Tabela 2.1 apresenta outras fontes orgânicas simples utilizadas na obtenção de hidrogênio, rendimento e as condições operacionais utilizadas pelos autores.

Tabela 2.1: Substratos puros utilizados na fermentação anaeróbia

Substrato	Reator	TDH (h)	T (°C)	Cultura	Rendimento Máx. de H ₂	Autor
Sacarose	Batelada	-	32	Mista	1,9mol H ₂ /mol hexose	Hussy et al., 2005
Lactose	CSTR	35,7	58	<i>C. Thermolacticum</i>	3,0mol H ₂ /mol lactose	Collet et al., 2004
Xilose	Batelada	-	37	<i>E. cloacae</i> DT-1	2.8 mol H ₂ /mol xilose	Subudhi et al., 2013
Arabinose	Batelada	-	37	Mista	1,98mol H ₂ /mol arabinose	Danko, Abreu e Alves, 2008
Galactose	Batelada	-	35	Mista	1,0molH ₂ /mol galactose	Park et al., 2014
Celobiose	Batelada	-	35	Mista	2.19 molH ₂ /mol hexose	Adav et al., 2009
Glicerol	UASB	24	37	<i>E. aerogenes</i>	410mmolH ₂ /mol glicerol	Reungsang, Sittijunda e O-Thong, 2013

O outro grupo engloba os resíduos e subprodutos gerados em processos industriais. Apesar da possibilidade desses resíduos conterem impurezas que possam impedir a sua aplicação no processo fermentativo, cabe ressaltar que são fontes abundantes, consideradas renováveis e de baixo custo de obtenção, o que pode reduzir significativamente o custo da energia gerada. De acordo com a Tabela 2.2 pode-se verificar alguns dos variados resíduos e subprodutos agroindustriais aplicados na produção de hidrogênio, as condições operacionais adotadas e os rendimentos máximos.

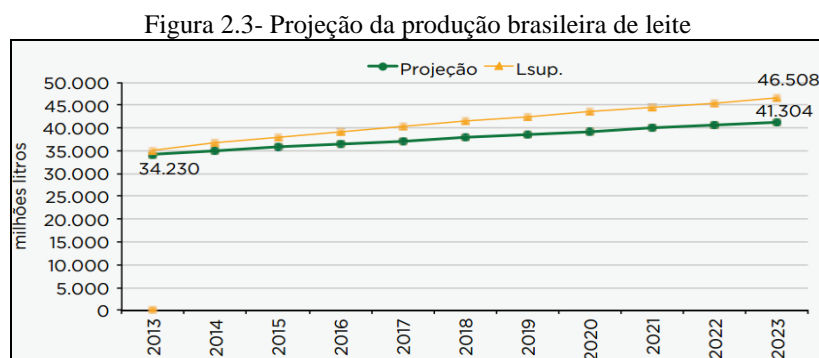
Tabela 2.2-Resíduos empregados na fermentação anaeróbia.

Substrato	Reator	TDH (h)	T (°C)	Rendimento máx.	Autor
Vinhaça (cana-de-açúcar) ^a	Batelada	-	55	2,31mmolH ₂ /gDQO aplicada	Lazaro et al., 2014
Glicerol ^b	Batelada	-	75	2.73 molH ₂ /mol glicerol	Ngo, Kim e Sin, 2011
Bagaço da cana-de-açúcar hidrolisado ^a	Batelada	-	37	0.84 mol H ₂ /mol açúcares totais	Fangkum e Reungsang, 2011
Resíduo alimentar ^a	Batelada	-	37	2,68mol H ₂ / mol hexose	Laothanachareon et al., 2014
Soro de leite em pó ^a	RALF	6	30	1,93mmol H ₂ /gDQO	Rosa, Santos e Silva, 2014
Soro de leite ^a	CSTR	24	35	0,78mol H ₂ / mol glicose consumido	Venetsaneas et al., 2009
Manipueira ^a	Batelada	-	37	438ml H ₂ /g DQO _{rem.}	Sreethawong et al., 2010.

^a Inóculo: cultura mista ^b Inóculo: *Thermotoga neapolitana*

2.3.1 Soro de queijo

De acordo com Embrapa (2012) o Brasil está entre os cinco maiores produtores de leite no mundo, com produção contabilizada em 31 bilhões de litros no ano de 2012. Entretanto, em 2013 a produção aumentou para 34 bilhões de litros/ano. De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (2014), Minas Gerais é o estado com maior produção leiteira, representando 26,6% da produção nacional, seguido pelo Rio Grande do Sul (14,7%) e Paraná (11,5%). Conforme as projeções feitas pelo MAPA (2014), a produção nacional de leite está em constante crescimento, podendo alcançar em 2023 a marca de 46,5 bilhões de litros de leite/ano (Figura 2.3). Considerando a produção de leite prevista para os próximos anos é esperado que também ocorra aumento na atividade dos laticínios.



Fonte: MAPA (2014)

A indústria de laticínio pode ser dividida em diferentes setores, variando entre si de acordo com o produto final. Este tipo de indústria é baseado na manufatura do leite para produção de derivados como: Iogurte, sorvete, manteiga, queijo etc. Apesar das diferentes vias de manufatura do leite, todos estes setores estão associados com a geração de efluentes de alto potencial poluidor, sendo o mais comum o soro de queijo, principal subproduto gerado.

Três diferentes classes de efluente podem ser encontradas em laticínios; soro de queijo doce (pH 6-7), obtido na produção de queijo suíço, muçarela entre outros, soro de queijo ácido (pH<5) gerado durante a produção do queijo cottage e por fim, a água de lavagem do soro, que pode conter diferentes frações de soro doce e ácido. Pelos processos convencionais a cada 1 kg de queijo produzido, 9 kg de soro de queijo são gerados. Estima-se que 10^8 toneladas de soro de queijo são produzidas no mundo anualmente (Davila-Vazquez et al., 2009).

O soro de queijo possui alta demanda química (DQO) e bioquímica (DBO) de oxigênio, o conteúdo de sua carga orgânica está em torno de 50 a 102 kg DQO.m⁻³ (Prazeres, Carvalho e Rivas, 2012). Composto majoritariamente por carboidratos, o soro de queijo também contém minerais traço, sais e vitaminas, porém em menores concentrações (Ferchichi et al., 2005). O seu conteúdo é composto por lactose (39-60 kg.m⁻³), proteínas solúveis de alto valor nutricional e funcional (1,4-8 kg.m⁻³), gordura (0,99-10,58 kg.m⁻³) e sais minerais (0,46-10%) principalmente NaCl e KCl (Prazeres, Carvalho e Rivas, 2012).

Além do nitrogênio presente nas proteínas, este elemento também é encontrado em outros compostos presentes no soro de queijo, como ureia e ácido úrico (Panesar et al., 2007). O soro de queijo normalmente apresenta relação carbono, nitrogênio e fósforo na proporção 200/3,5/1 (Prazeres, Carvalho e Rivas, 2012).

Tendo em mente o valor nutricional e sua aplicabilidade no setor alimentício, o soro de queijo é comumente submetido a processos de valorização. Grande parte dos processos de beneficiamento visa à concentração do soro de queijo, obtenção de lactose pura ou recuperação de proteínas (ex: caseína). Como efeito deste beneficiamento, os laticínios conseguem diminuir a quantidade de resíduos descartados ao meio ambiente. Dentre os processos de valorização do soro de queijo podemos citar a precipitação de suas proteínas pela ação de agentes coagulantes/floculantes (sais de ferro, polifosfato de sódio, etc.), precipitação termo-cálcica (50°C), térmica (90-120°C) e isoelétrica.

O soro de queijo pode ser concentrado por ultrafiltração, porém este é um processo caro, o que inviabiliza o tratamento de grandes quantidades (Kargi, Eren, Ozmihci, 2012a). O processo de atomização do soro de queijo pela técnica conhecida como *spray dryer* dá origem ao soro de queijo em pó, através desta tecnologia torna-se possível processar maiores volumes e com menor custo quando comparado com as tecnologias de separação por membranas. O soro de queijo em pó pode ser definido como um concentrado de lactose, seco, de baixo volume e durável. Seguindo a tendência de utilização de fontes orgânicas para obtenção de metabólitos com valor agregado, há estudos que visam a utilização do soro de queijo em pó para obtenção de metabólitos como ácido lático (Panesar et al., 2007), na obtenção de energia como metano (Ergüder et al., 2001), etanol (Dragone et al., 2011) e hidrogênio (Rosa et al., 2014;).

O rendimento de hidrogênio obtido com base na lactose do soro de queijo está diretamente ligado com os produtos finais do metabolismo. Se o produto final for

acetato, o máximo teórico será 8 mol H₂.mol⁻¹ de lactose consumida (Equação 1), caso o produto final seja o butirato, apenas 4 mols de H₂ serão gerados (Equação 2) (Davila-Vazquez et al., 2011). Entretanto se os produtos finais forem metabólitos como ácido láctico, etanol, butanol ou acetona, possivelmente será verificado rendimento teórico menor que 4 mols H₂.mol⁻¹ de lactose convertida.



Azbar et al. (2009) avaliaram a produção de hidrogênio a partir do soro de queijo em temperatura termofílica. Foram avaliados os efeitos do TDH (1,2 e 3,5 dias) e de diferentes taxas de carregamento orgânico (21, 35 e 47 g_{DQO}.L⁻¹.dia⁻¹) em reator CSTR. Nos TDH 3,5, 2 e 1 h foram obtidos respectivamente os rendimentos 22, 15 e 5 mmol.g⁻¹_{DQO}. Trabalhando com TDH fixo em 1 h foi possível obter os rendimentos de 3, 9 e 6 mmolH₂.g⁻¹_{DQO} nas taxas de carregamento orgânico (TCO) 47, 35 e 21 g_{DQO}.L⁻¹.dia⁻¹ respectivamente. Os principais ácidos detectados no efluente foram os ácidos: acético, isobutírico, butírico e propiônico.

Davila-Vazquez et al. (2009) estudaram a utilização de soro de queijo como substrato na obtenção de hidrogênio por cultura mista. Em reator CSTR mantido a 37°C, foi verificado primeiramente qual TDH (10, 6 e 4 h) propiciaria a maior produção volumétrica de H₂. Em TDH de 6 h foi verificado a maior PVH, 19.3 mmol H₂.L⁻¹.h⁻¹. A segunda parte do estudo consistiu em operar o reator sob TDH de 6 h e verificar a produção de hidrogênio em quatro taxas de carregamento orgânico diferentes: 92.4, 115.5, 138.6, 184.4 g lactose.L⁻¹.dia⁻¹. Após a operação nas quatro condições diferentes, foi verificado maior produção volumétrica e rendimento de 46,61mmol H₂.L⁻¹.h⁻¹ e 2,8mol H₂.mol⁻¹ lactose respectivamente, sob taxa de carregamento orgânico de 138,6 g lactose.L⁻¹.dia⁻¹.37

Kargi, Eren e Ozmihci (2012) verificaram a produção do hidrogênio fermentativo em temperatura termofílica (55°C) utilizando como substrato o soro de queijo em pó. O estudo consistiu em avaliar o efeito da concentração inicial de lactose, variando entre 5,2 e 28,5g.L⁻¹. O maior volume de hidrogênio cumulativo obtido em 360 h de fermentação foi 257mL, alcançado na concentração inicial de 20g glicose.L⁻¹. O maior rendimento, 1,03molH₂.mol⁻¹glicose, foi obtido na concentração inicial 9,5g

glicose.L⁻¹, enquanto a maior produtividade, 2,55mlH₂.h⁻¹, foi obtida na concentração 5,2g glicose.L⁻¹.

Rosa, Santos e Silva (2014) avaliaram a produção de hidrogênio em RALF mesofílico (30°C) empregando diferentes fontes de carbono, os testes foram feitos com glicose, soro de queijo e mistura de glicose e soro de queijo. Nos três experimentos a concentração de substrato e o TDH foram fixos em 5 g DQO. L⁻¹ e 6 h respectivamente. Empregando somente glicose como substrato os autores detectaram o rendimento de 1,37mmol H₂. g⁻¹_{DQO}. No cultivo contendo somente soro de queijo o maior rendimento alcançado foi 1,9mmol H₂.g⁻¹_{DQO}. Operando com co-digestão de glicose e soro de queijo o maior rendimento foi 1,7mmol H₂.g⁻¹_{DQO}. Os autores também verificaram a produção de etanol, com rendimento máximo de 3,45 mol etanol.g⁻¹_{DQO} ao utilizar soro de queijo como substrato.

2.3.2 Glicerol bruto

A produção de biodiesel a nível global está em pleno crescimento, tal fato é explicado pela busca por energias renováveis e as vantagens de sua aplicação. Quando comparado com diesel de origem fóssil, o biodiesel apresenta balanço energético favorável, menor emissão de agentes nocivos ao meio ambiente e inexistência de compostos tóxicos no produto final (Lo et al., 2013).

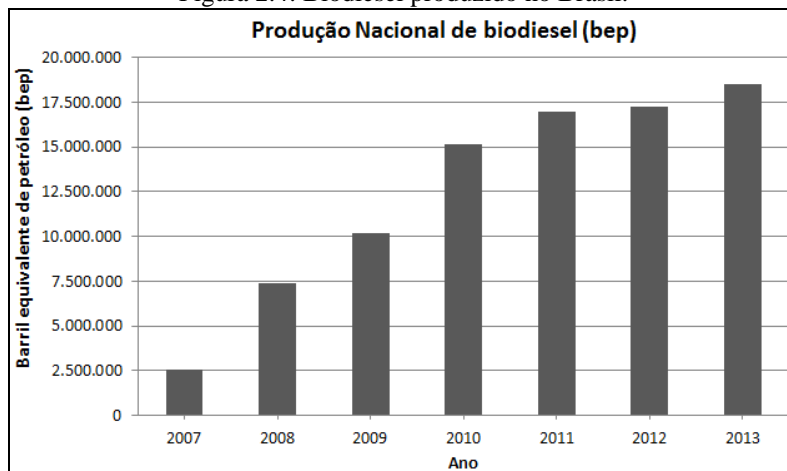
Segundo Sarma et al. (2012) os cinco maiores produtores de biodiesel no mundo são: Alemanha, Estados Unidos, Argentina e Brasil, juntos representando aproximadamente 70% da produção global. Este fato corrobora com as informações cedidas pela ANP (2014), que posiciona o Brasil entre os maiores produtores e consumidores de biodiesel do mundo.

A produção nacional de biodiesel segundo a ANP (2014) está em ascensão, tal fato se dá pelo aumento do volume de biodiesel adicionado ao diesel comercial. Pela resolução n°6/2009 do Conselho Nacional de Política Energética (CNPE), foi autorizado o aumento de 4 para 5% o percentual obrigatório de adição de biodiesel ao diesel (ANP, 2014). Em 05/2014 a medida provisória 647/2014 define como obrigatório a adição de 6% de biodiesel ao óleo diesel comercializado ao consumidor final (BRASIL, 2014).

Em 2013 a produção de biodiesel foi contabilizada em 18,5 milhões de barris equivalentes de petróleo (bep) e o plano nacional é de aumentar a produção biodiesel

anualmente. A projeção da produção de biodiesel no Brasil é representada na Figura 2.4.

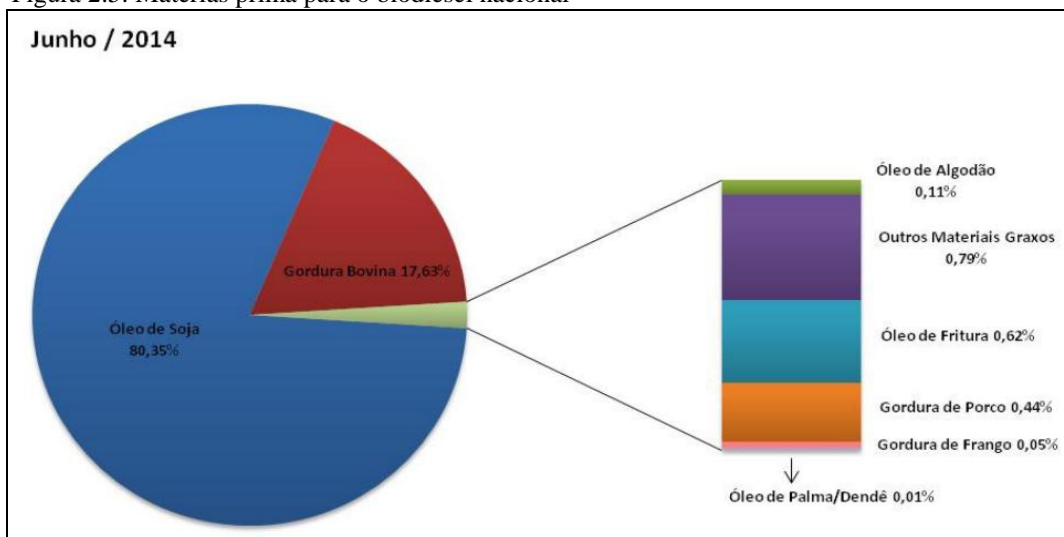
Figura 2.4: Biodiesel produzido no Brasil.



Fonte: ANP 2014 modificada.

A fonte de matéria prima para produção de biodiesel pode ser de origem vegetal, como o óleo de soja, ou animal, como o sebo bovino (Sarma et al., 2013). De acordo com a Figura 2.5, no Brasil as principais fontes não diferem daquelas comumente referenciadas na literatura, cerca de 80% da matéria prima é óleo de soja, seguido da gordura bovina, representando 17%.

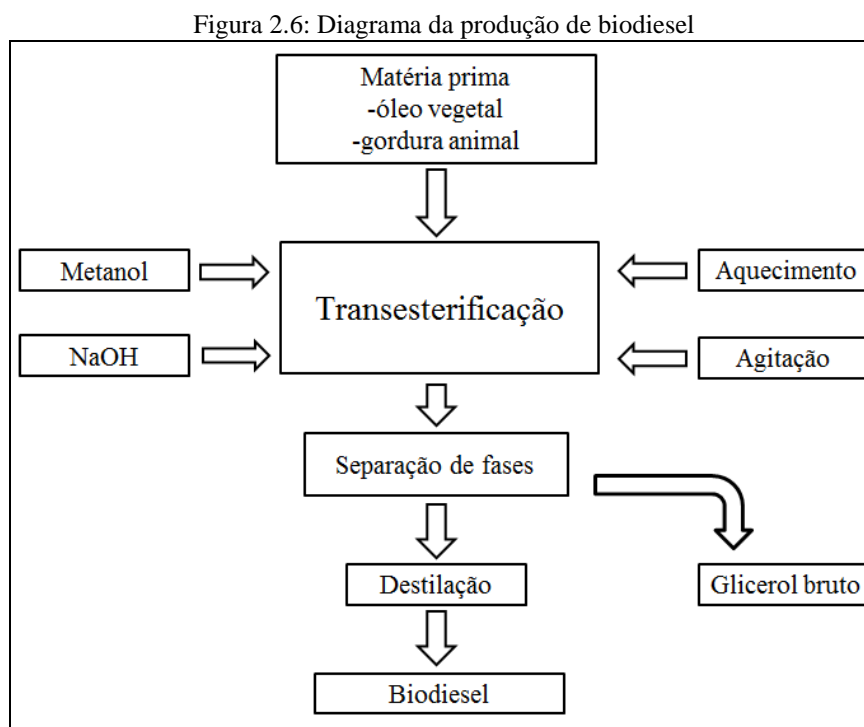
Figura 2.5: Matérias prima para o biodiesel nacional



Fonte: ANP (2014)

O biodiesel pode ser obtido pelo processo de transesterificação catalisado por um agente químico (NaOH ou óxidos metálicos) ou enzimático (lipase) (Liu et al., 2013, Lo et al., 2013). De acordo com as etapas de produção de biodiesel apresentadas na Figura 2.6, triglicérides de origem animal ou vegetal são misturados com metanol

sob agitação. Após esta etapa, adiciona-se hidróxido de sódio (NaOH) com posterior aquecimento do meio reacional até o ponto de ebulição do metanol. Quando a agitação é interrompida há a formação de duas fases, a superior composta por metil ésteres de ácidos graxos (biodiesel) e a inferior composta por glicerol cru e impurezas (Sarma et al., 2012).



Fonte: Adaptado de Sarma et al. (2012)

A cada 90 kg de biodiesel produzido são gerados 10 kg de glicerol bruto (Chookaew, O-Thong e Prasertsan, 2012). Considerando a produção de biodiesel a nível global é possível se ter uma projeção da imensa quantidade de resíduo a ser gerenciado. O aumento da produção de biodiesel nas últimas décadas tem gerado grandes quantidades de glicerol, o que resultou na redução considerável no preço do glicerol bruto (Varrone et al., 2013). Frente a estes fatos, torna-se necessário o desenvolvimento de processos sustentáveis capazes de converter o glicerol bruto, em produtos de maior valor agregado.

Uma vez que o glicerol puro tem aplicações no setor de alimentos, cosméticos e farmacêuticos, o mesmo não se aplica ao glicerol bruto devido as suas impurezas (Chookaew, O-Thong e Prasertsan, 2012). As impurezas encontradas no glicerol bruto são álcoois como metanol ou etanol e compostos alcalinos como NaOH ou KOH, além destes, pode ainda ser encontrados sólidos já presentes na matéria prima, o que torna o

glicerol bruto uma matéria de difícil reaproveitamento (Liu et al., 2013). A maior parte das impurezas no glicerol pode ser removida por processos de destilação ou troca iônica, no entanto, estes processos demandam muita energia e alto investimento.

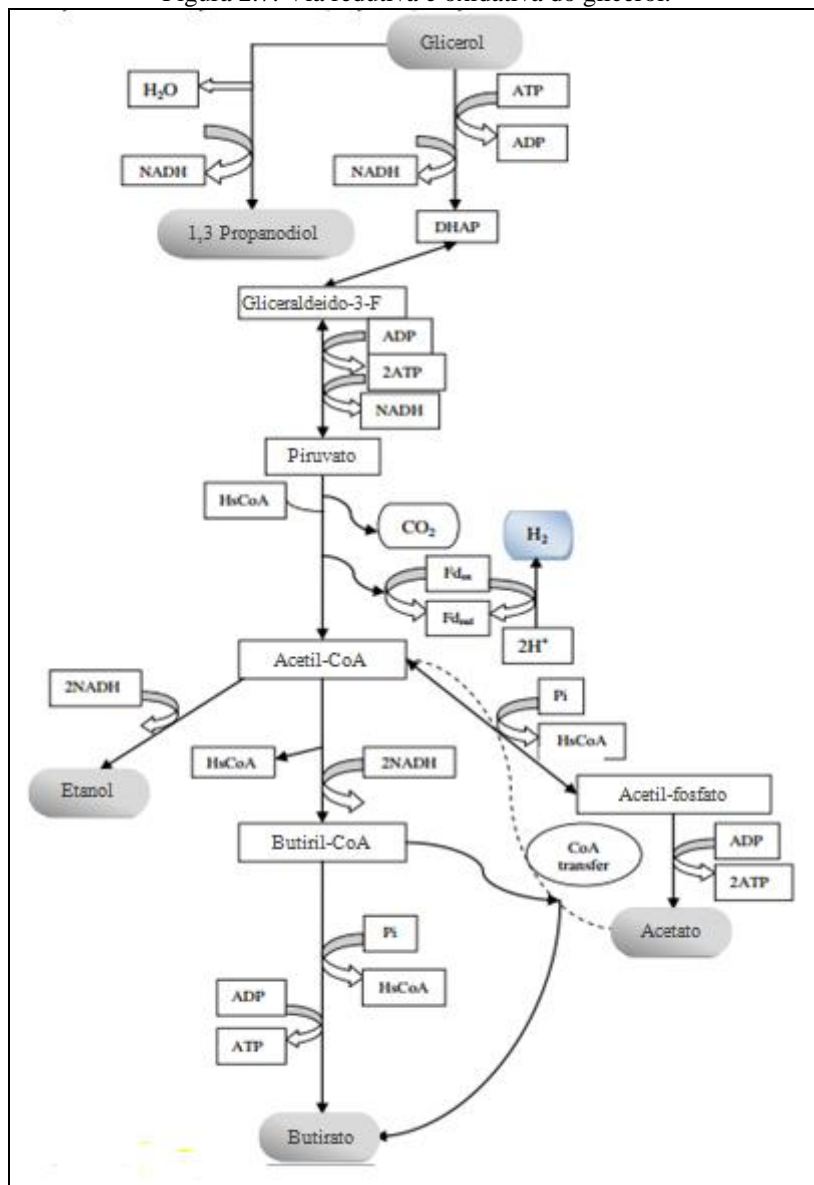
A aplicação da fermentação escura na conversão direta do glicerol bruto em produtos de alto valor agregado apresenta vantagens, como exemplo a completa viabilização da indústria de biodiesel (Yazdani e Gonzalez, 2008). A obtenção de hidrogênio utilizando o glicerol bruto como fonte de carbono vem se mostrando um processo promissor, pois aplica diretamente o conceito de sustentabilidade, além de trazer benefícios econômicos (Lo et al., 2013).

Durante a fermentação anaeróbia o glicerol pode resultar em produtos de valor agregado tanto em fase gasosa, como o hidrogênio (Reungsang, Sittijunda e O-Thong, 2013), quanto em fase líquida, como o 1,3-propanodiol (da Silva, Mack e Contiero, 2009), 2,3-butanodiol (Ito et al., 2005), etanol (Reungsang, Sittijunda e Angelidaki, 2013) e ácido propiônico (Kosmider et al. 2010).

O ácido propiônico possui grande aplicação industrial, de acordo com Dishisha et al. (2013) este ácido é considerado uma *commodity* largamente utilizada como conservantes de alimentos, fármacos, herbicidas e polímeros industriais. O ácido propiônico é obtido principalmente pela conversão de fontes fósseis. Sua produção global é de aproximadamente 350 mil toneladas por ano (Tufvesson et al., 2013). Sabendo da natureza finita dessas fontes fósseis a obtenção do ácido propiônico por matéria prima renovável pode ser uma interessante estratégia. Segundo Liu et al. (2012) seu valor de mercado pode variar de 1 a 2 euros/Kg.

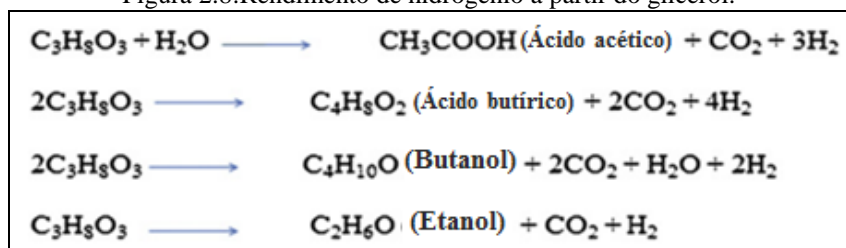
Durante a conversão do glicerol, o rendimento de hidrogênio está ligado aos metabólitos em fase líquida. Na conversão do glicerol, a produção de hidrogênio e 1,3-propanodiol se dão por vias concorrentes. O 1,3-Propanodiol se dá pela via redutiva enquanto pela via oxidativa origina-se o hidrogênio e outros metabólitos solúveis como etanol, acetato, butirato e propionato (Liu et al., 2013). Estas duas rotas citadas encontram-se apresentadas na Figura 2.7. Pela estequiometria (Figura 2.8) pode-se perceber que o rendimento de hidrogênio diminui com a quantidade de produtos reduzidos gerados (Sarma et al., 2012). Quando há a produção de etanol, formiato ou 1,3-propanodiol concomitante à produção de hidrogênio, o rendimento máximo é de 1 mol H₂.mol⁻¹ glicerol (Reungsang, Sittijunda e O-thong, 2013).

Figura 2.7: Via redutiva e oxidativa do glicerol.



Fonte: Adaptado de Temudo et al. (2008)

Figura 2.8:Rendimento de hidrogênio a partir do glicerol.



Fonte: Adaptado de Reungsang, Sittijunda e O-thong (2013)

Trabalhos estão sendo executados visando a produção de hidrogênio a partir do glicerol, dentre estes, o estudo desenvolvido por Selembo et al. (2009), os autores verificaram a conversão do glicerol por cultura mista em produtos de valor agregado. Os

testes foram executados em batelada e foi analisada a obtenção de produtos em fase líquida e gasosa. Como substrato foi utilizado o glicerol puro, glicerol bruto ou glicose, todos na concentração 3,0 g.L⁻¹. Utilizando glicerol puro os autores obtiveram o rendimento máximo de 0,28 molH₂. mol⁻¹glicerol, em fase líquida foi possível obter o rendimento de 0,69mol 1,3-propanodiol.mol⁻¹ glicerol. Empregando o glicerol bruto como substrato foi possível obter o rendimento máximo de 0,31 molH₂.mol⁻¹glicerol e 0,59 mol de 1,3-Propanodiol.mol⁻¹glicerol. Nas mesmas condições experimentais, mas tendo como fonte de carbono a glicose, foi verificado o rendimento máximo de 1,06 mol H₂. mol⁻¹glicose, nesta condição não foi detectado 1,3-propanodiol como metabólito em fase líquida.

Chookaew, O-Thong e Prasertsan (2012) isolaram a espécie *Klebsiella pneumoniae* TR17 e verificaram a produção de hidrogênio a partir de glicerol bruto. Os testes foram feitos em batelada e foi avaliada a influência de três parâmetros, a temperatura, variando de 30 a 50°C, pH inicial, variando de 4,0 até 9,0 e concentração inicial de glicerol partindo de 20 até 100g.L⁻¹. Extrato de levedura foi adicionado ao meio de cultivo para servir como fonte suplementar de nitrogênio. A melhor condição operacional foi em temperatura de 40°C, pH inicial ajustado em 8,0, concentração inicial de glicerol 20 g.L⁻¹ e 2g.L⁻¹ de extrato de levedura. Nesta melhor condição o valor de hidrogênio produzido cumulativamente foi 27,7 mmolH₂.L⁻¹ e rendimento de 0,25 mol H₂.mol⁻¹ de glicerol. Os principais metabólitos em fase líquida foram 1,3-propanodiol , 2,3-butanodiol e etanol.

Reungsang, Sittijunda e O-thong (2013) examinaram a produção de hidrogênio em reator UASB tendo como substrato glicerol puro (glicerina) e glicerol bruto. O objetivo foi aperfeiçoar a taxa de carregamento orgânico em ordem para maximizar taxa de produção de hidrogênio. A concentração ótima verificada para ambas as fontes de carbono foi 50g.L⁻¹. Utilizando o glicerol puro, o valor máximo de conteúdo e taxa de produção foram 37,1% e 9 mmolH₂.L⁻¹h⁻¹ respectivamente. Para o glicerol bruto a maior taxa de produção de hidrogênio foi 6,2 mmolH₂.L⁻¹h⁻¹ e o conteúdo de hidrogênio máximo observado foi de 24,2%. Em fase líquida os principais metabólitos foram etanol, 1,2-propanodiol e ácido fórmico.

Sarma et al. (2013) utilizaram glicerol como fonte de carbono para espécie *E. aerogenes* NRRL B 407 durante a produção de hidrogênio em batelada mantida a 30°C. Neste estudo foi avaliado o efeito da concentração de sabão, metanol ou NaCl no meio de cultivo. O metanol quando teve sua concentração elevada de 1,3 para 3,3g/L

apresentou efeito extremamente negativo na produção de hidrogênio. O aumento na concentração de NaCl de 0,15 para 0,55g.L⁻¹ promoveu o aumento na concentração do hidrogênio cumulativo, de 1,3mmol.L⁻¹ para 1,6mmol.L⁻¹. Segundo os autores isto pode ter ocorrido pelo fato do NaCl ter auxiliado na manutenção do balanço osmótico e ou o NaCl pode ter atuado como agente tamponante no sistema. Diferente do NaCl, o sabão apresentou efeito inibitório na produção de H₂, o aumento na concentração de sabão de 1 g.L⁻¹ para 3 g.L⁻¹ promoveu redução na produção cumulativa de hidrogênio em 33%, de 1,8mmol.L⁻¹ para 1,2mmol.L⁻¹.

Chookaew, O-Thong e Prasertsan (2014) verificaram a produção de hidrogênio fermentativo em reator UASB mantido a 40°C. A produção de hidrogênio foi avaliada sob diferentes TDH, variando de 12 até 2 h, e diferentes concentrações de glicerol bruto, de 10 até 30g de g.L⁻¹. A temperatura e pH foram fixados em 40°C e 8,0 respectivamente. Os autores concluíram que a redução do TDH acarretou no aumento na taxa de produção de hidrogênio e no rendimento do biogás produzido. A maior produção volumétrica de hidrogênio foi 242,15 mmolH₂.L⁻¹d⁻¹, obtida em TDH de 4 h e concentração de glicerol 30g.L⁻¹. O rendimento máximo foi 44,27mmolH₂.g⁻¹ de glicerol detectado também em TDH de 4 h na concentração 10g glicerol. L⁻¹. Em fase líquida o 1,3-propanodiol foi o produto mais abundante.

Chookaew, O-Thong e Prasertsan (2014), verificaram a influência da concentração de glicerol bruto, cloreto de amônio (NH₄Cl) e fosfato de potássio bibásico (KH₂PO₄) na produção de hidrogênio fermentativo em batelada e 40°C. O NH₄Cl foi avaliado como possível fonte de nitrogênio e o KH₂PO₄ como agente tamponante. Os parâmetros ótimos foram 11,14 g glicerol.L⁻¹, NH₄Cl na concentração 6,03g.L⁻¹ e 2,47 g.L⁻¹ de KH₂PO₄. Nessa condição, foi possível obter o rendimento máximo de 0,27 mol H₂.mol⁻¹ de glicerol, bem como o rendimento máximo de etanol em fase líquida, 0,63mol etanol. mol⁻¹ glicerol.

2.3.3 Produção de biocombustível a partir da biomassa lignocelulósica

A utilização da matriz celulósica como matéria prima para obtenção de energia alternativa é um dos grandes objetivos das pesquisas energéticas. Tal fato pode ser justificado pelo volume de biomassa gerado mundialmente. A produção anual de material lignocelulósico está em torno de 222x10⁹ toneladas (massa seca), em maior

parte de resíduos florestais, plantas aquáticas e algas (Chandra, Takeuchi e Hasegawa, 2012).

O uso de biomassa para geração de energia tradicionalmente ocorre por processo físico, como na produção de pellets e briquetes que posteriormente podem ser queimados, e por processos termoquímicos, como exemplo a combustão direta e gaseificação da biomassa. No Brasil, o principal direcionamento da biomassa, principalmente o bagaço da cana-de-açúcar, é a combustão direta para geração de gases com alta temperatura e pressão, que posteriormente serão aplicados na obtenção de energia elétrica (Hofsetz e Silva, 2012). Apesar da maior parte da biomassa gerada ser utilizada em caldeiras, é crescente o estudo em torno de sua utilização para produção de enzimas celulolíticas, etanol de segunda geração e biogás. Além da produção de energia como hidrogênio e álcool, é possível de se obter compostos químicos e proteínas aplicáveis à alimentação humana ou animal (Gadow, Li e Liu 2012).

As fibras celulósicas possuem estrutura parcialmente cristalina, constituída em maior parte de celulose e hemicelulose, que juntamente, encontram-se envolvidas pela lignina (Gadow, Li e Liu 2012). A lignina confere rigidez à fibra celulósica, por estar envolvendo quase por completo os polissacarídeos, ela se torna um fator limitante da hidrólise (Nissilä, Lay e Puhakka, 2014). A composição média dos materiais lignocelulósicos pode ser expressa como sendo de 30-56% celulose, 10-27% hemicelulose e 3-30% lignina, porcentagem esta variando de acordo com a espécie vegetal (Saripan e Reungsang, 2014).

Segundo Nissilä, Lay e Puhakka (2014), entre as vantagens da energia baseada em biomassa pode-se incluir a viabilidade de material a ser utilizado, o fato de ser renovável, redução de gases do efeito estufa, além da possibilidade de criação de novos empregos no setor energético. Resíduos de setores industriais como: papel e celulose, sucroalcooleiro e madeireiro são fontes abundantes de uma matéria prima promissora e economicamente favorável para geração de bioenergia (Lo et al., 2009).

A produção de hidrogênio baseada em materiais lignocelulósico é uma opção atrativa. Este grupo de resíduos é extremamente rico em polissacarídeos, que por sua vez podem ser sujeitos à hidrólise para liberação de açúcares fermentescíveis. Estes resíduos se tornam importantes, pois a sua abundância favorece a possibilidade de se trabalhar em processo contínuo o que resultaria em uma produção estável de hidrogênio. Entretanto, deve-se atentar para o processamento somente de matrizes celulósicas que não sejam utilizadas como fonte alimentar (Saripan e Reungsang, 2014).

A produção do hidrogênio fermentativo a partir de resíduos lignocelulósicos começou a ser explorada em 2006, como o trabalho de Fan et al. (2006) quando estudaram a produção de hidrogênio em fermentação escura utilizando como fonte de carbono a palha de trigo pré-tratada com HCl. As mais diversas fontes estão sendo testado atualmente, como bagaço da cana-de-açúcar, palha de trigo ou milho, cavacos de madeira e algas marinha (Nissila et al., 2012).

2.3.4 Hidrolisado celulósico

Juntamente com a hemicelulose e a lignina, a celulose compõe a matriz denominada lignocelulósica (Gadow, Li, Liu, 2012). A celulose contabiliza aproximadamente 50% em massa seca da biomassa, somado a isto, é o carboidrato mais abundante na natureza (Lo et al., 2009a).

Possuindo estrutura linear ou amorfa de polissacarídeos, a celulose é composta por milhares de moléculas de glicose conectadas entre si. A região cristalina é altamente compacta, enquanto a região amorfa possui espaços vazios e irregulares. A celulose corresponde a fórmula molecular $(C_6H_{10}O_5)_x$ e possui moléculas de glicose interligadas através de ligações β -(1,4)-glicosídicas (Haghighi Mood et al., 2013).

A celulose pode ser naturalmente reduzida a monômeros, porém este é um processo consideravelmente lento (Nissilä, Lay e Puhakka, 2014). Devido à necessidade de açúcares fermentescíveis, e a dificuldade desses açúcares serem disponibilizados de maneira natural, torna-se necessário à aplicação de métodos para a liberação eficaz desses monômeros. Tal estratégia pode ser executada ao submeter a biomassa à hidrólise. Nissilä, Lay e Puhakka, (2014) reforçam que a hidrólise deve apresentar aumento no rendimento de açúcar, ter formação mínima possível de inibidores, possuir considerável custo benefício e se aplicada em resíduo lignocelulósico, permitir a recuperação da lignina para futura conversão em produtos de valor agregado.

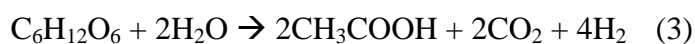
A estrutura celulósica pode requerer a etapa de pré-tratamento para maior eficiência da hidrólise. O pré-tratamento quebra o selo formado pela lignina, além de modificar o tamanho, estrutura e composição química do substrato (Mosier et al., 2005). A hidrólise pode ser executada com agentes químicos como: ácido, base e líquido iônico ou por métodos biológicos desenvolvidos por aplicação de enzimas, fungos ou bactérias (Waghmare et al., 2014). As vantagens dos métodos biológicos incluem condições moderadas de operação e baixa demanda energética, entretanto o sua

aplicação requer maiores investimentos e configuração operacional com maior controle de parâmetros como pH e temperatura.

Os agentes hidrolíticos podem ser aplicados individualmente ou em combinação, como exemplo, tem-se o trabalho desenvolvido por Panagiotopoulos et al. (2012) ao combinar a aplicação de ácido sulfúrico de 0 até 2,0% (m/m) com ação enzimática para hidrólise da palha de cevada. Nguyen *et al.* (2008) estudaram a eficiência de diferentes pré-tratamentos da celulose (ácido, básico ou líquido-iônico) com o intuito de aumentar a produção de hidrogênio pela espécie *Thermotoga neapolitana*. Após o pré-tratamento da celulose microcristalina pelos 3 métodos citados, o autores procederam diferentes fermentações em batelada com os três diferentes hidrolisados. O melhor rendimento e degradação da celulose, 2,2 mol H₂/mol equivalente de glicose e 88,9% respectivamente, foram obtidos utilizando líquido iônico, enquanto o rendimento nos métodos ácido e básico foram 0,95 e 1,22 mol H₂/mol equivalente de glicose e a degradação 77,2 e 54,6%.

Caso a hidrólise básica ou ácida seja aplicada, inibidores como furfural (F), 5-hidroxiacetilfurfural (HMF) e compostos fenólicos podem estar presentes no hidrolisado ao término do processo. Estes compostos podem causar efeito negativo desde a atividade enzimática até a cinética microbiana (Liu et al., 2004). O íon sulfato (SO₄²⁻) também pode ser encontrado no hidrolisado após o processo de hidrólise ácida (H₂SO₄). Tal composto pode apresentar papel negativo durante a obtenção do hidrogênio, uma vez que sua presença pode promover a atividade de bactérias redutoras de sulfato, bactérias estas consumidoras de hidrogênio (Lin e Shen, 2006). Hwang et al. (2009a) afirma que uma das maneiras de se minimizar o consumo de hidrogênio pelas bactérias redutoras de sulfato, seria manter o pH do sistema fermentativo abaixo de 5,5.

O rendimento da produção de H₂ a partir de material celulósico hidrolisado está ligado à natureza do metabólito gerado em fase líquida. Teoricamente, a partir de 1 mol glicose, 4 mols de H₂ são obtidos caso o produto final seja ácido acético (Equação 3), enquanto apenas 2 mols de H₂ são gerados se o produto final for ácido butírico (Equação 4) (Kirtay, 2011).



Na prática, altas concentrações de H₂ ocorrem com a formação conjunta de butirato e acetato, enquanto baixas concentrações de H₂ podem ser justificadas pela formação de propionato e outros produtos reduzidos (Levin, Pitt e Love, 2004).

Em caso de produção concomitante de etanol e acetato o rendimento de hidrogênio pode ser reduzido a 2mol H₂.mol⁻¹ glicose (Equação 5).



Diferentes matrizes celulósicas estão sendo estudadas como fonte de carboidratos na obtenção de biohidrogênio. Oztekin et al. (2008) avaliaram o efeito das relações em massa de N/C (0-0,05), P/C (0-0,02) e Fe(II)/C (0-0,03) na produção de hidrogênio. O experimento utilizou reatores em batelada, cultura termofílica e como substrato trigo em pó submetido a hidrólise ácida. Os autores perceberam que valores menores para as relações estudadas resultaram em baixa produção de hidrogênio, possivelmente devido à quantidade limitada de nutrientes, enquanto altos valores resultaram na inibição dos microrganismos pela possível intoxicação do meio por excesso de fósforo, nitrogênio e Ferro (II). A condição N/C=0,02, P/C=0,008 e Fe(II)/C=0,015, forneceu o máximo rendimento, 2,84 mol H₂.mol⁻¹ glicose. Na condição N/C=0,025, P/C=0,008 e Fe(II)/C=0,015 os autores verificaram maior produção específica de hidrogênio, 96mL g⁻¹ célula h⁻¹.

Pattra et al. (2008) utilizaram bagaço da cana-de-açúcar hidrolisado na produção de hidrogênio em batelada (37°C) pela espécie *Clostridium butyricum*. Na etapa de hidrólise foram avaliados a concentração de H₂SO₄ (0,25-7% v/v) e o tempo de reação (15-240 min), a temperatura reacional foi fixada em 121°C. A condição ótima de hidrólise foi 0,5% de H₂SO₄ e tempo reacional de 60 minutos, nestas condições foi possível obter o rendimento de açúcar equivalente a 24,5 g_{DQO}.L⁻¹. Definida a condição ótima de hidrólise, foi verificado o efeito do pH inicial e concentração de substrato na obtenção de H₂. A melhor condição para produção do biogás foi pH inicial 5,5 e concentração inicial de açúcar 20g_{DQO}.L⁻¹, fornecendo o rendimento máximo de 1,73mol H₂.mol⁻¹ açúcar total e taxa de produção de 1611mL H₂.L⁻¹dia⁻¹.

Lo et al. (2009a) avaliaram a estratégia de mudança de temperatura durante hidrólise bacteriana pela espécie *Cellulomonas uda* E3-01. Os experimentos demonstraram resultado positivo na conversão de celulose em açúcar ao elevar a temperatura de 35°C para 45°C durante a atividade bacteriana, segundo os autores isto

inibiria o crescimento bacteriano, o que reduziria o consumo do açúcar liberado. Esta estratégia teve resultado positivo tanto para estruturas puras (Carboximetil-celulose (CMC), xilana, avicel e celobiose) quanto para fontes naturais (palha e casca de arroz, bagaço e capim elefante). O açúcar resultante da hidrólise bacteriana foi utilizado para obtenção de hidrogênio pela espécie *Clostridium butyricum* CG5S em reator batelada mantido a 37°C. Os maiores resultados de taxa de produção de hidrogênio e rendimento foram alcançados com a CMC hidrolisada, 23,4mL.dia⁻¹ L⁻¹ e 4,79mmol H₂.g⁻¹ açúcar redutor respectivamente.

Lo et al. (2009b) verificaram a produção de hidrogênio fermentativo a partir da hidrólise de bagaço da cana-de-açúcar, capim elefante e celulose comercial. As matrizes celulósicas foram hidrolisadas pela espécie celulolítica *Clostridium* TCW1. Os carboidratos obtidos após esta etapa foram empregados como substrato em diferentes concentrações (07-4,5mg.L⁻¹) para quatro espécies produtoras de hidrogênio. Para condução da etapa acidogênica os autores utilizaram reatores em batelada mantidos a 37°C. Os melhores resultados de produção cumulativa e rendimento de H₂ foram alcançados pela espécie *Clostridium butyricum*, 270mLH₂.L⁻¹, na concentração de 4,52 mg celulose comercial hidrolisada.L⁻¹ e 7,40mmol H₂.g⁻¹ açúcar redutor utilizando capim elefante hidrolisado na concentração de 1,22g.L⁻¹.

Kongjan et al. (2010) avaliaram a produção de hidrogênio a partir de hidrolisado celulósico empregando cultura mista, para tal os autores utilizaram palha de trigo hidrolisada por tratamento hidrotérmico e reator CSTR operado com TDH de 72 h e mantido sob 70 °C. O substrato foi adicionado na concentração 20% (v/v). O maior rendimento e produtividade volumétrica de hidrogênio foram 7,9mmolH₂.g de açúcar total e 184 mL.dia⁻¹.L⁻¹.

Chang et al. (2011) estudaram a produção do hidrogênio fermentativo utilizando a palha de arroz hidrolisada com diferentes ácidos: Sulfúrico, nítrico (HNO₃) e clorídrico(HCl). Os autores também verificaram a produção do hidrogênio com a alimentação direta da palha de arroz *in natura* e o efeito da presença ou ausência de nutrientes no meio fermentativo. A razão utilizada de água/biomassa/ácido foi 100:30:0,9 a temperatura e o tempo de hidrólise foram ajustados em 150°C e 1 h. Para remoção de possíveis agentes tóxicos os autores fizeram uso de hidróxido de cálcio (Ca(OH)₂) e carvão ativado. Durante a produção de hidrogênio fez-se uso de reatores batelada mantidos a 40°C. Com concentração inicial de 3g açúcar. L⁻¹ os maiores rendimentos foram obtidos na ausência de endo-nutrientes no meio reacional, os

máximos rendimentos verificados em foram: 0,00260 (sem adição de ácido), 0,191(H_2SO_4), 0,305 (HCl) e 0,291 mmol $\text{H}_2\cdot\text{g}^{-1}$ palha de arroz (HNO_3).

Sagnak, Kargi e Kapdan (2011) avaliaram a produção de hidrogênio a partir de resíduos de trigo submetidos à hidrólise ácida. Os autores executaram os experimentos em batelada e temperatura mesofílica (37°C). Foi verificado a produção em diferentes concentrações de açúcar de 3,9 até $27,5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ sob concentração constante de células em $1,3\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, e em diferentes concentrações de células, 0,28 até $1,38\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, na concentração constante de açúcar $7,2\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Em relação aos experimentos sob concentração celular constante, o maior rendimento, $1,46\text{mol H}_2\cdot\text{mol}^{-1}$ glicose, bem como a produção específica, $83,6\text{ mL H}_2\cdot\text{g}^{-1}\text{célula h}^{-1}$, foram obtidos na concentração inicial de açúcar $10\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Avaliando as diferentes concentrações celular na produção de hidrogênio, o melhor resultado fornecido, $1221\text{ mL H}_2\cdot\text{g}^{-1}\text{cél. h}^{-1}$ na concentração celular de $0,28\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

Nissilä et al. (2012) verificaram a produção de hidrogênio e metano em batelada tendo como fonte de carboidrato polpa (seca e húmida) de conífera e bétula. Utilizando cultura mista e variando pH de 6 até 9, exceto para produção de metano em que o pH foi fixo em 7,0. Os maiores HY e rendimento de metano verificados foram $560\text{ mL H}_2\cdot\text{g}^{-1}$ sólidos totais (ST) utilizando polpa húmida de bétula e $4800\text{mL CH}_4\cdot\text{g}^{-1}$ ST com polpa de conífera húmida. Os autores verificaram também a produção do biogás utilizando os açúcares obtidos após a hidrólise das polpas de bétula e conífera. Para hidrólise os autores utilizaram H_2SO_4 55% em temperatura de 37°C . O maior rendimento obtido foi $63\text{mL H}_2\cdot\text{g}^{-1}$ ST utilizando a polpa seca de conífera hidrolisada na concentração $4,5\text{g}$ açúcar total. L^{-1} . Apesar do menor rendimento verificado ao se empregar o hidrolisado, este método demandou menor tempo para produção do biogás, 10 dias, em comparação com a alimentação direta da polpa na fermentação que levou 28 dias.

2.3.5 Aplicação de co-substrato na produção de hidrogênio

Na literatura direcionada à produção do hidrogênio fermentativo, grande parte dos trabalhos são estruturados no emprego de apenas um substrato para o desenvolvimento celular. Além da utilização de apenas uma fonte de carbono, há também a possibilidade de aplicação de fontes distintas em um único sistema. A condição de cultivo com mais de um substrato, conhecida como co-fermentação ou co-

digestão, é uma estratégia que vem ganhando espaço, pois abrange um vasto leque de possíveis combinações entre as diversas fontes de carbono disponíveis.

Através da co-digestão é possível se diluir potenciais compostos tóxicos, melhorar o balanço de nutrientes além de possibilitar a atividade sinérgica dos microrganismos presentes na fermentação (Wang et al., 2013). De acordo com De Gioannis et al. (2013) o uso de co-substratos pode ser motivado por outros aspectos como: Tratamento combinado de resíduos, otimização de condições para produção do hidrogênio e a possibilidade de tratar resíduos que poderiam ser de difícil manejo caso fossem trabalhados individualmente. No aspecto econômico, caso a co-fermentação esteja baseada em resíduos agroindustriais, esta estratégia torna-se ainda mais atrativa, pois o processo será desenvolvido a partir de substratos de baixo custo (Gomez-Romero et al., 2014).

Em relação ao balanço de nutrientes, a co-fermentação pode melhorar a relação carbono/nitrogênio (C/N) e promover a suplementação com elementos traços. O nitrogênio é nutriente essencial na fermentação, visto que é constituinte de proteínas, ácidos nucléicos e enzimas, sendo estas estruturas importantes para o crescimento das bactérias produtoras de hidrogênio (Wang e Wan, 2009). Ren et al. (2009) propõe que para suprir a necessidade de nitrogênio durante a fermentação pode ser usado milhocina que é um rejeito da produção de amido de milho. A presença de fosfato também é essencial para produção de hidrogênio, além do seu valor nutricional o fosfato possui caráter tamponante (Bisaillon et al., 2006).

Resíduos orgânicos podem conter vários aminoácidos além de macro e micronutrientes, que empenham papel essencial no desenvolvimento dos microrganismos anaeróbios (Lay et al., 2013). A apropriada relação C/N é ponto central para atividade biológica, assim esta relação pode ser melhorada ao se combinar resíduos distintos com diferentes relações C/N em proporções adequadas (Lay et al., 2013). A relação C/N balanceada também propicia melhora na capacidade tamponante do sistema, o que pode reduzir o efeito inibitório durante a produção de hidrogênio (Wang et al., 2011).

Sittijunda e Reungsang (2012) atentaram para o fato de o glicerol bruto ser uma potencial fonte de carbono para produção de hidrogênio, porém carente de nitrogênio, o que torna necessária a suplementação com fonte externa de N₂ para melhorar a relação C/N. Conhecendo a possibilidade de utilização do glicerol como fonte de carbono, o presente trabalho avaliou a produção de hidrogênio e metabólitos

solúveis utilizando glicerol bruto como substrato em consórcio com soro de queijo em pó, que irá atuar não somente como fonte de carbono (lactose), mas também como fonte suplementar de nitrogênio durante o cultivo.

A exemplo do benefício da co-fermentação, existe a produção de ácido propiônico através de glicerol e glicose. Como foi relatado por Wang e Yang (2013), segundo os autores, o glicerol apresenta a vantagem de produzir altas taxas de ácido propiônico e baixa formação de ácido acético quando comparado à glicose. Devido o seu grau de redução, a produção de metabólitos reduzidos é favorecida, o que pode causar desequilíbrio metabólico no aspecto redução/oxidação, o que afetaria negativamente o desenvolvimento microbiano e a produção de metabólitos desejados, no caso o ácido propiônico. Para corrigir este problema os autores empregam a co-fermentação de glicose e glicerol, pois a glicose pode atuar como suporte energético para o crescimento microbiano e formação dos produtos.

Wang et al. (2011) avaliaram a produção de hidrogênio e metano em sistema de dois estágios, empregando como substrato vinhaça de mandioca em consórcio com lodo. O maior rendimento de hidrogênio, 74mL.g^{-1} sólidos voláteis totais, e de metano, 350mL.g^{-1} sólidos voláteis totais, foram obtidos na razão de vinhaça de mandioca/lodo equivalente a 3:1, o que corresponde a razão C/N de 11,9.

Rosales-Colunga, Razo-Flores e Rodriguez (2012) analisaram a influência do substrato durante a produção de hidrogênio pela espécie *E. Coli* WDHL em batelada a 37°C . Os substratos analisados foram: lactose, glicose e galactose na concentração 15g.L^{-1} . Houve também a aplicação conjunta de glicose e galactose ambos na concentração $7,5\text{g.L}^{-1}$. Os autores perceberam que o tipo de substrato aplicado interferiu diretamente no rendimento e no leque de metabólitos solúveis produzidos. Os rendimentos obtidos com a utilização de lactose, glicose e co-fermentação de glicose e galactose foram respectivamente 1,02, 0,30 e 1,02 $\text{molH}_2.\text{mol}^{-1}$ hexose consumida. Para estes substratos o principal metabólito detectado foi Lactato, o que não ocorreu com o cultivo alimentado com galactose, em que foi observado etanol como principal metabólito solúvel e rendimento de 1,12 $\text{molH}_2.\text{mol}^{-1}$ hexose consumida.

Lay et al. (2013) verificaram a produção de hidrogênio pela co-fermentação de aguapé com água residual de fábrica de bebidas. O aguapé foi utilizado em duas formas durante a co-fermentação, em pó ou em grânulos. O aguapé na forma de grânulos em consórcio com a água residuária da fábrica de bebidas na proporção 1,6/2,4, proporcionou os maiores resultados. O rendimento e produtividade máxima foram

13,65mL.g⁻¹ de substrato e 542 mLH₂.L⁻¹d⁻¹ respectivamente. Os autores destacaram que a melhora na relação C/N foi fator chave para alcançar os resultados.

Wang et al. (2013) estudaram a aplicação de manipueira com diferentes co-substratos para a produção de hidrogênio. Os co-substratos testados foram: esterco suíno, bovino, lodo do processamento de mandioca e lodo ativado. O maior rendimento, 57.8 mL.g⁻¹sólidos voláteis totais, foi detectado durante a co-fermentação utilizando o lodo de processamento de mandioca, este valor representou aumento de 28% no rendimento quando comparado com a fermentação contendo apenas manipueira. Os autores também destacaram a melhora nas relações C/N, C/P além de maior capacidade tamponante do meio.

Lin, Wu e Wang (2013) avaliaram a produção de hidrogênio e metano em dois estágios a partir da co-fermentação de lodo de indústria de papel e celulose e resíduo alimentar. Os melhores resultados foram obtidos na proporção 1:1, apresentando rendimento de 64,48 mL H₂.g⁻¹ sólidos voláteis e 432,3mL CH₄.g⁻¹sólidos voláteis.

Gomez-Romero et al. (2014) estudaram a co-digestão de soro de queijo e resíduos de vegetais e frutas visando a produção de hidrogênio. Para tal foi utilizado cultura mista em reator batelada mantida a 37°C. Os autores avaliaram a produção do biogás em 5 diferentes razões C/N (7, 17, 21,31,46). A maior produção específica de hidrogênio, 10,68 mmolH₂.L⁻¹.h⁻¹, e maior rendimento 449,84mL H₂.g⁻¹DQO foram detectados na razão C/N de 21.

Rosa, Santos e Silva (2014) verificaram a produção de hidrogênio em RALF sob TDH fixo em 6 h e diferentes razões da mistura de glicose com soro de queijo, foi testado também a produção de hidrogênio somente com glicose ou soro de queijo. Durante o trabalho foram utilizados dois reatores, RALF 1, inoculado com lodo proveniente de UASB empregado no tratamento de efluente de suínos e o RALF 2, inoculado com lodo de UASB aplicado no tratamento de efluente de abatedouro de aves. O maior rendimento, 1,37 mmol H₂.g⁻¹ DQO_{aplicada}, foi obtido no RALF 2 ao aplicar somente glicose como substrato. Quando os sistemas operaram com co-fermentação de soro de queijo e glicose o maior rendimento foi novamente obtido no RALF 2 com o valor de 1,7 mmol H₂.g⁻¹ DQO_{aplicada}. Operando somente com soro de queijo o maior rendimento de hidrogênio detectado foi 1,9 mmol H₂.g⁻¹ DQO_{aplicada}, obtido no RALF 1. Neste trabalho também foi observado influência dos substratos na produção de metabólitos em fase líquida. Ao operar em co-fermentação o principal metabólito solúvel foi metanol para ambos os reatores, porém quando os sistemas

operaram somente com soro de queijo em pó o principal metabólito em fase líquida foi etanol.

2.3.6 Co-fermentação de xilose e glicose

Partindo do pressuposto de que o substrato empregado na produção do hidrogênio fermentativo deva ser abundante, facilmente obtido e de baixo custo, cabe então ressaltar a importância de se utilizar a maior parte possível da biomassa lignocelulósica. Sendo esta biomassa composta principalmente de glicose e xilose, torna-se interessante a utilização da maior parte desses açúcares constituintes.

Principal pentose da biomassa lignocelulósica, a xilose está entre os mais abundantes produtos da sacarificação (Lin, Wu e Hung 2008). Durante a etapa de pré-tratamento da biomassa ocorre a hidrólise da hemicelulose, composta principalmente de xilose e glicose (Hniman, Prasertsan e O-Thong, 2011). Após o tratamento da biomassa a xilose pode compor cerca de 40% dos açúcares liberados na hidrólise (Zhao et al., 2010). Tendo como base estas proporções de pentose e hexose presentes na biomassa Chenxi et al. (2013) consideram a co-fermentação destes açúcares uma estratégia viável baseando-se no conceito de bioenergia.

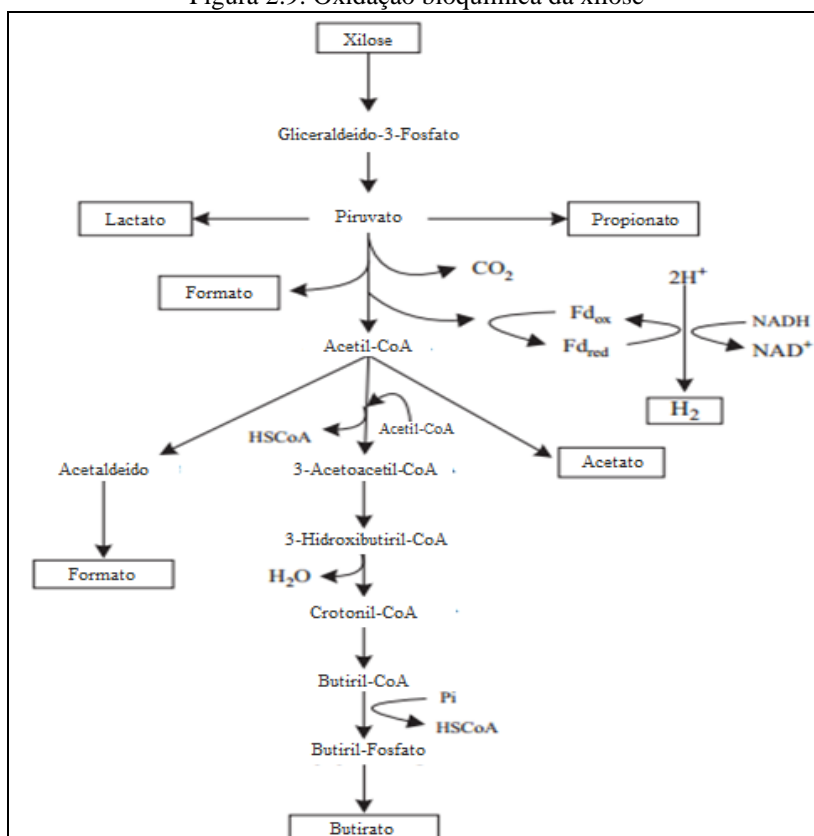
A bioconversão de pentoses a etanol por processos convencionais não é efetiva em termos de rendimento e taxa de produção (Hniman, Prasertsan e O-Thong, 2011). Entretanto o emprego da xilose como substrato na produção de hidrogênio e etanol em fermentação escura pode ser interessante, pois combina produção de energia com redução de resíduos. Assim o aproveitamento da xilose como substrato ou co-substrato durante a fermentação escura pode ser considerada uma alternativa promissora.

A utilização de fontes de carbono mistas tem resultado em maiores rendimentos de H₂ quando comparado com fontes individuais de açúcares (Prakasham et al., 2009). Tal fato foi observado por Xia et al. (2012), os autores verificaram o efeito de co-substratos na conversão anaeróbia da celulose microcristalina utilizada na concentração 4g.L⁻¹. Durante o experimento em batelada foi avaliada a influencia da adição de glicose, xilose ou amido na concentração 10% em relação à concentração de celulose. Após os experimentos em batelada mantidos a 55°C, os autores concluíram que a aplicação de co-substrato, com exceção do amido, beneficiou a utilização da celulose microcristalina. Segundo os autores, o amido não teve efeito positivo, pois ele compete com a celulose como fonte de carbono. A máxima conversão de celulose, 30%,

foi obtida utilizando xilose como co-substrato. Em relação ao rendimento de hidrogênio todos os experimentos utilizando co-substrato forneceu valores superiores em relação à batelada contendo apenas celulose. O rendimento de hidrogênio para o cultivo contendo apenas celulose foi $18,5 \text{ mL.L}^{-1}$, em outra via, com adição de xilose, glicose ou amido os rendimentos foram $180, 132, 109 \text{ mLH}_2.\text{L}^{-1}$ respectivamente.

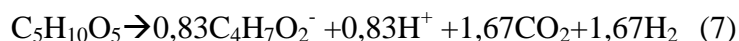
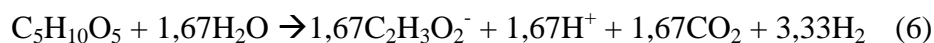
Durante a co-fermentação a xilose e glicose entram na via da glicólise em etapas distintas, no entanto ambas são convertidas a piruvato, o que pode resultar posteriormente em hidrogênio e ácidos carboxílicos (Figura 2.9) (Prakasham et al., 2009).

Figura 2.9: Oxidação bioquímica da xilose



Fonte: Adaptado de Zhao et al. (2010)

Assim como os potenciais substratos apresentados nos tópicos anteriores, o rendimento de hidrogênio a partir da xilose também está ligado aos ácidos orgânicos produzidos. Assumindo o acetato como produto final o máximo teórico é $3,33 \text{ mols H}_2.\text{mol}^{-1}$ xilose convertida (Equação 6), caso seja encontrado somente butirato como produto final $1,67 \text{ molH}_2.\text{mol}^{-1}$ xilose serão obtidos (Equação 7) (Chaganti, Kim e Lalman, 2012).



Atualmente pesquisas sobre a co-fermentação de glicose e xilose aplicada na produção de hidrogênio ainda é limitada. Dentre os trabalhos existentes pode-se citar Ren et al. (2008) quando estudaram a atividade da cepa *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16, na produção de hidrogênio a partir da xilose, glicose e a mistura glicose/xilose. Foram avaliados também o efeito do pH, variando de 4 até 7,5 e da temperatura variando de 30 até 70°C. A condição ótima foi em temperatura 60°C, pH 6,5 e mistura de glicose e xilose na razão 4:1 em concentração total de açúcar 10g/L. Nesta condição foram detectados maior produtividade volumétrica e rendimento de hidrogênio, 12,7mmolH₂.L⁻¹.h⁻¹ e 2,37 mol H₂.mol⁻¹ substrato respectivamente. Os metabólitos predominantes em fase líquida foram acetato e etanol.

Prakasham et al. (2009), investigaram a produção de hidrogênio em condição mesofílica, utilizando cultura mista extraída de esterco de búfalo. Foi empregando como fonte de carbono a mistura de xilose e glicose em diferentes razões. A melhor condição foi pH 6,0 e razão glicose/xilose 2/3, com concentração total de açúcar 5g.L⁻¹. Nesta condição foi possível se obter 1850ml H₂ cumulativamente.

Xu et al. (2010) estudaram a produção do hidrogênio fermentativo pela espécie *Clostridium sp.* HR1, isolada de esterco de vaca. Foram testadas diferentes razões de xilose/glicose em temperatura mesofílica de 37°C, pH inicial fixado em 6,5 e extrato de levedura como fonte externa de nitrogênio. Apesar dos autores notarem uma maior facilidade no consumo de glicose, os maiores rendimentos e produção específica de hidrogênio foram detectados na proporção de xilose/glicose em 9/3 (g/g) com 2,01mol H₂.mol⁻¹ açúcar e 12,56mmol H₂.h⁻¹ g⁻¹ de célula em base seca respectivamente. Durante a fermentação os principais metabólitos em fase líquida foram etanol e acetato.

Hniman, O-Thong e Prasertsan (2011) constataram a produção do hidrogênio fermentativo por cultura isolada de sedimentos de fonte geotérmica. Em temperatura de 60°C foi verificada a possibilidade de utilizar xilose e glicose como fonte de carbono. As fermentações foram procedidas da seguinte forma: Todas as amostras foram submetidas ao cultivo de batelada em série, ou seja, as células cultivadas na primeira batelada foram transferidas para outros frascos contendo o mesmo meio do primeiro experimento, esta transferência foi executada por repedidas vezes. Os melhores

resultados foram obtidos da amostra de sedimento denominada PGR após a segunda transferência, na qual foi possível obter-se $375\text{mLH}_2\cdot\text{g}^{-1}$ açúcar consumido. Em fase líquida os metabólitos em maior concentração foram butirato e acetato. Após a definição da melhor etapa na produção de hidrogênio as células bacterianas foram identificadas. Os resultados apontaram a predominância das espécies *Thermoanaerobacterium*, *Thermoanaerobacter* e *Caloramator*.

Chenxi et al. (2013) estudaram a produção simultânea de hidrogênio e etanol em diferentes razões de glicose/xilose sob temperatura hiper-termofílica 70°C . O efeito da fonte de carbono foi estudado em batelada, enquanto que o efeito do pH foi verificado em reator de fluxo ascendente somente após definirem qual a melhor razão de glicose/xilose. A melhor proporção de xilose/glicose encontrada foi 1/1 na concentração total de $5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Nesta concentração o rendimento de etanol e hidrogênio foram respectivamente $1,54\text{ mol etanol}\cdot\text{mol}^{-1}\text{ hexose}$ e $0,2\text{mol H}_2\cdot\text{mol}^{-1}\text{ hexose}$ (considerando 1 mol de xilose equivale a $5/6$ mol hexose). Após definir qual a melhor proporção, os autores procederam ao experimento em reator contínuo para avaliar o efeito do pH. Em reator de fluxo ascendente, a melhor faixa de pH observada foi de 5,8 a 6,6, em que foi possível alcançar a maior produção volumétrica de hidrogênio, $51,5\text{ml}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, e maior concentração de etanol, $59,2\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$.

Zhao, Lu e Wang (2013) comprovaram a produção de etanol e hidrogênio em condições hiper-termofílicas em reator UASB (Up-flow Anaerobic Sludge Bed). Como substrato foram utilizados glicose e xilose na razão 1:1 e concentração total de açúcares $20\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. A produção foi estudada em diferentes TDH, partindo de 24 até 6 h. A maior produção volumétrica de hidrogênio e etanol foram detectadas em TDH de 12h, com valores de $121\text{ mLH}_2\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ e $6,7\text{mmol EtOH}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Neste mesmo TDH também foram obtido os maiores rendimentos de hidrogênio e etanol $0,58\text{ molH}_2\cdot\text{mol}^{-1}\text{ hexose}$ e $0,72\text{mol EtOH}\cdot\text{mol}^{-1}\text{ hexose}$, alcançando o rendimento energético de $1151\text{KJ}\cdot\text{mol}^{-1}\text{ hexose}$.

2.4 Temperatura mesofílica e termofílica aplicada à produção de hidrogênio

Muitos fatores estão envolvidos na produção ótima de hidrogênio como: doador de elétrons, cultura utilizada, densidade celular, pressão parcial, temperatura e pH no interior do reator. Dentre estes fatores a temperatura é um dos mais importantes,

pois afeta diretamente aspectos biológicos e físicos essenciais para produção de hidrogênio (Zhang e Shen, 2006).

Processos anaeróbios são facilmente afetados por mudanças de temperatura, essas mudanças podem influenciar tanto no consumo de substrato quanto na produção de hidrogênio, distribuição de metabolitos em fase líquida e até alterar a comunidade microbiana (Lin, Wu e Hung, 2008). Um exemplo do efeito da temperatura na comunidade microbiana é o estudo feito por Shi et al. (2013) em que utilizaram alga marinha como fonte de carbono na produção de hidrogênio. O experimento foi conduzido em batelada sequencial sob diferentes temperaturas (35, 50 e 65°C) e de acordo com os autores, o aumento na temperatura de 35 para 65°C, provocou redução da diversidade microbiana no meio fermentativo, também foi verificado mudança das espécies predominantes nas diferentes temperaturas aplicadas.

Aumento em níveis adequados de temperatura pode favorecer a atividade das bactérias produtoras de hidrogênio, entretanto, grandes alterações podem causar efeito reverso, acarretando em inibição da produção de H₂ (Zhang e Shen, 2006). Este fato foi observado por Junghare, Subudhi e Lal (2012) ao verificarem a produção de hidrogênio a partir de glicose em diferentes temperaturas, 25 até 55°C. Os autores observaram que tanto a produção de hidrogênio quanto a densidade celular aumentaram paralelamente com a temperatura até 37°C. Porém, com os subsequentes aumentos de temperatura, a densidade celular e a produção de hidrogênio caíram drasticamente. A 37°C a produção de hidrogênio alcançou valores próximos a 60 mmol.L⁻¹, porém com os posteriores aumentos para 47, 50 e 55°C a produção de hidrogênio reduziu para valores abaixo de 10 mmol.L⁻¹.

Grande número de trabalhos sugere o cultivo em altas temperaturas (>50°C), nas quais a solubilidade do gás produzido é reduzida, o que facilita o seu desprendimento (Kirtay, 2011). Este fenômeno contribui para que a pressão parcial do hidrogênio não seja fator inibitório na sua geração (Liu et al., 2013). A pressão parcial do hidrogênio (P_{H₂}) é fator chave durante a fermentação. A produção de hidrogênio se dá pela reoxidação da ferredoxina e de coenzimas, porém este processo se torna desfavorável à medida que a concentração de hidrogênio em fase líquida aumenta (Hawkes et al., 2002). Devido o aumento da concentração de hidrogênio e redução de sua síntese ocorrem desvios metabólicos, em função destas mudanças de rota, metabolitos reduzidos como etanol, butanol e lactato passam a ser produzidos ao invés de acetato e butirato (Levin, Pitt e Love, 2004, Lee et al., 2012).

A inibição da produção de H_2 causada pelo aumento de sua concentração em fase líquida é análoga à inibição causada pelo etanol durante a fermentação alcoólica, sendo este fenômeno denominado inibição por produto. Tendo ciência dos efeitos da pressão parcial do hidrogênio, torna-se necessário o desprendimento do gás de maneira contínua, pois quanto menor a concentração de hidrogênio em meio líquido menor serão os efeitos inibitórios durante a fermentação.

O efeito da pressão parcial de hidrogênio durante a fermentação foi estudado por Mizuno et al. (2012), os autores verificaram o efeito das aspensão de nitrogênio no meio fermentativo como estratégia para reduzir a concentração de hidrogênio em fase líquida. A fermentação foi conduzida em reator CSTR sob TDH fixo em 8,5 h e temperatura $35^\circ C$, como fonte de carbono para cultura mista foi utilizada glicose na concentração de $10g.L^{-1}$. O rendimento de $0,85 molH_2.mol^{-1} glicose_{consumida}$ e produtividade de $2,08 mLH_2.min^{-1}L^{-1}$ foram obtidos sem aspensão de nitrogênio. Utilizando a estratégia de aspensão de N_2 foi verificado maior rendimento, $1,43 mol H_2.mol^{-1} glicose_{consumida}$ e produtividade de $3,31 mLH_2.min^{-1}L^{-1}$. Comprovando assim os efeitos inibitórios de altas concentrações de hidrogênio em fase líquida. Junghare, Subudhi e Lal (2012) também observaram melhores resultados na produção do biogás sob menores concentrações de hidrogênio em fase líquida. Foram procedidas bateladas em condições mesofílicas e como fonte de carbono para a espécie *Clostridium butyricum* TM-9A foi utilizada glicose. A fermentação foi executada sob diferentes razões líquido/gás (v/v) sendo elas 1/1, 1/3, 1/6, 1/9 e 1/12. Com a redução da P_{H_2} foi detectado considerável aumento na produção de hidrogênio, sob P_{H_2} de 33,90 kPa correspondente a razão líquido/gás 1/1 a produção de hidrogênio foi $26,6 mmol.L^{-1}$, porém na razão 1/12 e P_{H_2} 10,12 kPa a produção foi de $69,65 mmolH_2.L^{-1}$ equivalente ao rendimento de $3,1 molH_2.mol^{-1} glicose$. Foi verificada também maior densidade celular em menores valores de P_{H_2} .

Além de propiciar o desprendimento de gases, altas temperaturas favorecem a atividade enzimática no cultivo anaeróbico, impede a síntese de variados produtos em fase líquida, além de impedir a proliferação de patogênicos (Kargi, Eren e Ozmihci 2012; Liu et al., 2013).

A temperatura ótima para produção de H_2 por bactérias acidogênicas pode variar de acordo com a cultura empregada. Apesar da existência de muitos trabalhos verificando o efeito da temperatura na produção de hidrogênio, os resultados diferem entre si no aspecto “temperatura ótima de produção”. As possíveis razões para os

diferentes resultados reportados podem ser os diferentes substratos e concentrações utilizadas, tipo de reator, faixas de temperatura estudada e tipo de inóculo (Wang e Wan, 2008).

Pakarinen, Lehtomaki e Rintala (2008) verificaram a influência de diferentes faixas de temperatura na produção de hidrogênio em batelada a partir de silagem de capim. Também foi estudado a influência de diferentes inóculos com e sem tratamento para supressão de células metanogênicas, diferentes faixas de pH inicial (4, 5 e 6) e diferentes razões de substrato/inóculo (1:1, 1,5:1, 2:1). A condição ótima verificada pelos autores foi pH entre 5 e 6, temperatura 70°C e lodo originado em biodigestor de matéria orgânica bovina após aplicação de tratamento térmico. Nesta condição foi verificado maior rendimento de hidrogênio, 16 mL.g⁻¹ sólidos voláteis.

Lin et al. (2008) utilizaram xilose como substrato e inóculo misto durante a avaliação da produção de hidrogênio em quimiostato operado em diferentes temperaturas, de 30 até 55°C em intervalos de 5°C. Os resultados obtidos demonstraram que os maiores rendimentos e produtividade foram alcançados em temperatura mesofílica, sendo a temperatura ótima 40°C, em que foi possível se obter o rendimento máximo de 1,3 mol H₂.mol⁻¹ xilose e a maior produtividade 1,08 mol H₂.L⁻¹.dia⁻¹.

Luo et al. (2010) estudaram a produção de hidrogênio em batelada a partir de vinhaça de mandioca nas temperaturas 37, 60 e 75°C e como inóculo foi utilizado lodo mesofílico. Apesar da natureza mesofílica do inóculo, os melhores resultados foram obtidos no cultivo em faixa termofílica (60°C), com o rendimento máximo de 53.8 ml H₂.g⁻¹ de sólidos voláteis, 53% maior que o rendimento obtido em fermentação mesofílica.

Lazaro et al. (2014) verificaram o efeito da temperatura e concentração de vinhaça da cana de açúcar durante a produção de hidrogênio. A produção foi avaliada nas temperaturas 37 e 55°C e concentrações de vinhaça partindo de 2 até 12 g_{DQO}.L⁻¹. Foi observado pelos autores que em temperatura mesofílica o aumento da concentração do substrato não impactou no rendimento de hidrogênio, se mantendo entre 1,72 até 2,23 mmol H₂.g DQO_{aplicada}. Sob temperatura termofílica, o aumento da concentração de vinhaça resultou em redução no rendimento do biogás, caindo de 2,31 para 0,44 mmol H₂.g DQO_{aplicada}.

2.5 Biorreatores aplicados à produção de hidrogênio

Diferentes configurações de reatores estão disponíveis para condução de processos biológicos. Grande quantidade dos trabalhos envolvendo a produção de biohidrogênio é realizada a partir de biorreatores em regime batelada, este fato pode ser explicado pelo fato dos experimentos serem menos complexos, uma vez que estes sistemas são constituídos por frascos corretamente fechados sob anaerobiose.

Além dos experimentos em batelada há na literatura o emprego de diversos reatores para produção de hidrogênio como: Reator contínuo de tanque agitado (CSTR; do inglês: *Continuous Stirred Tank Reactor*) (Liu et al., 2013), reator anaeróbico de manta de lodo (UASB, do inglês: *Upflow anaerobic sludge blanket*) (Fang, Boe e Angelidaki, 2011), reator de fluxo ascendente (Chenxi et al., 2013) e reator de leito fixo (Lee et al., 2013).

Os diferentes tipos de reatores podem se diferenciar pelo modo como as células estão contidas em seu interior, aderidas ou suspensas, em relação ao leito, fixo, expandido ou fluidizado e até mesmo no aspecto da homogeneização que pode ser através de impelidor ou recirculação de fluido.

2.5.1 Reator anaeróbico de leito fluidizado

Alguns sistemas fermentativos apresentam dificuldades em manter a população bacteriana retida no reator, principalmente ao operar em baixos TDH. Este fato pode vir a causar problemas como produção instável e baixa produtividade de H₂ (Amorim et al. 2009). Com base no exposto, infere-se que um dos fatores cruciais na produção de hidrogênio seja a retenção celular, especialmente em baixos TDH.

Para exemplificar os problemas causados pela lavagem das células do reator tem-se o CSTR, um sistema típico de células suspensas. Normalmente este reator proporciona baixa taxa de produção de hidrogênio, tal fato explica-se por sua dificuldade em reter biomassa bacteriana em reduzidos TDH (Zhang et al., 2007).

Dentre os reatores anaeróbicos de alta taxa utilizados na produção de hidrogênio existe o reator anaeróbico de leito fluidizado (RALF). Neste tipo de reator as células acidogênicas são retidas naturalmente por aderência do biofilme ao meio suporte contido no reator (Kida et al., 1990; Barros e Silva 2012). Este tipo de reator com biofilme aderido é largamente empregado em tratamento de efluentes, pois esta

configuração apresenta alta eficiência e capacidade de operação em menores TDH (Barros et al., 2010).

Além de ser um reator de configuração compacta e de fácil operação, no aspecto fluidodinâmico este reator apresenta pequena diferença de pressão ao longo do leito e favorece o desprendimento de gases produzidos (Shin et al., 2011; Andalib et al., 2014). Com a fluidização promovendo adequada mistura no interior do RALF, a transferência de massa entre o substrato e os microrganismos presentes no sistema ocorre de maneira satisfatória (Shida et al., 2009). Além de promover o contato substrato/microrganismo, o fato de o leito estar fluidizado, proporciona ganho na área efetiva de depósito bacteriano ao meio suporte (Reis e Silva, 2011).

Apesar das características favoráveis do RALF para produção de hidrogênio, um número limitado de trabalhos utiliza esta configuração de reator para produção do biogás. Dentre os trabalhos que confirmam a capacidade de emprego deste reator na produção de H₂ temos o estudo desenvolvido por Amorim et al. (2009), em que estudaram a viabilidade da argila expandida (cinasita) como material suporte para adesão da biomassa. Como substrato foi utilizada glicose na concentração fixa em 2,0 g.L⁻¹, o TDH variou de forma decrescente de 8 até 1 h. O rendimento de hidrogênio aumentou com a redução de TDH até 2 h, alcançando 2,49 molH₂.mol⁻¹glicose. No TDH de 1 h o rendimento apresentou leve queda, chegando ao valor de 2,41 molH₂.mol⁻¹glicose. Os metabólitos em fase líquida foram os ácidos acéticos e butírico com suas máximas concentrações de 53 e 44,9% respectivamente.

Shida et al. (2009) avaliaram a estabilidade na produção de hidrogênio em RALF, como substrato foi empregado a glicose pura (2g.L⁻¹), o TDH variou de 8 até 1 h sob temperatura de 30°C e pH 3,8. Com a redução do TDH foi verificado aumento produtividade volumétrica de hidrogênio (PVH), sendo a máxima 1,28 Lh⁻¹L⁻¹ obtida em TDH de 1 h. O rendimento de hidrogênio de um modo geral também aumentou com o decréscimo do TDH, o valor máximo obtido, 2,29 molH₂.mol⁻¹glicose foi verificado em TDH de 2 h. Ao fim do trabalho foi observado que o RALF possibilita uma produção estável de hidrogênio, pois ele propicia condições adequadas para o cultivo e desprendimento do hidrogênio produzido. Além disso, existe o fato do material suporte ser propício para boa adesão celular.

Ngoma et al. (2011) estudaram a influência da temperatura e da velocidade de recirculação no RALF para produção de hidrogênio. Utilizando cultura mista e TDH fixo em 1,6 h, os autores avaliaram a produção de hidrogênio nas temperaturas 45 e

70°C e sob as vazões de recirculação 1,3 e 3,5 L.min⁻¹. Com temperatura fixa em 45°C, a produção de hidrogênio aumentou de 10,6 para 43,2 L.h⁻¹ com o aumento da vazão de recirculação de 1,3 para 3,5 L.min⁻¹, em resposta desta alteração na recirculação também foi detectado aumento expressivo na produtividade do biogás passando de 2,1 para 8,7 LH₂.L⁻¹.h⁻¹. Operando o reator em 70°C também foi observado aumento na produção e produtividade após elevar a vazão de recirculação. A produção aumentou de 13,8 para 73,8 L.h⁻¹ e a produtividade de 2,8 para 14,87 LH₂.L⁻¹.h⁻¹. O hidrogênio compôs 45% do biogás produzido em 45°C enquanto em 70°C o hidrogênio contabilizou 67% do biogás gerado. Os máximos rendimentos de hidrogênio em 45 e 70°C foram 1,24 e 2,2 molH₂.mol⁻¹ glicose.

Reis e Silva (2011) estudaram o efeito da velocidade ascendente em RALF sob diferentes TDH. As velocidades estudadas foram 1,24 e 1,88 cm.s⁻¹, enquanto os TDH aplicados foram de 8, 6, 4, 2 e 1 h. O substrato empregado foi glicose na concentração 5,0g.L⁻¹. O reator operado com velocidade ascendente 1,24 cm.s⁻¹ apresentou melhores resultados, sendo nesta velocidade alcançado a maior PVH, 2,21 L.h⁻¹L⁻¹ em TDH de 1 h, e rendimento máximo 2,55 mol H₂.mol⁻¹glicose em TDH de 2 h.

Barros et al. (2011) compararam a possibilidade de se utilizar dois diferentes materiais suporte em RALF. Os materiais foram pneu triturado e polietileno tereftalato (PET), como substrato foi empregado glicose (4,0 g.L⁻¹) e temperatura 30°C. O reator contendo pneu triturado como suporte para adesão da biomassa apresentou melhores resultados. Em TDH de duas h foram obtidos rendimento máximo de 2,15mol H₂.mol⁻¹ glicose e 1,3 mg de biomassa aderido em cada grama de pneu triturado. Utilizando PET como material suporte o maior rendimento observado foi 1,87mol H₂.mol⁻¹glicose e 0,8 mg de biomassa por grama de PET.

Shida et al. (2012) estudaram o efeito da TCO e a presença ou não de agente tamponante no meio fermentativo. Dois RALF foram testados em condições diferentes, um sem adição de bicarbonato de sódio NaHCO₃ (RALF 2) e outro com adição de NaHCO₃ (RALF 1). O reatores foram avaliados sob diferentes TCO, partindo de 19 até 140,6 kg_{DQO}.m⁻³.d⁻¹. O RALF 1 obteve rendimento máximo de 2,45 mol H₂.mol⁻¹glicose, enquanto o RALF 2 1,9 mol H₂.mol⁻¹glicose, sendo estes valores obtidos em TCO de 84,3 kg_{DQO}.m⁻³.d⁻¹.

Santos et al. (2014a) avaliaram a produção de hidrogênio utilizando como substrato a vinhaça da cana-de-açúcar em mistura com glicose pura. O TDH foi verificado de forma decrescente de 8 até 1 h. O máximo rendimento 5,73 mmol.g⁻¹

DQO_{aplicada} foi verificado em TDH de 4 h com TCO de 52,7 kg_{DQO}.m⁻³d⁻¹. A maior PVH obtida foi 0,78L H₂.h⁻¹L⁻¹, sendo este valor alcançado quando o reator foi alimentado somente com vinhaça da cana-de-açúcar em TDH de 1 h.

Santos et al. (2014b) verificaram a produção de hidrogênio em RALF, a partir da vinhaça da cana de açúcar. No trabalho foram operados dois RALF, um alimentado com vinhaça pura (30000 mg DQO.L⁻¹) e outro com vinhaça diluída (10000 mg DQO.L⁻¹). Os resultados obtidos no reator alimentado com vinhaça diluída foram superiores, apresentando rendimento de 2,86 mmol H₂.g⁻¹DQO_{aplicada}, já no reator alimentado com vinhaça pura o maior rendimento obtido foi de 0,79 mmol H₂.g⁻¹DQO_{aplicada}.

Rosa et al. (2014) avaliaram o efeito de diferentes inóculos na produção de hidrogênio em RALF operado sob TDH decrescente (10-2 h). Como substrato foi empregando mistura de glicose e manipueira. O reator inoculado com lodo proveniente de UASB para tratamento de efluente de abatedouro de aves teve maior rendimento de hidrogênio, alcançando 1,0mmol H₂.g⁻¹ DQO_{aplicada} em TDH de 10 h. O outro RALF inoculado com lodo oriundo de UASB aplicado no tratamento de efluente de suínos teve seu maior rendimento de hidrogênio obtido em TDH de 6 h, contabilizando 0,65mmolH₂.g⁻¹DQO_{aplicada}.

2.5.2 Reator granular de leito expandido

O reator granular de leito expandido que por muitos anos tem sido empregado no tratamento de efluente pode ser entendido como uma versão modificada do UASB (Liu et al., 2010). As modificações tiveram como foco promover melhorias na exposição da biomassa e reduzir o número de zonas mortas no interior do reator (Fang, Boe e Angelidaki, 2011).

Devido às adaptações no desenvolvimento do EGSB, foi possível se operar sob alta velocidade superficial, causada pela alta taxa de recirculação e elevada razão altura/diâmetro (Liu et al., 2010). Como resposta a estas modificações o EGSB opera sob melhor transferência de massa, implicando em maior contato entre a matéria orgânica e o lodo, o que a princípio, melhora aspectos como a remoção de DQO (Dinsdale, Hawkes e Hawkes, 2000). O modo operacional do EGSB previne o efeito “pistão” no interior do reator, fenômeno particularmente observado em sistemas com alta produção de biogás, como reator UASB em escala laboratorial (Dinsdale, Hawkes e Hawkes, 2000).

Embora o reator EGSB tenha sido aplicado visando tratamento de efluentes como água residuária contendo: fenol (Scully, Collins e O'Flaherty, 2006), ácidos orgânicos (Dinsdale, Hawkes e Hawkes, 2000), lixiviado de compostagem (Liu et al., 2011) e efluente de matadouro (Núñez e Martínez 1999), este reator vem sendo aplicado na produção de hidrogênio fermentativo. Esta possibilidade é real, pois como já foi apresentado, ele apresenta algumas características favoráveis na produção de biogás como boa área de exposição das células ao substrato, adequada transferência de massa e fácil desprendimento de gases. Além disso, é capaz também de se operar em baixos TDH com alta retenção celular.

Guo et al. (2008b) verificaram produção de hidrogênio a partir de água residual contendo amido. Concomitante a produção de biogás também foi verificada a remoção de DQO no efluente. O reator foi operado com temperatura fixa em 30°C e TDH variando de 24 até 4 h. O maior rendimento atingido foi $0,11 \text{LH}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{DQO}_{\text{aplicada}}$, este valor foi obtido em TCO de $1 \text{g amido} \cdot \text{L}^{-3} \text{d}^{-1}$ e TDH de 4 h. Em TDH de 8 h foi alcançada maior produtividade, $0,68 \text{L} \cdot \text{h}^{-1} \text{L}^{-1}$. Em relação à remoção de DQO o máximo valor verificado foi 31,1%, alcançado em TDH de 24 h e TCO de $0,125 \text{g amido} \cdot \text{L}^{-3} \text{d}^{-1}$.

Guo et al. (2009a) avaliaram a produção de hidrogênio em EGSB alimentado com melão. O reator foi operado em diferentes TDH, de 6 até 1 h e temperatura fixada em 35°C. Em TDH de duas h e TCO de $120 \text{kg}_{\text{DQO}} \cdot \text{m}^{-3} \text{d}^{-1}$ foi verificada a maior produtividade de hidrogênio, $0,71 \text{L} \cdot \text{h}^{-1} \text{L}^{-1}$, nesse mesmo TDH também foi verificado o maior rendimento e produção específica de hidrogênio $3,47 \text{mol} \cdot \text{mol}^{-1} \text{sacarose}$ e $3,16 \text{mmolH}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{SSV} \cdot \text{h}^{-1}$ respectivamente. O biogás gerado durante a operação do reator foi constituído de 30 a 53% de hidrogênio. Em fase líquida os principais metabólitos detectados foram acetato e etanol.

Fang, Boe e Angelidaki (2011) verificaram a possibilidade de produção de metano utilizando água de lavagem do processamento de batata como fonte de carbono. No estudo foi avaliada a produção em batelada, reator UASB e em EGSB. O UASB foi operado com TDH decrescente de 10 até 4 dias enquanto o EGSB operou com TDH de 10, 8 e 6 dias. Ao fim da operação dos reatores foi verificada maior produção de metano na fermentação em batelada, $470 \text{mLCH}_4 \cdot \text{gSV}^{-1} \text{aderidos}$. Em relação aos reatores contínuos, a maior produção de metano foi obtida no EGSB, $380 \text{mLCH}_4 \cdot \text{gSV}^{-1} \text{aderidos}$, obtido em TDH de 10 dias. O UASB pode operar com maior TCO aplicada, porém a produção do biogás foi inferior às observadas nos outros reatores. Sob TCO de $5,1 \text{gDQO} \cdot \text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$ a maior produção de metano foi $240 \text{mLCH}_4 \cdot \text{gSV}^{-1} \text{aderidos}$.

Guo et al. (2013) estudaram o efeito da adição de L-cisteína na produção de hidrogênio em EGSB. Os autores verificaram que a suplementação do reator com o aminoácido acelerou a produção de hidrogênio. Ao todo foram operados três EGSB, um suplementado com $0,5\text{g.L}^{-1}$ de L-Cis, outro com 1g.L^{-1} e o terceiro sem adição do aminoácido (controle). Foi verificada a produção em diferentes TDH de 6 até 2 h. A suplementação estimulou a produção de hidrogênio em menor tempo quando comparado com o controle em 23% no reator suplementado com $0,5\text{g.L}^{-1}$ de L-Cis. Neste mesmo EGSB foi verificado o maior rendimento de hidrogênio, $1,93\text{mol.mol}^{-1}$ glicose, 20,6% maior que o obtido no reator controle. Além da menor fase lag e maior rendimento, também foi verificado maior consumo de substrato no EGSB suplementado com $0,5\text{g L-Cis.L}^{-1}$. Os três reatores avaliados apresentaram etanol e acetato como metabólitos principais em fase líquida.

Gallardo et al. (2014) avaliaram a produção de 1,3-propanodiol em EGSB utilizando glicerol como substrato e aplicando diferentes TDH (24 até 3 h). O trabalho foi executado com a operação de três reatores em paralelo, sendo o R1 composto por grânulos sem tratamento, R2 contendo os grânulos submetidos ao tratamento térmico e o R3 contendo os grânulos fragmentados. O rendimento máximo de 1,3-propanodiol bem como a maior produtividade foram alcançadas no R1 sob os TDH de 12 e 3 h respectivamente. Em análise do biogás produzido foi detectado hidrogênio somente no R1 (13%) e R2 (39%), ambos em TDH de 24 h.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo estão apresentados todos os instrumentos e metodologias utilizadas durante o desenvolvimento do trabalho. A abordagem vai desde a etapa de confecção dos reatores, procedimento analítico, estratégia operacional, obtenção dos substratos até o preparo do afluente. São apresentadas também as etapas iniciais de operação dos reatores e variáveis analisadas em cada fase de operação.

Para realização do trabalho foi feito uso de duas configurações de reator: RALF e EGSB. O motivo de se trabalhar com reatores distintos é justificado por trabalhos já realizados no grupo de pesquisa (LCA-II, UFSCar). A escolha do RALF foi embasada em trabalhos como de Amorim et al. (2009) e Shida et al. (2012). Enquanto que a escolha do EGSB para operar em co-fermentação de soro de queijo e glicerol é

justificada pelo desempenho obtido por esta configuração de reator no trabalho feito por Bósio (2014). Neste trabalho o autor também utilizou como substrato o glicerol bruto durante a produção de hidrogênio.

Para melhor entendimento e praticidade ao longo da apresentação dos materiais e discussão dos resultados, os reatores foram identificados por siglas. Segue abaixo a identificação utilizada para de cada um dos reatores:

R1- RALF termofílico alimentado com hidrolisado celulósico.

R2- RALF termofílico alimentado com glicose e xilose.

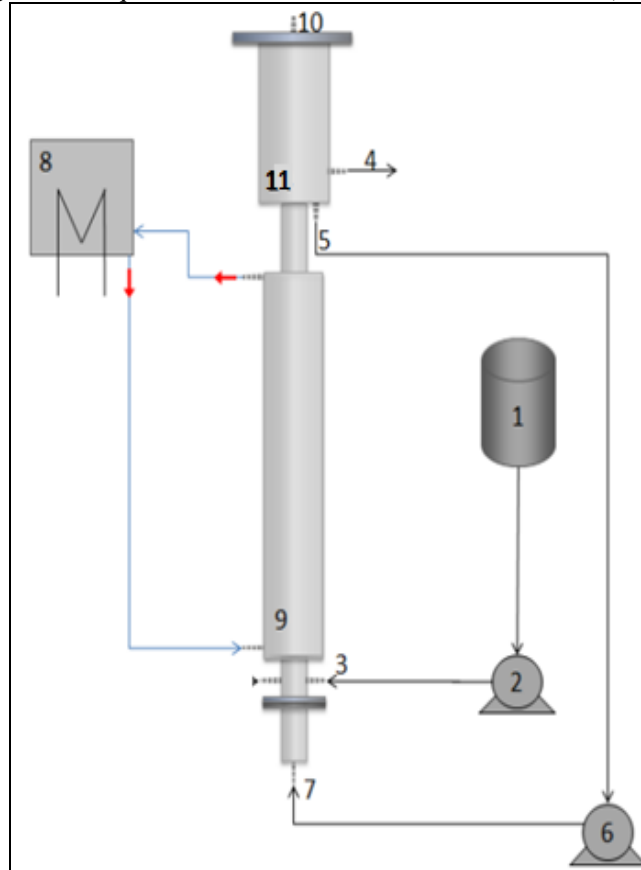
R3- Reator EGSB mesofílico alimentado com soro de queijo e glicerol.

3.1 Reator anaeróbio de leito fluidizado

Os RALF foram confeccionados em aço inox 304, possuíam 3,7cm de diâmetro interno e volume total de 1520 mL. Os reatores dispunham de camisa externa e serpentina interna por onde circulava água para controle de temperatura. Na alimentação do reator foi utilizada bomba dosadora com vazão máxima de $3,0 \text{ L.h}^{-1}$, enquanto que para recirculação fez-se uso de bomba diafragma, com vazão fixada em 1,3 vez velocidade mínima de fluidização (V_{mf}) do material suporte.

Para melhor entendimento, a Figura 3.1, apresenta a composição do sistema fermentativo: (1) tanque de alimentação (afluente), (2) bomba de alimentação, (3) entrada do afluente, (4) efluente, (5) saída do reciclo, (6) bomba de recirculação, (7) entrada do reciclo, (8) banho termostático, (9) camisa para controle de temperatura, (10) saída para análise de gases, (11) compartimento de separação gás-líquido. A Figura 3.2 apresenta o RALF em operação.

Figura 3.1: Esquema do reator anaeróbio de leito fluidizado (RALF)



Fonte: Autor.

Figura 3.2: RALF termofílico em operação contínua.



Fonte: Autor.

3.1.1 Material suporte

Como material suporte para os RALF utilizou-se cinasita (argila expandida) com diâmetro médio de 3,0 mm, selecionados com o auxílio de peneiras vibratórias, para tal, peneirou-se os grânulos de variados diâmetros para seleção. Na Tabela 3.1 encontram-se as características físicas da cinasita utilizada nos reatores.

Tabela 3.1: Propriedades da cinasita

Dimensão (mm)	Densidade (g.cm⁻³)	Porosidade*	V_{mf} (cm/s)
2,8-3,35	1,50	23%	1,24

*Amorim et al. (2009).

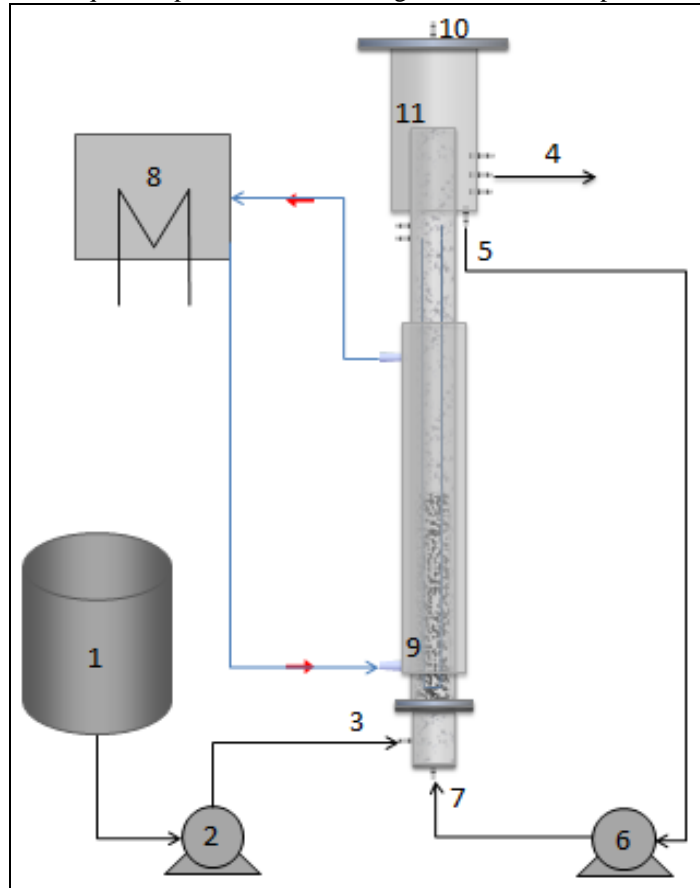
3.2 Reator granular de leito expandido

O reator EGSB foi construído em acrílico, possuía diâmetro interno e volume total de 4,3 cm e 2177 mL respectivamente. Assim como os RALF, este reator possuía camisa externa e serpentina para controle de temperatura.

Na alimentação do reator foi utilizada bomba dosadora e para promover a recirculação do fluido contido no interior do reator foi empregada bomba diafragma. Para controle da temperatura em 35°C fez-se uso de banho termostático. Diferente dos RALF, este reator não possuiu manta de lã de vidro para auxiliar na manutenção da temperatura, já que a mesma era bem próxima da temperatura ambiente.

O arranjo do reator EGSB é análogo ao dos RALF, pela Figura 3.3 tem-se em (1) tanque de alimentação (afluente), (2) bomba de alimentação, (3) entrada do afluente, (4) efluente, (5) saída do reciclo, (6) bomba de recirculação, (7) entrada do reciclo, (8) banho termostático, (9) camisa para controle de temperatura, (10) saída para análise de gases, (11) compartimento de separação gás-líquido. A Figura 3.4 mostra o EGSB em operação durante a co-fermentação de soro de queijo e glicerol bruto.

Figura 3.3: Esquema operacional do reator granular de leito expandido (EGSB).



Fonte: Autor.

Figura 3.4: Reator EGSB em operação durante a co-fermentação de SQP e glicerol bruto.



Fonte: Autor.

3.2.1 Tratamento dos grânulos utilizados como material suporte

Como material suporte para o reator EGSB, utilizou-se lodo granular originado em reator UASB destinado para o tratamento de efluente gerado em abatedouro de aves da Avícola Dacar (Tietê-SP). Os grânulos foram submetidos ao tratamento térmico de acordo com Kim et al. (2006) com objetivo de eliminar as células metanogênicas e consumidoras de hidrogênio. Após este tratamento os grânulos foram inseridos no reator.

3.3 Substratos

Durante toda a operação dos reatores, além das respectivas fontes de carbono, todos os afluentes continham meio nutricional proposto por Del Nery (1987). A adição do meio nutricional tem por objetivo assegurar o bom desenvolvimento bacteriano e melhores condições para a atividade das hidrogenases. Os componentes do meio nutritivo estão listados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2: Meio proposto por Del Nery (1987)

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

3.3.1 Hidrolisado

O hidrolisado utilizado na alimentação do R1 foi obtido através da hidrólise ácida da celulose microcristalina pura (Avicel[®]). Esta metodologia foi baseada em Nissila et al. (2012) com modificações.

A primeira etapa da hidrólise consistiu no preparo de uma solução de celulose na concentração 10% (m/v), sendo a fase líquida composta por ácido sulfúrico 15%

(v/v). Preparada a solução, os frascos reacionais eram levados à autoclave por 30 minutos a 121°C. Devido o considerável teor de sulfato contido no hidrolisado, procedeu-se a remoção de parte desses íons com solução de CaO (100g.L⁻¹) sob agitação mecânica. O fluxograma das etapas de hidrólise e tratamento do hidrolisado estão apresentados no Anexo A.

Obtido o hidrolisado tratado, era feito a quantificação de açúcares pelo método proposto por Dubois et al. (1956). Após se obter a concentração de açúcares, diluiu-se o hidrolisado até alcançar 2000mg.L⁻¹. O pH afluente foi controlado, com auxílio de solução de HCl 25% (v/v), de forma que o pH efluente se mantivesse em torno de 4,5.

3.3.2 Glicose e xilose

O afluente do R2 foi composto por substratos sintéticos, ambos na concentração 2000 mg.L⁻¹. O pH do afluente foi ajustado de acordo com o pH efluente, os valores foram controlados para se obter pH de saída em torno de 4,0-4,5.

3.3.3 Soro de queijo e glicerol

O soro de queijo utilizado foi processado pela empresa Elegê[®], segundo a fabricante, o produto foi obtido através do soro de leite liberado na fabricação de queijo. De acordo com informações cedidas pela empresa, o soro de queijo *in natura* passa por processo de concentração em conjunto de evaporação e secagem por atomização, para então, originar o soro de queijo em pó. A Tabela 3.3 contém as informações nutricionais cedidas pela empresa.

Tabela 3.3: Composição do SQ de acordo com a Elegê[®]

Composição em porção de 26g	
Valor energético	112kcal
Carboidratos	24,6g
Proteínas	3,5g
Gorduras totais	0,6g
Gorduras saturadas	0,5g
Gordura trans	0
Fibra alimentar	0
Cálcio	140mg
Sódio	216mg

Fonte: Elegê

O glicerol bruto utilizado na alimentação do R3 foi gentilmente concedido pela Biocapital (Charqueada-SP). A indústria trabalha na produção de biodiesel a partir de fontes mistas, ou seja, tem como matéria prima óleo vegetal e sebo bovino.

No preparo do afluente para o R3 o SQ foi adicionado para se obter a concentração 5g lactose.L^{-1} , concentração esta fixa em toda a operação do reator. O glicerol foi adicionado de acordo com cada fase (Vide tópico 3.6.1) e quantificado em g glicerol. L^{-1} .

3.4 Inóculo

3.4.1 RALF

O inóculo, lodo fermentativo metanogênico, utilizado nos RALF foi proveniente de reator UASB instalado na usina sucroenergética São Martinho (Pradópolis-SP), o UASB em questão é empregado no tratamento da vinhaça gerada na planta industrial.

O lodo apresenta pH próximo de 7,0 e de acordo com Santos (2014), possui concentração de sólidos totais voláteis no valor de $43,1\text{g.L}^{-1}$. Como o lodo *in natura* é composto por bactérias produtoras e consumidoras de hidrogênio, o mesmo foi submetido ao tratamento térmico proposto por Kim et al. (2006). Através deste tratamento as bactérias metanogênicas e acidogênicas não formadoras de esporos foram eliminadas, garantindo assim, um inóculo propício para produção de hidrogênio.

3.4.2 EGSB

Outra porção dos grânulos formados no UASB da avícola Dakar foram batidos em liquidificador por 10 minutos até adquirir consistência fluida, após isto o lodo foi submetido ao tratamento térmico proposto por Kim et al. (2006) assim como foi aplicado ao inóculo dos RALF. Após o tratamento o fluido bacteriano foi adicionado ao reator para adesão aos grânulos previamente adicionados.

3.5 Procedimento de partida dos reatores

A partida de todos os reatores aconteceu de maneira similar. Os barriletes de partida de cada reator continham as específicas fontes de carbono nas concentrações

pré-estabelecidas, meio nutritivo proposto por Del Nery (1987) e inóculo na concentração de 10% (v/v).

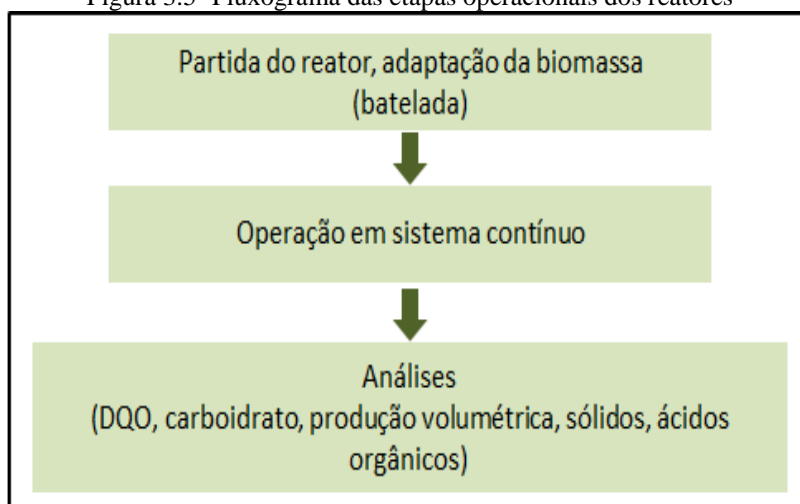
Após o preparo dos barriletes, procedeu-se o acerto do pH de todos em valores entre 5 e 5,5, para tal, fez-se uso de solução de HCl (30% v/v) até alcançar a concentração de 1mL HCl.L^{-1} , caso a concentração fosse atingida e o valor de pH desejado não fosse alcançado fazia-se uso de ácido acético puro para acerto do pH. A condição anaeróbia foi adquirida após borbulhar nitrogênio no barrilete de alimentação durante 15 minutos.

Os barriletes foram conectados aos respectivos reatores e com auxílio de bomba diafragma, os meios contendo substrato e inóculo passaram a ser circulado em sistema fechado. Este início sob recirculação foi necessário para garantir a adesão da biomassa ao suporte bem como adaptação do inóculo ao substrato empregado. Durante o período de recirculação o pH foi medido de maneira intermitente para assegurá-lo em faixa imprópria ao desenvolvimento das bactérias metanogênicas. As concentrações dos substratos foram determinadas diariamente para acompanhar a degradação das fontes de carbono pelos respectivos inóculos.

Para o R1 e o R2 o tempo de adaptação do inóculo foi 17 dias e para o R3 16, após este período de ambientação o sistema passou a operar em modo contínuo. Com o início de operação em modo contínuo o barrilete de alimentação foi renovado diariamente para todos os reatores.

Nos RALF a vazão de recirculação foi ajustada em $62,4\text{L.h}^{-1}$, já o EGSB teve sua vazão recirculação ajustada para proporcionar a expansão do leito em 30% em relação à altura do leito empacotado. A Figura 3.5 apresenta as etapas de operação dos reatores de forma resumida.

Figura 3.5- Fluxograma das etapas operacionais dos reatores



Fonte: Autor

3.6 Condições operacionais

Neste tópico serão apresentadas todas as variáveis verificadas nos reatores para alcançar os objetivos propostos. Cada reator consistiu em avaliar um aspecto operacional, seja ele o TDH ou concentração de substrato aplicado. A cada etapa em que o aspecto operacional era alterado, foi denominado como mudança de fase, ou seja, a fase nada mais é do que a avaliação de certo aspecto operacional durante um determinado intervalo de tempo. A mudança de uma fase para outra só era executada quando fosse percebida estabilidade nos parâmetros de produção de hidrogênio (composição, produção volumétrica) e consumo de substrato.

3.6.1 Reator alimentado com hidrolisado celulósico

O afluente do R1 teve concentração fixada em $2,0 \text{ g glicose.L}^{-1}$ e pH de entrada entre 4 e 4,5. Para controle da temperatura em 55°C foi utilizado banho termostático e manta de lã de vidro para isolamento térmico. No R1 foi avaliada a produção de hidrogênio em diferentes tempos de detenção hidráulica, os TDH foram reduzidos de 24, 20, 16, 12 e 8 h. A Tabela 3.4 apresenta de forma resumida os aspectos operacionais avaliados durante o trabalho.

Tabela 3.4: Condições operacionais do R1 alimentado com hidrolisado celulósico.

Fase	TDH(h)
1	24
2	20
3	16
4	12
5	8

3.6.2 Reator alimentado com glicose e xilose

O afluente do R2 foi composto por glicose (2 g.L^{-1}) e xilose (2g.L^{-1}). A temperatura foi fixada em 55°C com auxílio de banho termostático e manta de lã de vidro para isolamento térmico. Este reator teve a produção de hidrogênio e etanol verificadas em diferentes TDH, partindo de 16h e reduzido até 0,5 h. A Tabela 3.5 apresenta os aspectos operacionais avaliados neste reator.

Tabela 3.5: Condições operacionais do R2 alimentado com glicose e xilose.

Fase	TDH(h)
1	16
2	12
3	8
4	4
5	2
6	1
7	0,5

3.6.3 Reator alimentado com soro e glicerol

Para o R3 o aspecto analisado se difere dos RALF, neste reator foram avaliadas as produções de hidrogênio e ácido propiônico em diferentes relações soro de queijo/glicerol bruto (SQ:GB). Em todas as fases a concentração de SQ foi mantida em 5g lactose.L^{-1} . Na primeira etapa de operação o TDH foi fixo em 8 h e a cada fase a concentração de glicerol bruto no afluente aumentou do seguinte modo: 1, 2, 3, 4 e 5 g.L^{-1} . Na segunda etapa de operação foram mantidas as concentrações de SQ e glicerol bruto em 5 g.L^{-1} de cada substrato e reduziu o TDH de 8 até 0,5 h. A Tabela 3.6 apresenta como foram as diferentes fases de operação deste reator.

Tabela 3.6: Condições operacionais do R3 alimentado com SQ e glicerol bruto

Etapa	Fase	Concentração de	
		soro/glicerol (g.L ⁻¹)	TDH(h)
I	1	5/1	8
	2	5/2	8
	3	5/3	8
	4	5/4	8
	5	5/5	8
II	6	5/5	4
	7	5/5	2
	8	5/5	0,5

3.7 Análises Físico-químicas

As análises de demanda química de oxigênio (DQO), sólidos totais (ST), sólidos suspensos totais (SST), sólidos suspensos voláteis (SSV) e pH foram procedidas de acordo com Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (1998). A quantificação de açúcares totais, glicose e lactose foram feitas de acordo com o método colorimétrico proposto por Dubois et al. (1956). A concentração de glicerol foi determinada segundo o método colorimétrico proposto por Bondioli e Bella (2005).

A análise de composição do biogás produzido foi feita por cromatografia gasosa, para tal, utilizou-se seringa *gas tight* para retirar 1mL do biogás gerado. O gás coletado foi analisado em cromatógrafo marca Shimadzu modelo GC-2010 equipado com detector de condutividade térmica. A coluna empregada foi a Sigma-Aldrich modelo Carboxen® 1010 Plot e coluna de sílica fundida, a coluna possuía 30m de comprimento e diâmetro interno 0,53mm. O gás de arraste utilizado foi o Argônio sob fluxo de 21,9 cm².s⁻¹.

A identificação dos metabólitos solúveis produzidos no R1 e R2 e análise de furfural (F) e hidroximetil furfural (HMF) foram feitas segundo a metodologia proposta por Gouveia et al. (2009). Para identificação de F e HMF foi utilizado HPLC shimadzu equipado com controladora SCL 10 Avp, injetor automático SIL 10 AF, degaseificador de membrana DGU 20A5r, bomba semi-preparativa LC-6AD, forno CTO 10Avp e detector de ultra violeta (UV) SPD 10Avp. A coluna usada foi Sunfire C18 150 x 4,6 mm 5 um da marca Waters. A fase móvel foi composta por: água:ACN 8:1 com 1 % de ácido acético, vazão: 0,8 mL/min, comprimento de onda UV: 274 nm e temperatura de coluna 30°. Os ácidos orgânicos e álcoois produzidos foram quantificados por

cromatografia líquida utilizando dois cromatógrafos. Um HPLC Waters Alliance e2695 equipado com detector de índice de refração 2414 e detector de ultravioleta 2998. E outro cromatógrafo Shimadzu LC-10AD equipado com controladora SCL 10 Avp, injetor automático SIL 10 ADvp, degaseificador de membrana DGU 20A5r, bomba LC-10ADvp, forno CTO 20A, detector de ultra violeta SPD 10Avp e detector de índice de refração RID 10A. A coluna utilizada foi HPX 87 H 300 x 7,8 mm da marca Bio-Rad. A fase móvel foi constituída por: ácido sulfúrico 5 mM, vazão: 0,6 mL/min, temperatura do RID: 45°, comprimento de onda do UV: 210 nm, temperatura da coluna: 45°.

Para determinação dos ácidos orgânicos e álcoois presente nas amostras do R3 fez-se uso da técnica de cromatografia líquida utilizando HPLC Shimadzu. O aparelho foi equipado com forno de coluna (CTO-20^a) a 43°C, bomba (LC-10ADVP), autoamostrador (SIL-20A HT), detector de índice de refração (RID-10A) e coluna Aminex HPX-87H. A fase móvel foi composta por H₂SO₄ (0,01N) a 0,5ml.min⁻¹.

A vazão do efluente foi coletada durante todo o período em que o operador se encontrou em laboratório bem como em sua ausência. A produção volumétrica do biogás gerado foi realizada de acordo com Walker et al. (2009), em que a contabilização é de acordo com o deslocamento da coluna de líquido contendo solução salina acidificada.

3.8 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise de microscopia eletrônica teve como objetivo confirmar a presença e morfologia dos microrganismos aderidos aos respectivos suportes. Para a análise de MEV as amostras não poderiam estar congeladas, ou seja, a análise só poderia se empregada às amostras recentemente coletadas do reator. Após a coleta das amostras, as mesmas foram lavadas em solução de glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M e pH 7,3, os grânulos permaneceram nesta solução por 12 h em temperatura abaixo de 10°C. Após esta etapa as amostras foram lavadas três vezes (durante 10 minutos) em tampão fosfato 0,1M e pH 7,3. A desidratação das amostras foi feita utilizando solução de etanol em diferentes concentrações (50, 70, 80, 90 e 95% v/v) a lavagem foi feita por 10 minutos em cada solução. Na etapa final de desidratação lavaram-se as amostras por três vezes (durante 10 minutos cada) em solução etanol 100%.

Após o tratamento as amostras foram fixadas em fita autocolante, específica para MEV, e levadas à estufa 40°C por 2 h. Terminado a secagem as amostras foram submetidas à microscopia eletrônica de varredura, o microscópio utilizado foi o ZEISS Sigma VP instalado no Instituto de Física de São Carlos (IFSC) da Universidade de São Paulo.

3.9 Cálculo dos principais parâmetros

Abaixo estão representados os cálculos dos principais parâmetros:

- $HY = (\text{mol de H}_2 \text{ produzido/mol de carboidrato consumido}) (\text{mol.mol}^{-1})$ ou $(\text{mol de H}_2 \text{ produzido/g DQO aplicada}) (\text{mol.g}^{-1}\text{DQO})$
- $\text{EtOHY} = (\text{mol de EtOH produzido/mol de carboidrato consumido}) (\text{molEtOH.mol}^{-1})$
- $\text{PVH} = (\text{quantidade de biogás produzida} \times \% \text{H}_2) / (\text{tempo}) / (\text{volume do reator}) (\text{L.h.}^{-1} \cdot \text{L reator})$
- $\text{TCO}_{\text{real}} = (\text{DQO afluente} / \text{TDH}_{\text{real}}) (\text{kg de DQO.m}^{-3} \cdot \text{dia}^{-1})$
- $\text{PropY} = (\text{quantidade de ácido propiônico produzido/quantidade de carboidrato na alimentação}) (\text{g.g}^{-1})$

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 RALF alimentado com hidrolisado celulósico – R1

4.1.1 Conversão de carboidratos no R1

As conversões médias de cada fase operacional do R1 estão apresentadas na Figura 4.1 e Tabela 4.1. A concentração afluente de hidrolisado se manteve com valores entre 1746 e 1945 mg.L⁻¹, já em relação a concentração efluente foi observado valores entre 71 e 140 mg.L⁻¹. De acordo com os dados obtidos percebe-se que mesmo após a redução do TDH de 24 até 8 h e consequente aumento da carga orgânica aplicada (4,1-12,8Kg.m⁻³dia⁻¹), as conversões se mantiveram estáveis entre 92 e 96%.

Figura 4.1: Conversão de carboidratos no R1 alimentado com hidrolisado celulósico.

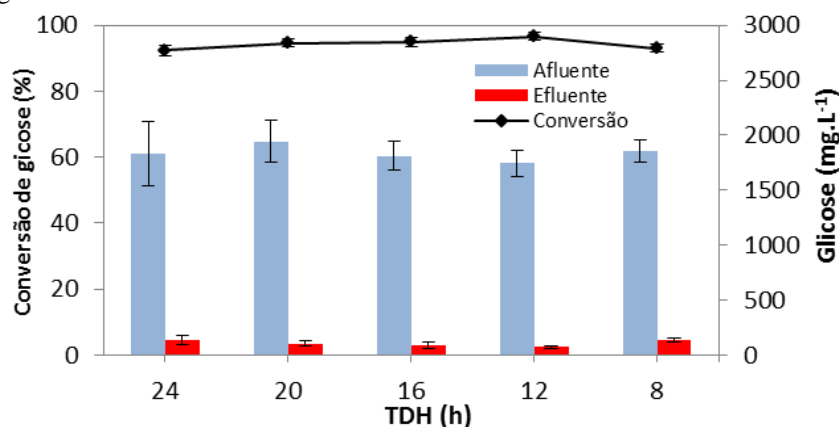


Tabela 4.1 - Conversão e concentração afluente e efluente de hidrolisado para o R1.

TDH (h)	24	20	16	12	8
Conversão (%)	92 ± 1	94 ± 1	94 ± 1	96 ± 1	93 ± 1
Afluente(mg.L⁻¹)	1833 ± 288	1945 ± 190	1812 ± 130	1746 ± 121	1855 ± 97
Efluente(mg.L⁻¹)	140 ± 40	105 ± 27	92 ± 28	71 ± 8	135 ± 16

Por meio do perfil de conversão pode-se afirmar que houve adaptação da biomassa ao hidrolisado celulósico e resistência microbiológica à concentração de sulfato (2000 mg.L⁻¹) presente no substrato obtido após a hidrólise. Mesmo com valores de conversão próximos do absoluto, máximo de 96%, não significa que o rendimento de hidrogênio será próximo ao teórico, uma vez que a fonte de carbono aplicada também tem papel efetivo na manutenção da biomassa presente no reator. Além disso, a ação de rotas mistas também contribui para que o rendimento de hidrogênio não seja o teórico.

Os valores de conversão encontrados em trabalhos destinados a produção de hidrogênio a partir de material celulósico são análogos aos obtidos no R1. Lo et al. (2009) também alcançaram conversões próximas as do presente trabalho, os autores verificaram a produção de hidrogênio a partir de celulose comercial e biomassa lignocelulósica hidrolisada. As concentrações de trabalho variaram de 0,74 até 4,5 g hidrolisado.L⁻¹ e trabalharam inclusive na concentração 2,0 g.L⁻¹, mesma concentração adotada no R1. Segundo os autores, em todas as faixas de concentração o consumo esteve próximo de 100%, porém Lo et al. (2009) trabalharam em batelada.

Kongjan e Angelidaki (2010) também observaram conversão semelhante as do R1. Os autores trabalharam com palha de aveia hidrolisada na concentração 3,9 g açúcar.L⁻¹ na alimentação de UASB mantido sob temperatura de 70°. Neste trabalho foi verificada a produção de hidrogênio em TDH de 24 e 12 h, porém em TDH de 12 h o

reator apresentou instabilidade operacional o que levou os autores a operarem novamente em TDH de 24 h e neste TDH foi verificada conversão de 98%. A conversão obtida pelos autores é ligeiramente maior que as observadas no presente trabalho, porém o R1 apresentou maior estabilidade, uma vez que manteve altas concentrações até o TDH de 8 h.

Zhao et al. (2013) utilizaram talo de milho hidrolisado como substrato em reator CSTR sob taxa de diluição de $0,016 \text{ h}^{-1}$ (equivalente a TDH de 62 h). Os autores verificaram conversão máxima de 86%, inferior às conversões observadas no R1 durante toda operação. Liu et al. (2013) estudaram a produção contínua de hidrogênio a partir da casca de arroz hidrolisada e resíduo alimentar na razão 1:1. Nestas condições os autores detectaram conversão de 90% dos substratos. Tais valores foram verificados em CSTR operado a 37°C e TDH fixo em 4 h.

4.1.2 Demanda química de oxigênio

As reduções médias de DQO verificadas na operação do R1 são apresentadas pela Figura 4.2 e Tabela 4.2. A remoção de carga orgânica em TDH de 24 h foi de 30%, o que se manteve sem grande variação nos próximos TDH de 20 e 16 h, contabilizando redução de 28 e 26% respectivamente. Nos dois últimos TDH, 12 e 8 h, foi observado aumento considerável na redução média de DQO, alcançando 41 e 44% respectivamente.

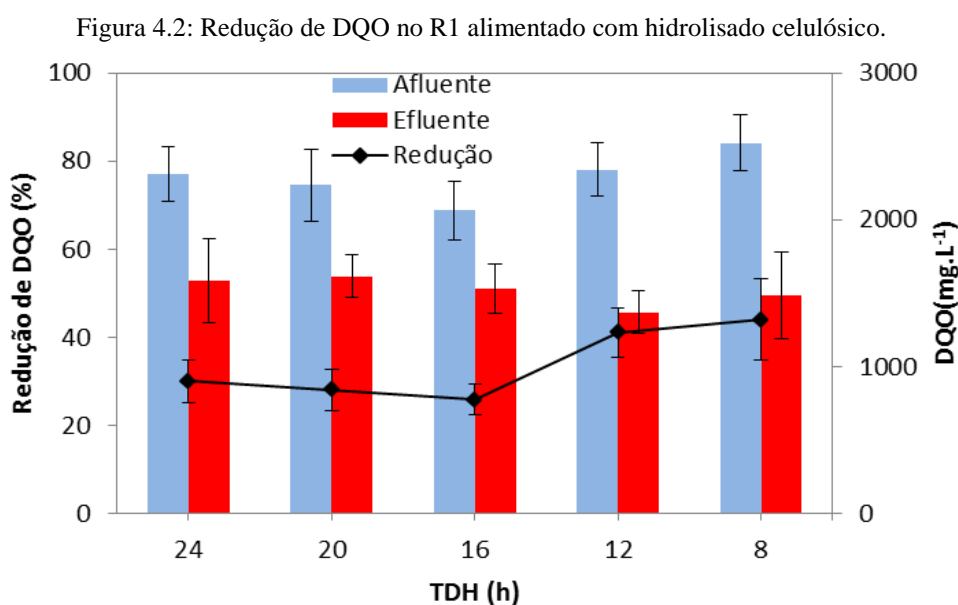


Tabela 4.2: Redução e concentração afluente e efluente de DQO para o R1.

TDH (h)	24	20	16	12	8
Redução (%)	30 ± 4	28 ± 4	25 ± 3	41 ± 5	44 ± 9
Afluente(mg.L⁻¹)	2311 ± 186	2235 ± 242	2065 ± 199	2342 ± 177	2521 ± 190
Efluente(mg.L⁻¹)	1584 ± 283	1616 ± 143	1530 ± 167	1370 ± 146	1485 ± 194

De acordo com Antonopoulou et al. (2008) a redução de DQO em reatores acidogênicos normalmente apresentam valores em torno de 20%, o que coloca os valores obtidos nas três primeiras fases de operação do R1 próximos ao considerado comum para processos acidogênicos. As remoções de 41 e 44% podem ter ocorrido devido a alterações hidrodinâmicas como expansão do leito em virtude da maior vazão de alimentação, proporcionando maior contato entre o substrato e a biomassa, bem como alterações biológicas como seleção de células com maior eficiência de remoção de matéria orgânica.

Apesar de elevados, os valores das duas últimas fases estão próximos dos obtidos por Arriaga et al. (2011) ao utilizarem cultura mista mesofílica (30°C) como inóculo. Os autores empregaram palha de aveia hidrolisada como substrato em filtro biológico e observaram redução de DQO constante em 41% para os TDH 12 e 6 h.

4.1.3 Relação DQO/sulfato

O hidrolisado utilizado na alimentação do R1 foi submetido ao processo de supercalagem para remoção de compostos tóxicos como furfural, hidroximetil furfural (Matinez et al., 2000; Mohagheghi, Ruth e Schell, 2006) e sulfato (Nissila et al., 2012). As concentrações médias de furfural e 5-hidroximetilfurfural no afluente foram em média 0,001mg.L⁻¹ e 0,0075mg.L respectivamente. Em relação ao sulfato, sua concentração no afluente se manteve em torno de 2000mg.L⁻¹.

A Figura 4.3 e Tabela 4.3 apresentam os valores médios de sulfato no afluente e efluente ao longo das fases. As concentrações afluente foram verificadas com valores entre 1100 e 3100 mg.L⁻¹, já para o efluente foram observadas concentrações ligeiramente menores, ficando entre 900 a 2800mg.L⁻¹.

Figura 4.3: Concentração afluente e efluente de sulfato.

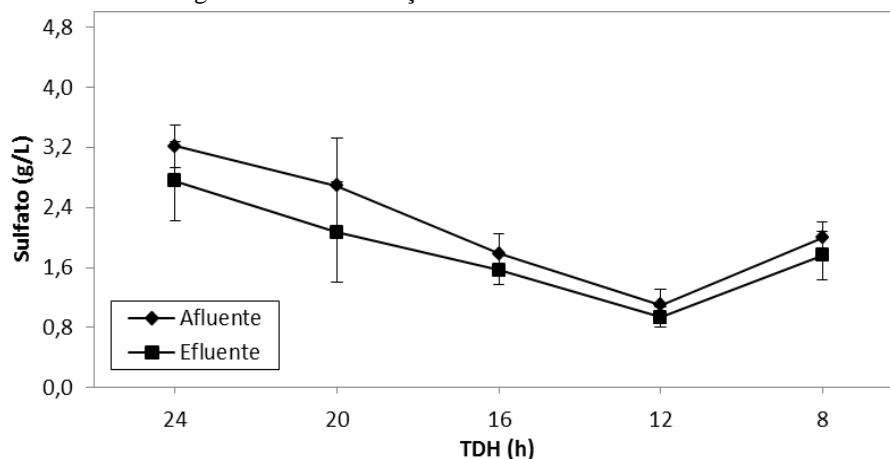


Tabela 4.3: Concentração afluente efluente de sulfato

TDH (h)	24	20	16	12	8
Sulfato Afl. (g.L⁻¹)	3,2±0,28	2,7±0,64	1,8±0,26	1,1±0,21	2,0±0,21
Sulfato Efl. (g.L⁻¹)	2,8±0,52	2,1±0,66	1,6±0,20	0,9±0,13	1,8±0,32

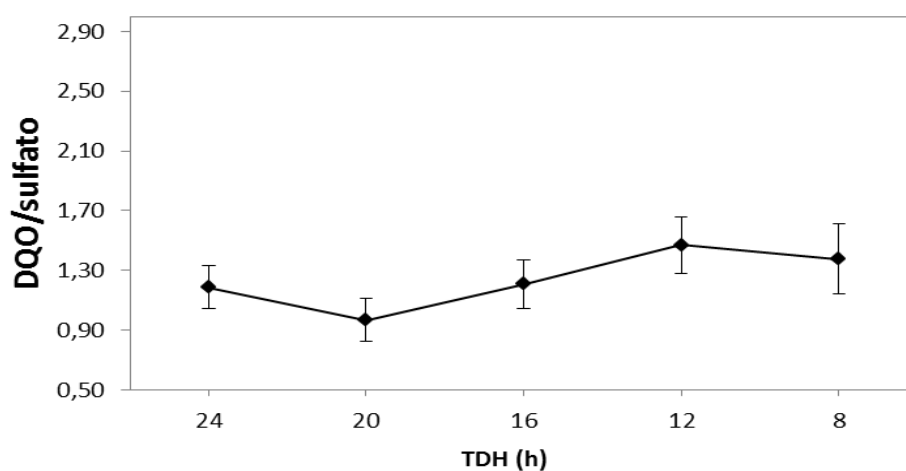
Ao longo da operação do R1, foram quantificadas as concentrações de sulfato afluente e efluente com o intuito de acompanhar o possível desenvolvimento de bactérias consumidoras de hidrogênio para redução de sulfato a sulfeto. Um método para reduzir a possível ação das bactérias redutoras de sulfato durante a produção de hidrogênio é trabalhar em faixas de pH próximas a 5,0 (Lin e Chen 2006; Hwang et al. 2009a). Esta estratégia foi adotada no R1 e de acordo com os valores obtidos a recuperação de sulfato foi 85%, o que representa baixa ou nenhuma atividade de bactérias redutoras de sulfato.

Lin e Chen (2006) utilizaram CSTR operado sob TDH de 12 h e verificaram que o aumento da concentração de sulfato afetou a produção de etanol durante a obtenção do hidrogênio fermentativo, todavia, isto foi observado apenas quando os valores de pH foram superiores a 6,0. Com a redução do pH para valores próximos de 5,0, foi detectado a maior produção de hidrogênio e redução na produção de etanol de 49% para 3,6%. Nesta última situação a recuperação do sulfato foi em torno de 98,6%.

Na Figura 4.4 estão apresentadas as relações DQO/sulfato para as 5 fases avaliadas no R1. Durante toda operação do reator os valores da relação DQO/sulfato sofreram leves alterações, em geral eles se mantiveram entre 0,97 e 1,47. Estas pequenas alterações são explicadas pelo fato da concentração de hidrolisado ter sido mantida em valores próximos a 2000 mg.L⁻¹ assim como a concentração de sulfato no hidrolisado após o tratamento.

Hwang et al. (2009b) avaliaram diferentes TDH e relações DQO/sulfato durante a produção de hidrogênio fermentativo. As relações DQO/sulfato partiram de 150 até 0,75, enquanto os TDH testados foram 24, 12 e 6 h. A maior produção de hidrogênio ocorreu em TDH de 6 h, segundo os autores devido a maior taxa de carregamento orgânico aplicada. Os autores observaram que mesmo em baixas relações DQO/sulfato, 0,75 e 1,5, análogas às observadas no R1, a produção de hidrogênio não foi afetada em nenhum momento. Tal fato pode ser justificado por trabalharem em pH próximo de 5,0. O que pode ser confirmado pela recuperação de sulfato no efluente, superior a 93%.

Figura 4.4- Relação DQO/sulfato para o R1 alimentado com hidrolisado celulósico



4.1.4 Composição do biogás produzido no R1

A Figura 4.5 e Tabela 4.4 apresentam os valores de composição do biogás gerado durante a operação do R1. Ao longo da operação do reator não foi detectado metano, o que valida a eficiência do tratamento térmico aplicado ao lodo. A composição de hidrogênio no biogás se manteve estável entre 57 e 58,8% nos três primeiros TDH aplicados. Após a reduzir o TDH para 12 h houve inversão nas frações de hidrogênio (41,6%) e dióxido de carbono (58,4%). Devido à inversão observada nos valores de H_2 e CO_2 e a alta concentração de ácido acético verificada nesta fase (tópico 4.1.5) é possível que tenha ocorrido homoacetogênese em TDH de 12 h. Após a redução do TDH para 8 h, possivelmente houve nova mudança de rota metabólica predominante, pois o biogás voltou a ser composto por maioria de hidrogênio (54,5%) e minoria de CO_2 (45,5%).

Figura 4.5: Composição do biogás no R1 alimentado com hidrolisado celulósico.

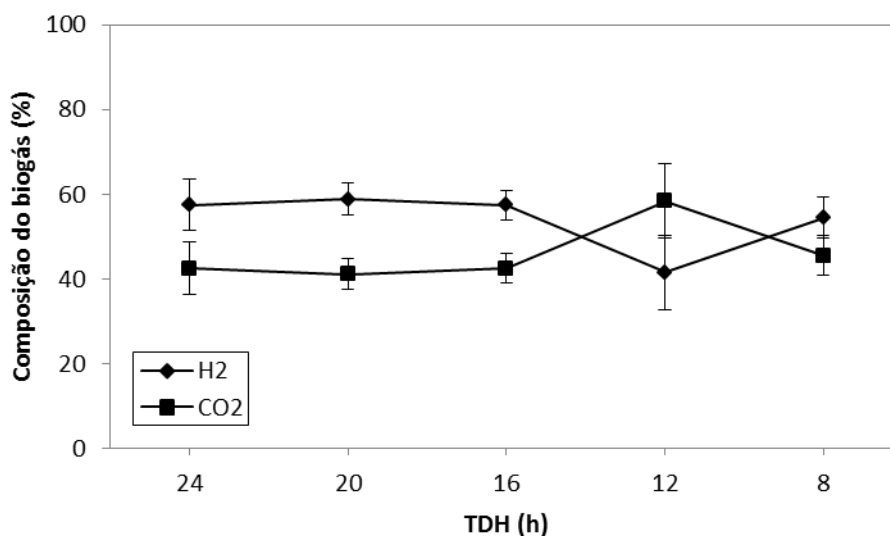


Tabela 4.4- Composição do biogás ao longo da operação do R1.

TDH (h)	24	20	16	12	8
H2 (%)	57,5±6,1	58,8±3,8	57,5±3,5	41,6±8,8	54,5±4,7
CO2 (%)	42,5±6,1	41,2±3,8	42,5±3,5	58,4±8,8	45,5±4,7

Kongjan e Angelidaki (2010) obtiveram biogás com concentração de hidrogênio inferior aos obtidos no R1, o conteúdo médio de hidrogênio observado pelos autores em CSTR sob TDH de 3 dias foi 41,5%. Utilizando UASB mantido a 70°C e operado em TDH de 24 e concentração afluente de hidrolisado fixa em 3,9g açúcar.L⁻¹, os mesmos autores verificaram biogás composto por 43,2% de H₂.

Zhao et al. (2013) operaram CSTR com TDH fixo em 50 h, alimentado com 9,9 g hidrolisado. L⁻¹ e mantido em temperatura de 60°C. Nestas condições os autores verificaram que o biogás teve conteúdo médio de hidrogênio no valor de 60,6% o que é ligeiramente superior aos obtidos no presente trabalho, porém os autores alcançaram esta composição em TDH elevado quando comparado com os aplicados no R1.

Chen et al. (2008) observaram conteúdo de hidrogênio entre 50 e 60% em todos os TDH verificados (12 até 2 h), porém neste trabalho os autores alimentaram o CSTR com amido hidrolisado na concentração de 26 g.L⁻¹, o que é bem superior à concentração de açúcar afluente aplicada no R1.

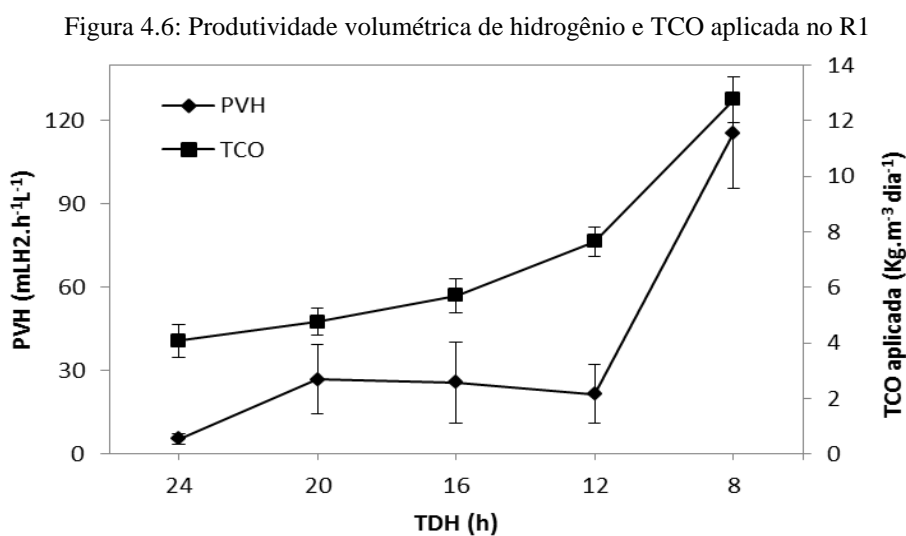
Gadow, Li e Liu (2012) avaliaram a influência da temperatura na produção de hidrogênio a partir da celulose (5g.L⁻¹) em dois CSTR operados com TDH de 10 dias e diferentes temperaturas, um a 55°C e outro a 80°C. O reator mantido em condições

termofílicas apresentou biogás composto por 51% de hidrogênio, já o reator operando a 80°C apresentou 55% de hidrogênio no biogás.

Arriaga et al. (2011) observaram conteúdo de biogás inferior aos verificados no R1 durante a produção de hidrogênio a partir de palha de aveia hidrolisada. Em filtro biológico mantido sob TDH de 24 h e concentração afluente variando de 1,2 até 35 gDQO.L⁻¹ foi observado biogás composto por 43%.

4.1.5 Produção volumétrica de hidrogênio

Os valores médios de produção volumétrica de hidrogênio (PVH) de cada fase operacional estão apresentados na Figura 4.6. De acordo com os dados obtidos em TDH de 24 h a produção volumétrica foi 5,5 mL.h⁻¹.L⁻¹, com a redução do TDH para 20 h foi observado aumento na PVH, contabilizando 26,9 mL.h⁻¹.L⁻¹, a PVH pouco se alterou após aplicar TDH de 16 h, nesta condição foi obtido 25,8 mL H₂.h⁻¹.L⁻¹. Em TDH de 12 h foi observado queda no valor médio de PVH, passando para 21,7 mL.h⁻¹.L⁻¹, porém com a redução do TDH para 8 h a produtividade alcançou seu valor máximo, 115 mLH₂.h⁻¹.L⁻¹.



A redução do TDH e consequente aumento da carga orgânica aplicada normalmente provoca aumento na produção volumétrica de hidrogênio, fato este observado por Amorim et al. (2009), Shida et al. (2012) e Barros e Silva (2012). Porém a produtividade ótima pode ser em função de uma TCO ótima, como observada por Júnior et al. (2014). Os autores verificaram que a produtividade e rendimento de

hidrogênio aumentaram com o aumento da TCO de $36,2 \text{ kg}_{\text{DQO}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ para $72,4 \text{ kg}_{\text{DQO}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$, porém os valores de produtividade e rendimento caíram para TCO de $108,6 \text{ kg}_{\text{DQO}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$. O R1 apresentou aumento de PVH da fase 1 para 2 e se manteve estável até a fase 4, somente na fase 5 foi observado novo aumento na PVH. A pouca variação observada na PVH durante as fases 2,3 e 4 pode ter ocorrido em função da menor alteração da TCO aplicada (4,8, 5,7 a 7,6 respectivamente), sendo que o aumento expressivo de produtividade foi observado somente quando a TCO teve maior salto em seu valor, passando de 7,66 para $12,75 \text{ kg}_{\text{DQO}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$.

Chen et al. (2008) verificaram aumento da PVH de 0,5 para $1,5 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ com a redução do TDH de 12 para 2 h. Neste trabalho foi empregado biorreator inoculado com a espécie *C. butyricum* CGS2 mantida a 55°C . Kongjan e Angelidaki (2010) utilizaram reator UASB alimentado com palha de aveia hidrolisada e alcançaram valores próximos aos obtidos no R1 durante as fases 2 e 3. Em TDH de 24 h o reator UASB apresentou PVH de $34 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$, após redução do TDH para 12 h a PVH também reduziu, passando para $32 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$. Segundo os autores este comportamento inverso ao que se é encontrado na literatura ocorreu devido o aumento na produção de lactato em TDH de 12 h.

Arriaga et al. (2011) utilizaram filtro biológico em condições mesofílicas alimentado com palha de aveia hidrolisada. Entre outros parâmetros avaliados, os autores verificaram o efeito do TDH na produção de hidrogênio. Foi detectado aumento contínuo na PVH em virtude da redução do TDH de 24 para 12 e 6 h. A máxima PVH detectada foi $81,4 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$, obtida com concentração de hidrolisado mantida em $35 \text{ g}_{\text{DQO}} \cdot \text{L}^{-1}$ e TDH de 12 h.

4.1.6 Metabólitos solúveis produzidos

Estão apresentados na Figura 4.7 e Tabela 4.5 os principais metabólitos produzidos em fase líquida durante a operação do RALF alimentado com hidrolisado celulósico ($2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$). De acordo com os dados compilados foram detectados etanol, xilitol, glicerol e os ácidos: acético, butírico, láctico, propiônico, fórmico e maleico. Durante a operação os compostos identificados em maiores concentrações foram ácido acético (máx. 84,2%), ácido butírico (máx. 41%) e etanol (máx. 59%).

Nos TDH de 24 e 20 h houve predominância de ácido acético, contabilizando 69-73% dos metabólitos produzidos em fase líquida. Após a redução do TDH para 16 h

os ácidos butírico (41%) e acético (50%) foram observados em maior concentração. Em TDH de 12 h houve redução na concentração de butirato e o acetato voltou a ser predominante, contabilizando 84% dos metabólitos solúveis produzidos. Durante a quinta fase de operação, TDH de 8 h, foi observada mudança na distribuição dos ácidos e álcoois produzidos. Nesta fase foi observado aumento na concentração de etanol, contabilizando 59% dos metabólitos produzidos.

Durante os TDH de 24, 20, 26 e 12 h foram verificadas altas concentrações de ácido acético, porém acompanhadas de baixa produção de hidrogênio. Estas observações podem ser justificadas pelo maior tempo de exposição da biomassa a salinidade em TDH mais elevados. Reilly, Dinsdale e Guwy (2014) verificaram a produção de hidrogênio a partir da palha de milho pré-tratada com $\text{Ca}(\text{OH})_2$, para tal foi utilizado reator batelada e cultura mista. Os autores verificaram que durante o ajuste de pH com CO_2 houve a formação de CaCO_3 e este sal teve efeito altamente inibitório para produção de hidrogênio. Os autores também observaram que o aumento da concentração do sal favoreceu maiores concentrações de acetato, segundo eles pela homoacetogênese. O efeito inibitório da salinidade durante a produção de hidrogênio também foi verificado por Guo et al. (2014). Os autores utilizaram cultura mista como inóculo para cultivo em batelada alimentada com resíduos de maricultura. Neste trabalho foi percebido que ao aumentar os níveis de salinidade de 1,5 até 3,5% houve queda nos rendimentos de hidrogênio de 21,9 $\text{mLH}_2\cdot\text{gSSV}$ para valores próximos a 14 $\text{mLH}_2\cdot\text{gSSV}$.

Os maiores tempos de detenção hidráulica podem ter contribuído para o efeito prejudicial da salinidade durante a produção de hidrogênio. A maior exposição da biomassa aos efeitos da salinidade pode ter causado inibição na produção de hidrogênio assim como observado nos trabalhos supracitados. Há a possibilidade também de que a maior exposição da biomassa aos sais formados durante o tratamento do hidrolisado (ex: sulfato de cálcio) tenha contribuído para indução da produção de acetato pela homoacetogênese, assim como observado por Reilly, Dinsdale e Guwy (2014).

Durante a fase 5 foi observada maior produção de etanol ($0,957 \text{ molEtOH}\cdot\text{mol}^{-1}$ glicose) e possivelmente a redução do TDH de 8 h acarretou na mudança do fluxo metabólico. O piruvato, produto da oxidação da glicose, poderia ser utilizado para produção de ácidos e hidrogênio, porém com a eventual mudança de rota metabólica passa a ser direcionado à formação de etanol. De acordo com a Equação 8 cada mol de glicose pode gerar até 2 mols de etanol teoricamente. Porém, em TDH de 8 h também

foi percebida melhor produção de hidrogênio ($115 \text{ mLH}_2\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$), assim a rota de produção concomitante de hidrogênio e etanol segundo Hwang et al. (2004) (Equação 5), também deve ser considerada. Ao longo da operação do R1 também foram identificados xilitol, glicerol e os ácidos: maleico, fórmico, propiônico e lático, porém em frações menores.



Figura 4.7: Metabólitos solúveis produzidos em cada fase de operação do R1

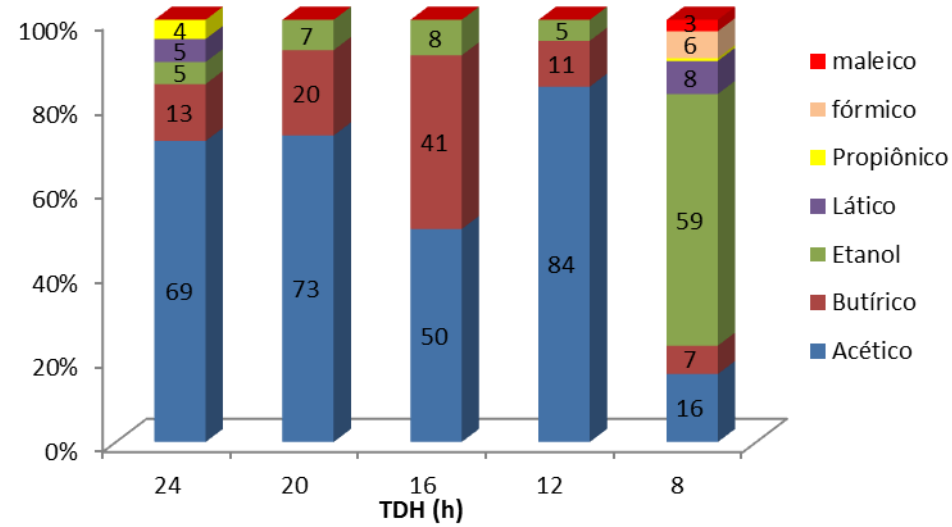
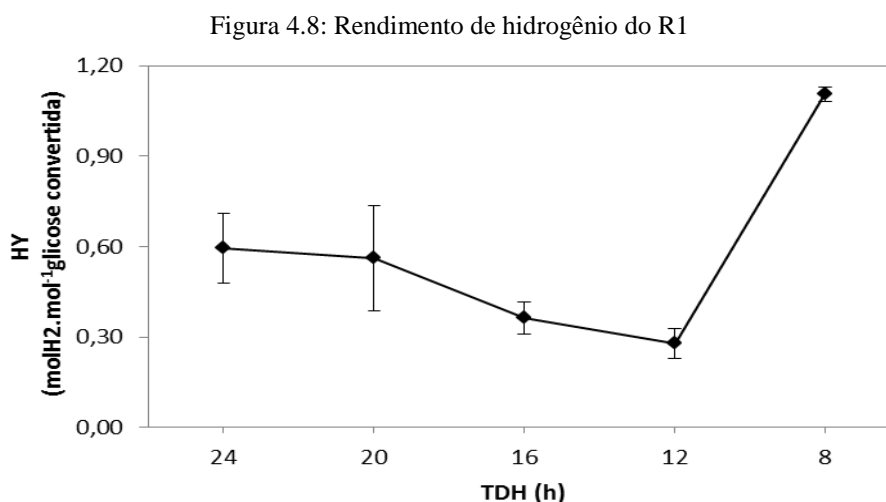


Tabela 4.5- Ácidos orgânicos e álcoois verificados no RALF alimentado com hidrolisado celulósico.

Ácidos orgânicos e álcoois detectados (mg.L ⁻¹ e %)																			
Fase	TDH	Acético	%	Butírico	%	Etanol	%	Lático	%	Propiônico	%	Xilitol	%	Fórmico	%	Glicerol	%	Maleico	%
1	24	579±15,7	69,1	160,8±24	13,1	32,5±7,5	5,0	66,3±9,1	5,3	45,5±8,9	4,4	62,8±16,5	2,9	0	0	0	0	0	0
2	20	311±154	72,6	127±30	20,2	23,6±1,6	7,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	16	158,9±12	50,4	190,1±24	41,2	20,3±2,5	8,4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	12	426,5±64	84,2	80,8±6,8	10,9	19,3±3,5	4,9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	8	168,4±36,5	15,9	103±7,7	6,6	478,5±37,4	59	122±12	7,7	8,7±3,5	0,7	0	0	51±0,6	6,3	18,8±0,6	1,2	54,5±10,3	2,7

4.1.7 Rendimento de hidrogênio (HY)

Os valores médios de rendimento de hidrogênio obtidos no R1 estão apresentados na Figura 4.8. De acordo com os dados obtidos, o rendimento médio verificado em TDH de 24 h foi $0,6 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{glicose}_{\text{convertida}}$, valor que se manteve estável em TDH de 20 h ao ser verificado $0,56 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{glicose}_{\text{convertida}}$. Durante a terceira e quarta fase de operação houve queda nos valores médios de HY, sob TDH de 16 h o rendimento de hidrogênio foi reduzido para $0,36 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{glicose}_{\text{convertida}}$, após a redução do TDH para 12 h foi verificado HY correspondente a $0,28 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{glicose}_{\text{convertida}}$. Na quinta fase de operação com TDH de 8 h foi obtido o maior rendimento médio do R1, alcançando $1,11 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{glicose}_{\text{convertida}}$.



O rendimento de hidrogênio representa a conversão de elétrons produzidos durante a oxidação do substrato até a formação de H_2 , porém para esta máxima formação é necessário um arranjo ideal de parâmetros para propiciar condições ótimas à geração do biogás. Devido ao baixo rendimento de hidrogênio e as altas concentrações de ácido acético verificadas nos TDH de 24 até 12 h, pode-se inferir que ocorreu a homoacetogênese, pois durante a formação de ácido acético por esta via há o consumo de 4 mols de hidrogênio e 2 mols de CO_2 . Como observado por Oh et al. (2008), havendo CO_2 e H_2 disponíveis é possível que homoacetogênese ocorra.

Em TDH de 8 h foi observada produção simultânea de etanol ($0,957 \text{ mol EtOH} \cdot \text{mol}^{-1} \text{glicose}$) e hidrogênio ($1,11 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{glicose}_{\text{convertida}}$), fenômeno também observado por Han et al. (2012), Wang, Li e Ren (2013) e Rosa et al. (2014). De acordo com Ren et al. (1997) em pH de 4,5, como foi observado nesta fase,

a indução da produção simultânea de etanol e hidrogênio ocorre de maneira mais fácil e estável quando comparado com a rota do butirato.

Os valores de rendimento de H_2 encontrados no R1 se mostraram análogos e até superiores a trabalhos encontrados na literatura. Arreola-Vargas et al. (2013) avaliaram a produção de hidrogênio em batelada sequencial a partir da palha de aveia hidrolisada por via ácida ou enzimática, o hidrolisado obtido foi testado em co-fermentação com mistura de xilose e glicose. Somente o hidrolisado obtido pela via enzimática foi avaliado individualmente em etapa específica do experimento. A fermentação utilizando hidrolisado obtido por via ácida na concentração $4,5\text{g.L}^{-1}$ com adição de $0,5\text{ g.L}^{-1}$ de solução de açúcares propiciou o rendimento de $0,59\text{ mol } H_2.\text{ mol açúcares}_{\text{convertidos}}$. O experimento aplicando somente o hidrolisado obtido por via enzimática na concentração 5 g.L^{-1} proporcionou o rendimento de $0,81\text{ mol } H_2.\text{ mol açúcares}_{\text{convertidos}}$. Mesmo operando com afluente em menor concentração de açúcares e na presença de agente potencialmente inibidor, no R1 foi possível obter rendimentos superiores aos de Arreola-Vargas et al. (2013).

Lo et al. (2009) utilizaram CMC hidrolisada por enzimas celulolíticas como fonte de substrato para produção de hidrogênio em batelada. Os autores alcançaram rendimento inferior ao obtidos pelo R1, foi verificado rendimento máximo de $4,79\text{mmol } H_2.\text{ mol açúcar}$, valor 230 vezes menor que o obtido no presente trabalho.

Semelhante ao hidrolisado utilizado no R1, Liu et al. (2013) aplicaram o ácido sulfúrico como agente hidrolítico, porém em concentração superior, 55%. Como parte do estudo o reator foi alimentado com mistura de palha de arroz hidrolisada e água de lavagem de indústria alimentícia. Operando CSTR com TDH fixo em 4 h e temperatura 37°C os autores obtiveram rendimento máximo de $0,69\text{ mol } H_2.\text{ mol açúcar}_{\text{total}}$. Pattra et al. (2008) também utilizaram H_2SO_4 para hidrolisar bagaço da cana-de-açúcar, porém em baixas concentrações, de 0,25 até 7%. A concentração ótima verificada para hidrólise do bagaço da cana-de-açúcar foi 0,5%. Os autores verificaram rendimento máximo de $1,73\text{mol } H_2.\text{mol}^{-1}\text{açúcar}_{\text{total}}$, rendimento este superior aos alcançados no R1, porém as fermentações foram executadas em batelada e com concentração de substrato fixa em $20\text{g}_{\text{DQO}}.\text{L}^{-1}$, concentração esta 10 vezes superior à utilizada no presente estudo. Os autores atribuem os bons rendimentos aos baixos níveis de inibidores como furfural.

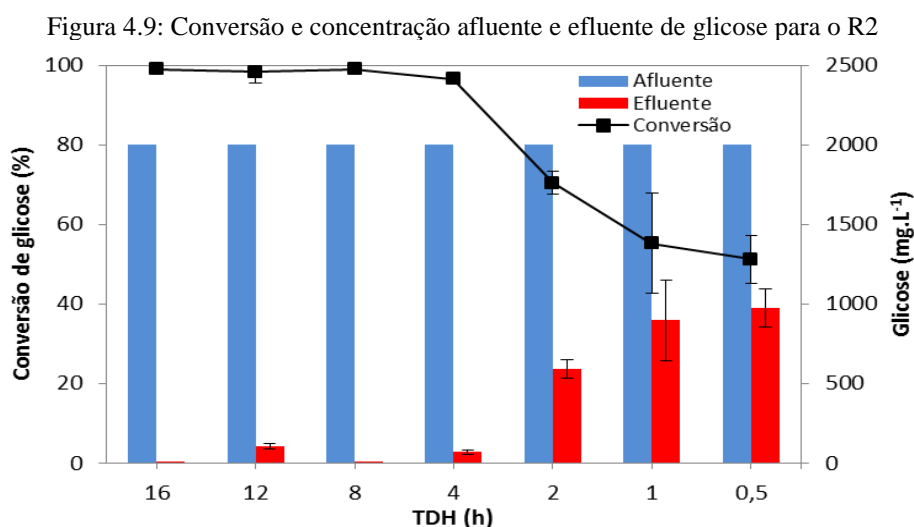
Saripam e Reungsang (2014) utilizaram a estratégia de sacarificação e fermentação simultânea (SFS) objetivando a produção de hidrogênio fermentativo em batelada. Como matriz celulósica foi utilizada CMC ou bagaço da cana de açúcar.

Durante a SFS a partir de CMC o maior rendimento detectado foi 11,32 mmolH₂.g CMC resultado este obtido na mesma temperatura de operação do R1, 55°C. Para a SFS a partir de bagaço de cana o rendimento foi menor, contabilizado em 7,10 mmolH₂.g⁻¹ celulose.

4.2 RALF alimentado com glicose e xilose – R2

4.2.1 Conversão de carboidrato

De acordo com a Figura 4.9 as conversões de glicose se mantiveram estáveis entre 96 e 99% nos quatro primeiros TDH (16, 12, 8 e 4 h), porém após reduzir o TDH para 2 h foi observado queda na conversão média de glicose, passando para 70%. Em TDH de 1 h foi observado nova queda na conversão média, passando para 55%, este valor pouco se alterou ao reduzir o TDH para 0,5 h, sendo contabilizados 57% de conversão da glicose afluyente.



Segundo a Figura 4.10, a maior conversão de xilose, 56,7%, foi verificada na primeira fase de operação. Nos dois TDH aplicados em sequência, 12 e 8 h, a conversão reduziu para 25 e 26% respectivamente. Os valores de conversão continuaram a cair ao longo da operação do R1, de modo que nas últimas quatro fases os valores de conversão se mantiveram entre 7,3 e 12,8%. A Tabela 4.6 apresenta as concentrações afluentes e efluentes para glicose e xilose e suas respectivas conversões em cada TDH aplicado. Ao observar as conversões de glicose e xilose ao longo da operação do R2 fica evidente que o menor tempo de residência dos substratos teve influência direta em suas conversões.

De acordo com Sittijunda et al. (2013) o TDH pode ser reduzido de tal modo que, num dado intervalo de tempo, a capacidade de conversão dos substratos pelas células seja insuficiente.

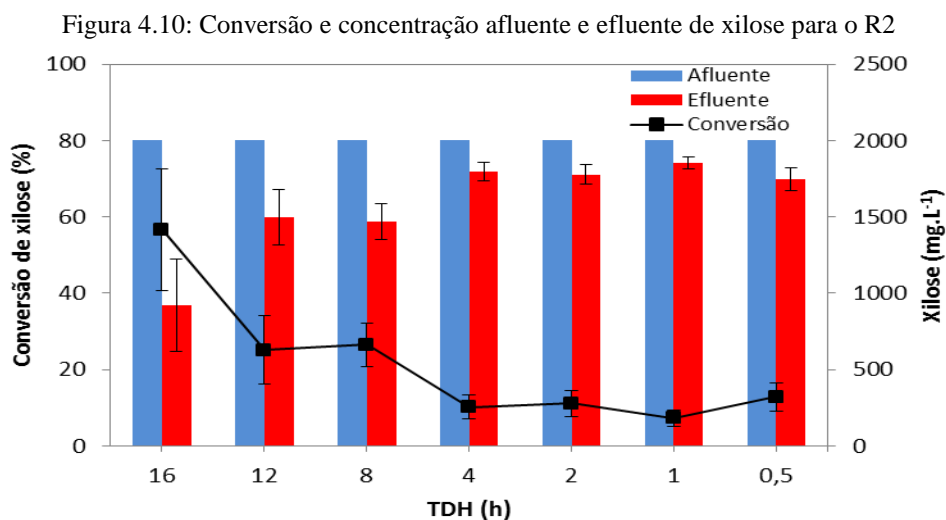


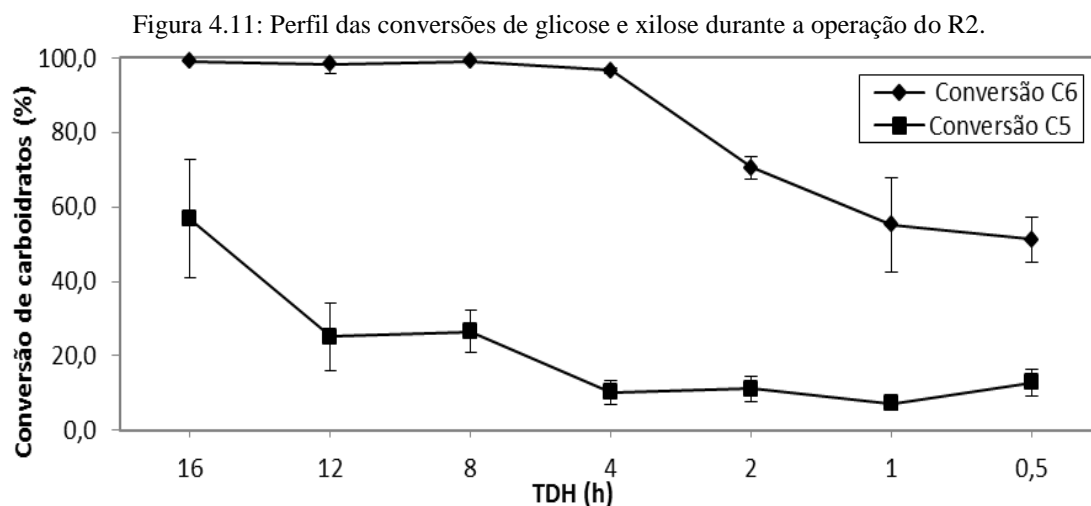
Tabela 4.6: Conversão e concentração de carboidratos para o R2.

TDH (h)	16	12	8	4	2	1	0,5
Conversão Glicose (%)	99	98±2,6	99	96±0,6	70±2,9	55±12,6	51±6
Conversão Xilose (%)	56±15,9	25±9	26,5±5,7	10±3,1	11±3,3	7,3±2,0	12,8±3,7
Glicose Afl. (mg.L⁻¹)	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000
Glicose Efl. (mg.L⁻¹)	0,1	104±18	0,1	69±12,7	591±58	896±25,2	975±119
Xilose Afl. (mg.L⁻¹)	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000
Xilose Efl. (mg.L⁻¹)	923±302	1497±179	1469±115	1797±62	1778±67	1854±40	1744±75

Analisando os dados apresentados na Figura 4.11, percebe-se que as maiores conversões para glicose demonstra maior assimilação deste açúcar pelas bactérias em relação à xilose. Para entrar na via da glicólise e posterior produção de hidrogênio a xilose passa previamente por etapas adicionais. Inicialmente a xilose é convertida a xilulose, em sequência é fosforilada para formação de xilulose-5-fosfato para então entrar na via da glicólise na forma de gliceraldeído-3-fosfato (Wu et al. 2014).

Apesar da preferência pela glicose durante a co-fermentação, a estratégia de aplicação simultânea destes dois açúcares pode ser mais vantajosa que o emprego dos

mesmos individualmente. Como observado por Erdei et al. (2013) a presença da glicose em quantidades adequadas pode contribuir para assimilação e maior conversão da xilose presente.



A presença da glicose durante a co-fermentação pode desfavorecer a conversão de xilose. Há relatos na literatura que reforçam esta afirmação, como o trabalho desenvolvido por Ren et al. (2008), que teve como objetivo avaliar a produção de hidrogênio pela espécie *T. thermosaccharolyticum* W16 durante a co-fermentação de glicose e xilose. Para tal, foi utilizado reator batelada com temperatura fixa em 60°C. Os autores perceberam que ao aumentar a concentração de glicose de 20 para 50% dos açúcares totais houve queda na taxa de consumo de xilose de 0,29 g.L⁻¹ h⁻¹ para 0,09g.L⁻¹ h⁻¹. O mesmo fenômeno observado por Li et al. (2010), os autores estudaram a produção de hidrogênio a partir de xilose ou glicose e em co-fermentação destes açúcares na proporção 1:1. No experimento utilizando os açúcares individualmente foi observado maior quantidade de xilose residual quando comparado com a glicose. Durante a co-fermentação também foi observado preferência de utilização de glicose pela espécie *Thermoanaerobacterium aotearoense* SCUT27.

A queda observada na conversão dos substratos em virtude da redução do TDH também foi verificada em trabalhos utilizando reatores contínuos e fontes de carbono simples para produção de hidrogênio. Sittijunda et al. (2013) avaliaram a co-fermentação de xilose (10g.L⁻¹) e glicose (10g.L⁻¹) a 70°C em três UASB preenchidos com diferentes suportes (palha de colza, granulo de UASB e carvão ativado). Foi verificado que a redução no TDH de 12 para 3 h resultou no menor consumo de ambos os substratos, passando de 88-95% para valores entre 33 e 48%. Zhao, Lu e Wang

(2013) também observaram queda no consumo de glicose e xilose após a redução do TDH aplicado. Em UASB mantido a 70°C, as conversões nos TDH de 24, 18 e 12 h atingiram valores superiores a 90%, porém com a redução do TDH para 6 h as conversões para glicose e xilose foram 62 e 74% respectivamente. Neste trabalho foram observadas conversões de xilose superiores às observadas para glicose, segundo os autores, este fato difere do observado na maioria dos trabalhos, pois cada espécie pode se comportar de maneira diferente para cada fonte de carbono aplicada.

Zhang de et al. (2009) utilizaram RALF mantido a 37°C para produção de hidrogênio por cultura mista a partir de glicose (10g.L⁻¹). Os autores observaram redução no consumo do substrato de 99 para 71% ao reduzir o TDH de 4 h para 0,5 h. Comportamento semelhante foi observado por Barros et al. (2011), tanto RALF 1 (material suporte: pneu triturado) quanto RALF 2 (material suporte: PET) apresentaram conversões menores em TDH reduzidos. Até o TDH de 2 h o RALF 1 apresentou conversão de glicose em torno de 90%, porém ao reduzir o TDH para 1 h a conversão passou para 64%. O RALF 2 apresentou conversões próximas a 85% até o TDH 4 h, após a redução do TDH para 2 e 1 h as conversões verificadas foram 71 e 60% respectivamente.

Mesmo trabalhando com inóculo composto por grande diversidade microbiana, o que aumentaria as chances de adaptação a diferentes substratos a presença da glicose possivelmente interferiu na efetiva utilização de xilose. Há também a possibilidade da ação de fatores como temperatura e TDH terem contribuído para seleção de microrganismos que não se adaptaram ao consumo simultâneo de glicose e xilose.

4.2.2 Demanda química de oxigênio

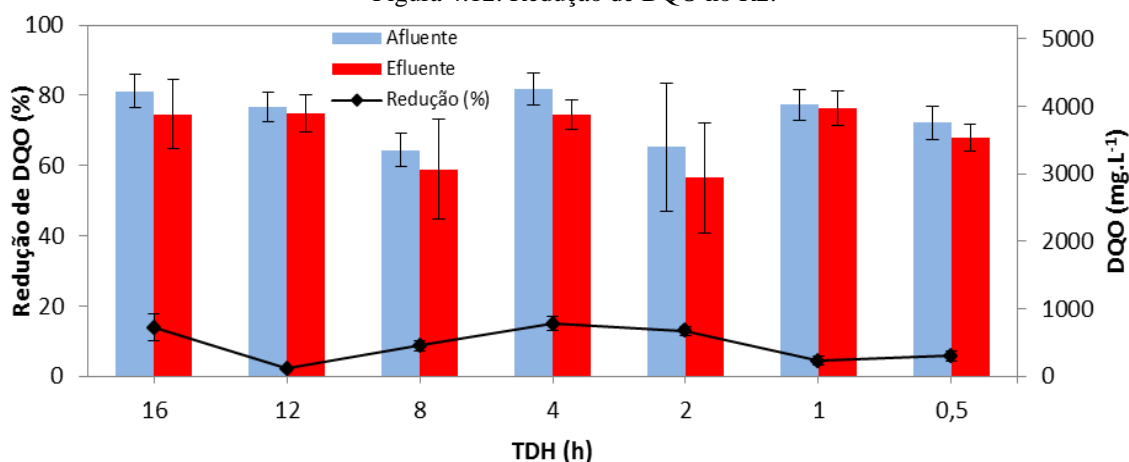
A Figura 4.12 e Tabela 4.7 apresentam a eficiência da remoção de matéria orgânica durante a operação do R2 em virtude dos diferentes TDH aplicados. Os valores médios de DQO afluente se mantiveram entre 3346 e 4256 mg.L⁻¹, enquanto a DQO média para os efluentes foram observados entre 2943 e 3947 mg.L⁻¹. De acordo com os dados obtidos, os valores de redução de DQO ficaram abaixo de 20%, sendo a máxima, 15%, verificada em TDH de 4 h, enquanto a mínima, 4%, foi observada em TDH de 12 h. Os valores de redução de DQO obtidos no R2 condizem com a literatura direcionada à produção de hidrogênio, essa baixa redução de DQO ocorre principalmente em virtude

dos metabólitos gerados em fase líquida durante a conversão da matéria orgânica aplicada.

Tabela 4.7: Redução e concentração afluente e efluente de DQO para o R3

TDH (h)	16	12	8	4	2	1	0,5
Redução (%)	13,9±3,93	2,2±0,56	8,7±1,46	15,0±1,93	12,91,21±	4,3±1,21	5,9±1,47
Afluente (mg.L ⁻¹)	4222±246	3980±218	3346±247	4256±237	3392±944	4018±223	3760±246
Efluente (mg.L ⁻¹)	3882±514	3892±270	3063±740	3878±222	2943±815	3974±257	3538±200

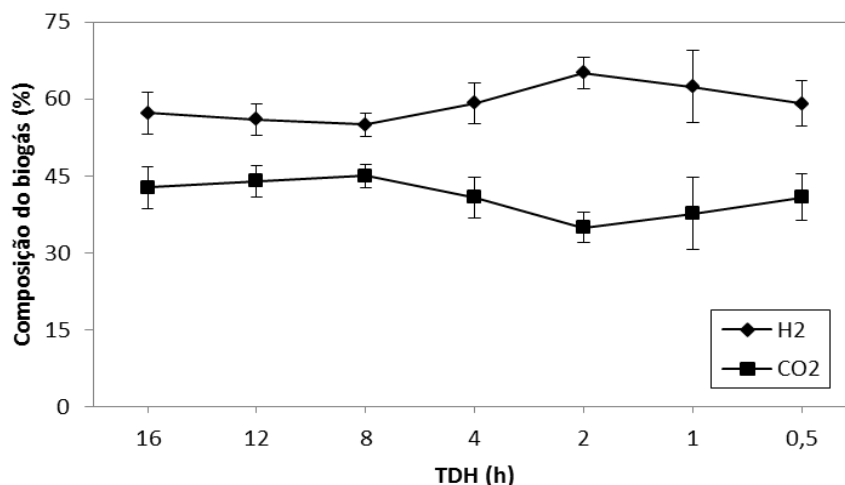
Figura 4.12: Redução de DQO no R2.



4.2.3 Composição do biogás produzido no R2

A Figura 4.13 apresenta a composição do biogás produzido ao longo da operação do R2. De acordo com os dados obtidos o hidrogênio compôs de 55 a 65% do biogás gerado, sendo a menor porcentagem detectada em TDH de 8 h e a máxima em TDH de 2 h. A redução do TDH de 16 até 0,5 h não influenciou a composição do biogás gerado, uma vez que o conteúdo de hidrogênio se manteve estável e com valores elevados durante toda operação do reator. Além de apresentar bons valores para o conteúdo de hidrogênio, não foi detectado metano durante a operação, o que demonstra eficiência nas estratégias adotadas para supressão das arqueias metanogênicas.

Figura 4.13- Composição do biogás produzido pelo R2.



Li et al. (2010) estudaram a produção de hidrogênio em batelada a partir da co-fermentação de glicose e xilose na razão 1:1 (10g.L^{-1}) sob condições termofílicas (55°C). O biogás obtido foi composto por hidrogênio (26-49%) e dióxido de carbono (36-70%). Comparando o biogás produzido por Li et al. (2010) e o obtido pelo R2 percebe-se que mesmo trabalhando em TDH reduzidos o R2 apresentou biogás com maiores concentrações de hidrogênio, esta mesma análise pode ser feita com os valores obtidos por Hniman, Prasertsan e O-Thong (2011). Os autores trabalharam com 5g.L^{-1} de xilose e glicose em batelada e temperatura fixa em 60°C . Nestas condições foi verificado biogás composto por 21% de hidrogênio, valor correspondente a 32% do que foi possível obter no R2 em TDH de 2 h.

4.2.4 Produção volumétrica de hidrogênio (PVH)

Estão apresentados na Figura 4.14 e Tabela 4.8 os valores de PVH e TCO aplicada ao R2 nas diferentes fases de operação. Frente aos TDH aplicados a produtividade volumétrica variou de 58 a $279\text{ mLH}_2\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$. Em TDH de 16 h a PVH observada foi de $76\text{ mLH}_2\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$, ao reduzir o TDH para 12 h foi detectado leve redução na PVH média, passando para $58,8\text{ mLH}_2\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$. Submetendo o R1 ao TDH de 8 h foi observada PVH de $103,3\text{ mLH}_2\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$. Novo aumento na PVH foi observado após aplicar TDH de 4 h, nestas condições foi contabilizado $209\text{ mLH}_2\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$. Seguindo com a redução do TDH para 2 h a PVH foi elevada para $229,9\text{ mLH}_2\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$. Em TDH de 1 h a produtividade alcançou valor de $276,1\text{ mLH}_2\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$. Reduzindo o

TDH pela metade (0,5 h) e praticamente dobrando a TCO (169 para 326 $\text{Kg.m}^{-3}\text{d}^{-1}$) foi obtida a máxima PVH para o R2, totalizando 279,9 $\text{mLH}_2\text{.h}^{-1}\text{.L}^{-1}$.

Figura 4.14- Produtividade volumétrica de hidrogênio do R2

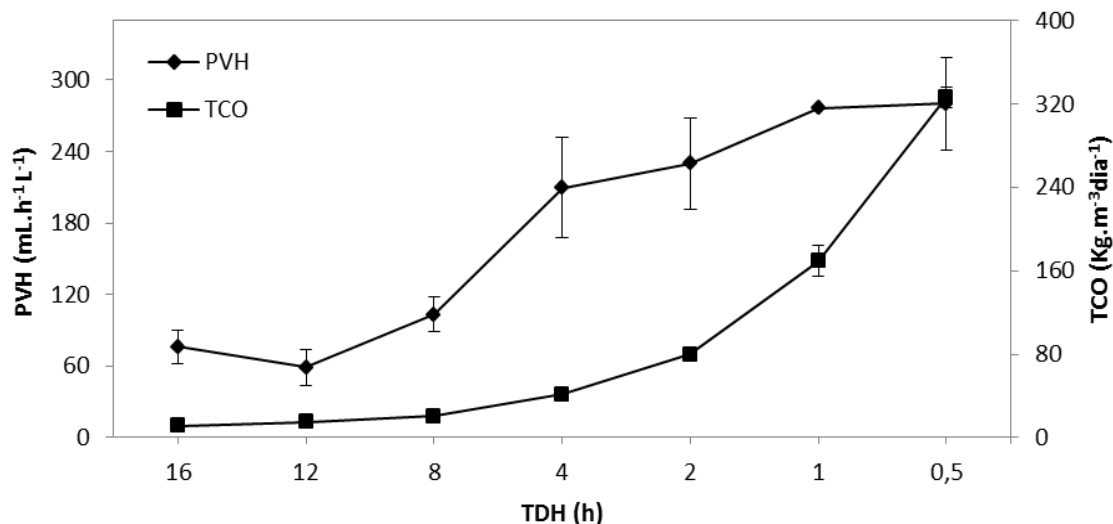


Tabela 4.8: Relação produtividade de hidrogênio e TCO aplicada pra o R2.

Fase	1	2	3	4	5	6	7
TDH(h)	16	12	8	4	2	1	0,5
PVH ^a	76±14	58,8±15	103,3±14	209,7±42	229,9±38	276,1	279,9±39
TCO ^b	11,6±0,98	15±1,5	20,6±1,4	41,6±3,4	79,4±5,2	169,4±14,7	326±10,4

^a $\text{mL.h}^{-1}\text{.L}^{-1}$ ^b $\text{Kg.m}^{-3}\text{.dia}^{-1}$

Foi observado no R2 que a redução do TDH e consequente elevação na TCO aplicada acarretou no aumento da PVH média, comportamento este também verificado em trabalhos como de Santos et al. (2014) e Shida et al. (2009) em que utilizaram RALF para produção de H_2 . Este aumento na produtividade verificado em trabalhos utilizando sistemas contínuos ocorre devido a maior quantidade de substrato inserida no reator. Vale ressaltar que valores de TCO demasiadamente altos podem impactar negativamente na produtividade e rendimento de hidrogênio, podendo ocorrer, por exemplo, inibição por substrato.

Ao operar reator de fluxo ascendente em TDH de 23 h sob condição termofílica extrema, Chenxi et al. (2013) alcançaram a PVH máxima de 0,051 $\text{L.h}^{-1}\text{.L}^{-1}$ durante a co-fermentação de glicose e xilose em 10 g.L^{-1} de cada açúcar. Este resultado é semelhante ao menor valor obtido pelo R2, 58,8 $\text{mL.h}^{-1}\text{.L}^{-1}$, verificado em TDH de 12 h e concentração 2 g.L^{-1} de cada açúcar.

Zhao, Lu e Wang (2013) também alcançaram valores de PVH inferiores aos observados no R2. Durante a operação do UASB alimentado com glicose (10 g.L^{-1}) e

xilose (10g.L^{-1}) em condições mesofílicas foi observado que a redução do TDH de 24 até 12 h acarretou no aumento na PVH, atingindo valor máximo de $0,121\text{ L.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$. Com a redução do TDH para 6 h os autores perceberam queda na PVH, passando para $0,049\text{ L.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$.

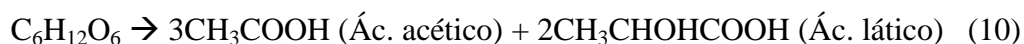
4.2.5 Metabólitos solúveis produzidos

Encontram-se na Figura 4.15 e Tabela 4.9 a relação dos metabólitos produzidos em fase líquida ao longo da operação do R2. Durante as sete fases avaliadas foram identificados os seguinte compostos: Etanol, glicerol e os ácidos: acético, láctico, butírico, maleico e propiônico e fórmico. Os metabólitos verificados em maior concentração foram ácido láctico (máx. 46%) e etanol (máx. 56%).

Na primeira fase de operação, em TDH de 16 h, foi observada distribuição quase equivalente para os principais metabólitos detectados. O ácido maleico contabilizou 30%, láctico 20% e os ácidos butírico e acético 19% cada. Para os TDH de 12, 8 e 4 h o principal metabólito produzido foi o ácido láctico, sendo contabilizando de 38 a 46%. Já nas três últimas fases de operação (TDH 2, 1 e 0,5h) o etanol foi predominante, representando de 47 a 56% dos metabólitos solúveis produzidos.

A distribuição igualitária de metabólitos verificada na primeira fase representa a ação de rotas mistas, sem favorecimento de nenhuma delas. Porém dentre os metabólitos predominantes em TDH de 16 h, apenas os ácidos butírico e acético estão diretamente relacionados a bom rendimento de hidrogênio.

A presença do ácido láctico nas quatro fases iniciais, principalmente em TDH de 12, 8 e 4 h, demonstra que possivelmente a rota predominante tenha sido a homofermentativa (Equação 9), não podendo ser descartada a rota bifidum (Equação 10), uma vez que o ácido acético também foi identificado nestas fases.



Assim como observado no R2, há relatos na literatura sobre produção concomitante de hidrogênio e ácido láctico. Santos et. al (2014) avaliaram a produção termofílica de hidrogênio (55°C) em RALF alimentado com mistura de glicose e vinhaça ou somente vinhaça. Utilizando cultura mista a produção de hidrogênio foi

avaliada em TDH decrescente de 8 até 1 h. Em TDH de 4 h durante co-fermentação de glicose (33%) e vinhaça (67%) foi observado maior nível de ácido láctico, 30,9% dos metabólitos produzidos, e maior rendimento de hidrogênio, 5,73mmolH₂.gDQO_{aplicada}. Assim como Santos et al. (2014), Baghchehsaraee et al. (2009) também observaram favorecimento da produção de hidrogênio devido a presença de ácido láctico.

Nos TDH de 2, 1 e 0,5 h o ácido láctico deixou de ser predominante e as concentrações de etanol se tornaram expressivas. Possivelmente houve mudança de via metabólica, sendo agora favorecida a rota do etanol. Maiores rendimentos de etanol podem acarretar baixo rendimento de hidrogênio e caso a Equação (8) seja seguida, o piruvato, precursor da produção de hidrogênio, passa a ser utilizado exclusivamente para produção de etanol e dióxido de carbono. Além da possível mudança no fluxo metabólico observada a partir do TDH de 2 h, a redução do TDH provavelmente interferiu na cultura predominante, uma vez que, o ácido láctico é tipicamente produzido por bactérias ácido lácticas (ex: *Lactobacillus casei*) (Wu e Zhang, 2013), enquanto que o etanol pode ser comumente produzido por bactérias do gênero *Methanobacterium* (Rosa et al. 2014) e leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* (Sakihama, Hasunuma e Kondo, 2015).

Figura 4.15: Metabólitos solúveis produzidos em cada fase de operação do R2

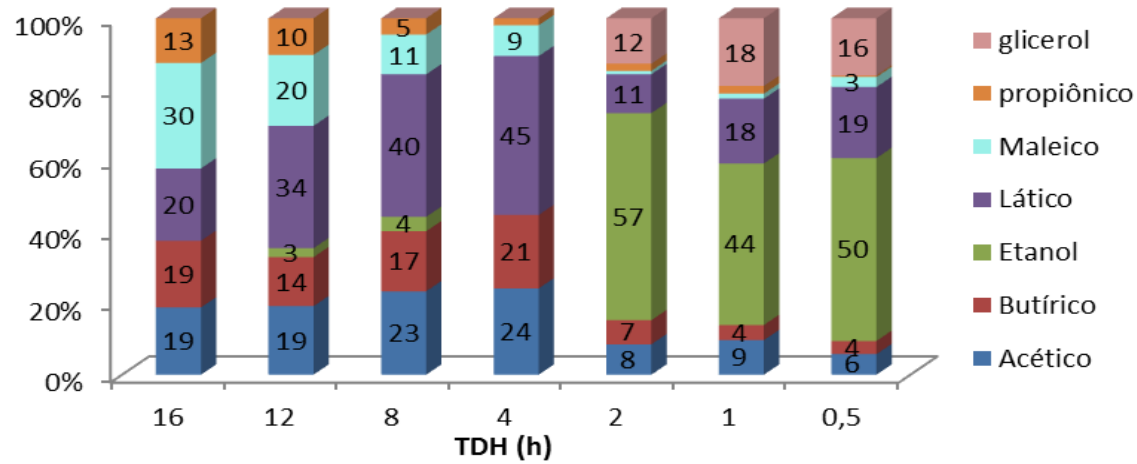
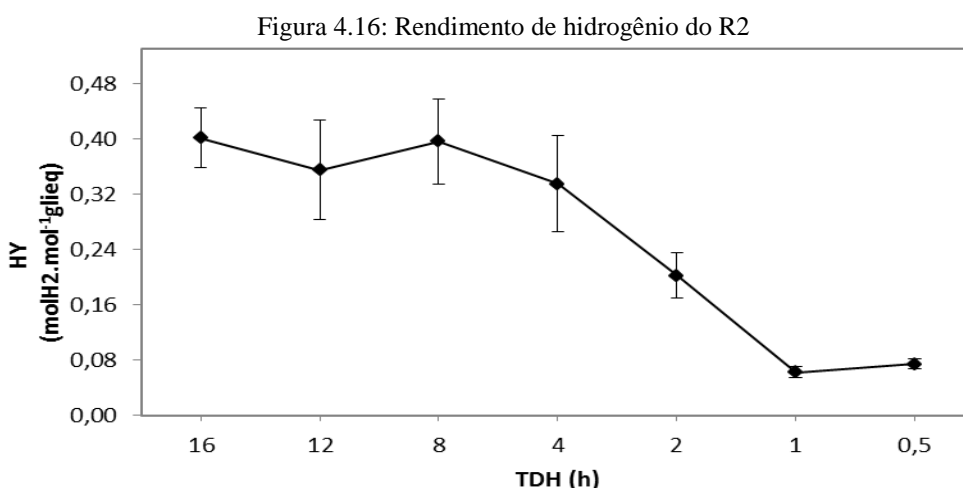


Tabela 4.9- Ácidos orgânicos e álcoois verificados no RALF alimentado com xilose e glicose.

Fase	TDH (h)	Ácidos orgânicos e álcoois detectados (mg.L ⁻¹) %															
		Acético	%	Butírico	%	Etanol	%	Láctico	%	Maleico	%	Propionico	%	fórmico	%	glicerol	%
1	16	176,7±84	18,9	256,6±64	18,7	0	0,0	285±54	20,3	535,2±46	29,6	144,7±33	12,5	0	0	0	0
2	12	183,6±38	19,2	192,8±41	13,8	18,3±6	2,5	491,7±95	34,3	368±22	19,9	121±28	10,3	0	0	0	0
3	8	252,4±68	23,4	266,5±33	16,8	33,6±19	4,1	646,5±73	40,0	232,9±25	11,2	60,9±10	4,6	0	0	0	0
4	4	218±45	24,2	272,2±44	20,6	0	0,0	601,8±26	44,6	150,3±7	8,6	21,9±4	2,0	0	0	0	0
5	2	88,5±2	8,3	103,2±14	6,6	463,6±53	56,7	170,2±23	10,7	18,7±6	0,9	26±5	2,0	16,2±2	1,98	203,67±27	12,46
6	1	64,5±12	9,4	41,3±6	4,1	231±10	44,0	180,8±38	17,6	18±10	1,4	17,7±3	2,1	14±3	2,67	193,67±26	18,43
7	0,5	31,8±7	5,6	30±5	3,6	217±86	50,1	164,8±17	19,5	29,8±11	2,7	3±0,8	0,4	9,33±2	2,16	135,82±10	15,70

4.2.6 Seletividade (SL) e rendimento de hidrogênio (HY)

Os rendimentos médios de hidrogênio para o R2 encontram-se apresentados na Figura 4.16. De maneira geral o rendimento de hidrogênio apresentou perfil decrescente em razão das reduções de TDH. Segundo os valores obtidos o maior HY médio foi observado em TDH de 16 h, $0,401 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$ de glicose equivalente (glieq). Após a redução do TDH para 12 h o HY médio apresentou valor de $0,355 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$ glieq. Ao reduzir o TDH para 8 h foi observado leve aumento no HY médio, contabilizando $0,396 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$ glieq, porém após aplicar TDH de 4 h foi verificado nova queda nos valores de HY, atingindo $0,335 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$ glieq. Em TDH de 2 h o rendimento médio de hidrogênio voltou a cair, contabilizando $0,202 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$ glieq. O menor HY detectado durante a operação do R2 ocorreu em TDH de 1 h, $0,062 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$ glieq. No último TDH verificado (0,5 h) o rendimento médio de hidrogênio foi $0,074 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$ glieq, ligeiramente superior ao HY observado em TDH de 1 h.



Apesar da presença dominante de ácido lático nos TDH de 16 até 4 h foi verificada a produção de hidrogênio. Este fato pode ser justificado pela ação de rotas mistas e pelo que foi observado por Baghchehsaraee et al. (2009) e Kim et al. (2012), estes autores verificaram que a presença de ácido lático pode favorecer a formação de hidrogênio. A degradação do lactato contribui para o aumento de NADH residual, que posteriormente pode ser utilizado na geração de H₂ como é descrito pela Equação 11.



A redução nos valores de HY médios que ocorreram nas fases 5, 6 e 7 pode ser justificada pelo aumento da produção de etanol, indicando o favorecimento da rota etanólica em virtude da redução do TDH e aumento da TCO aplicada.

Zhao, Lu e Wang (2013) obtiveram resultados semelhantes ao do R2. Os autores utilizaram reator UASB para co-fermentação de xilose e glicose sob temperatura de 70°C. O TDH inicial de 24 h forneceu rendimento de 0,24 mol H₂.mol⁻¹glieq, ao reduzir o TDH para 18 h o rendimento aumentou para 0,32 mol H₂.mol⁻¹glieq, porém após a redução no TDH para 12 h foi observado aumento no rendimento de hidrogênio, alcançando 0,58 mol H₂.mol⁻¹hexose. Outra queda nos valores de HY ocorreu com a subsequente redução do TDH para 6 h, apresentando valor de 0,12 mol H₂.mol⁻¹hexose.

Os valores de HY médio observados no R2 foram superiores aos obtidos por Chenxi et al. (2013). Os autores avaliaram a produção de hidrogênio em batelada sob diferentes razões glicose/xilose, porém em concentração de açúcares totais fixa em 5g.L⁻¹. De acordo com os autores o rendimento de hidrogênio não foi afetado pelas diferentes proporções de glicose e xilose, mantendo-se sempre em torno de 0,2 mol H₂.mol⁻¹glieq. Mesmo trabalhando em temperatura de 70°C, talvez o trabalho de Chenxi et al. (2013) tenha sido afetado pelos efeitos de pressão parcial do hidrogênio devido a configuração do reator utilizado. Esta vantagem pode ser obtida ao se trabalhar com RALF já que a configuração do reator permite melhor separação gás/líquido e contínua liberação do hidrogênio produzido, reduzindo assim os efeitos de saturação de hidrogênio em fase líquida.

Xu et al. (2010) alcançaram maiores rendimentos em relação aos HY observados no R2, ao estudarem a produção de hidrogênio em co-fermentação de glicose e xilose sob diferentes razões. Neste trabalho os autores verificaram o maior rendimento de 2,01 mol H₂.mol⁻¹glieq. No trabalho também foi avaliada a mesma razão glicose/xilose utilizada no R2, porém os autores observaram rendimento superior, contabilizando 1,80 mol H₂.mol⁻¹glieq. Talvez este maior rendimento observado ocorreu pelo fato dos autores trabalharem com inóculo puro (*Clostridium* sp. HR1) e concentração de açúcares 6 vezes maior que a empregada no R2.

Chaganti, Kim e Lalman (2012) também alcançaram rendimento superior ao do presente estudo. Os autores estudaram a eficiência do ácido oleico como inibidor de organismos consumidores de hidrogênio, esta avaliação foi executada durante a co-fermentação de glicose e xilose em batelada sob condições mesofílicas. Dentre as diferentes razões de glicose/xilose também foi avaliada a razão 1:1. O maior rendimento

percebido, $2,84 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{glieq}$ foi obtido com 100% de glicose. Ao utilizarem a razão 1:1 (glicose/xilose) o rendimento alcançado foi $2,6 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{glieq}$. De acordo com os resultados obtidos, a adição de ácido oleico durante a co-fermentação contribuiu para tais rendimentos alcançados.

Sittijunda et al. (2013) observaram rendimento semelhante aos verificados no R2 ao comparar diferentes materiais suportes (granulo de UASB, palha de colza e carvão ativado) para reator UASB alimentado com xilose ($10 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) e glicose $10 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. O maior rendimento obtido pela espécie *T. pentosaceus* foi $0,385 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{açúcar}$ consumido, verificado em TDH de 3 h em UASB mantido a 70°C e preenchido com palha de colza.

A Figura 4.17 apresenta a seletividade da produção de etanol e hidrogênio. Para o R2 a seletividade foi calculada pela razão EtOHY/HY , pois em algumas fases não foi detectada a produção de etanol. De acordo com os dados obtidos, para o R2 houve favorecimento da produção de hidrogênio nos TDH de 16, 12, 8 e 4 h. Em outra via a produção de etanol sobrepôs a de hidrogênio nos TDH mais reduzidos (2, 1 e 0,5 h). Na Tabela 4.10 encontram-se os rendimentos de hidrogênio e etanol ao longo das fases.

Figura 4.17: Seletividade EtOH/HY verificada para o R2.

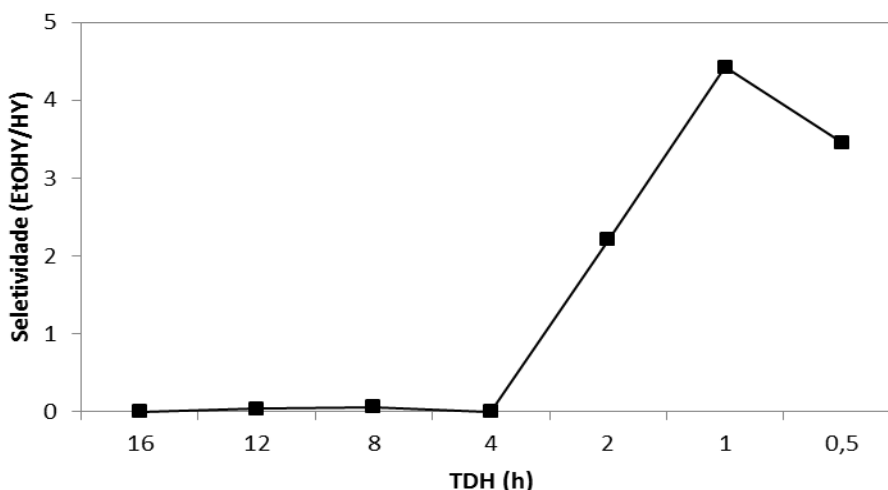


Tabela 4.10: Rendimento de hidrogênio e etanol para o R2.

TDH (h)	16	12	8	4	2	1	0,5
HY^a	$0,401 \pm 0,043$	$0,355 \pm 0,072$	$0,396 \pm 0,062$	$0,335 \pm 0,069$	$0,202 \pm 0,032$	$0,062 \pm 0,008$	$0,074 \pm 0,007$
EtOHY^b	0	$0,013 \pm 0,004$	$0,022 \pm 0,013$	0	$0,045 \pm 0,005$	$0,27 \pm 0,01$	$0,28 \pm 0,1$

^a $\text{mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{glieq}$; ^b $\text{mol EtOH} \cdot \text{mol}^{-1} \text{glieq}$

Barros e Silva (2012) operaram 3 RALF com diferentes materiais suporte (poliestireno, pneu triturado e PET). Os reatores foram avaliados em diferentes TDH,

partindo de 8 até 1 h e como inóculo foi utilizada cultura mista mantida a 23°C. Através das análises de seletividade com base nos rendimentos de etanol e hidrogênio foi verificado nos três reatores, que, em TDH reduzidos foi favorecida a produção de etanol. Nos reatores contendo poliestireno ou pneu triturado o os rendimento de etanol nos TDH de 2 e 1 h foi semelhante aos obtidos para hidrogênio. No reator preenchido com PET foi observado comportamento semelhante ao do R2, pois nos TDH de 4,2 e 1 h os rendimentos de etanol foram superiores aos de hidrogênio.

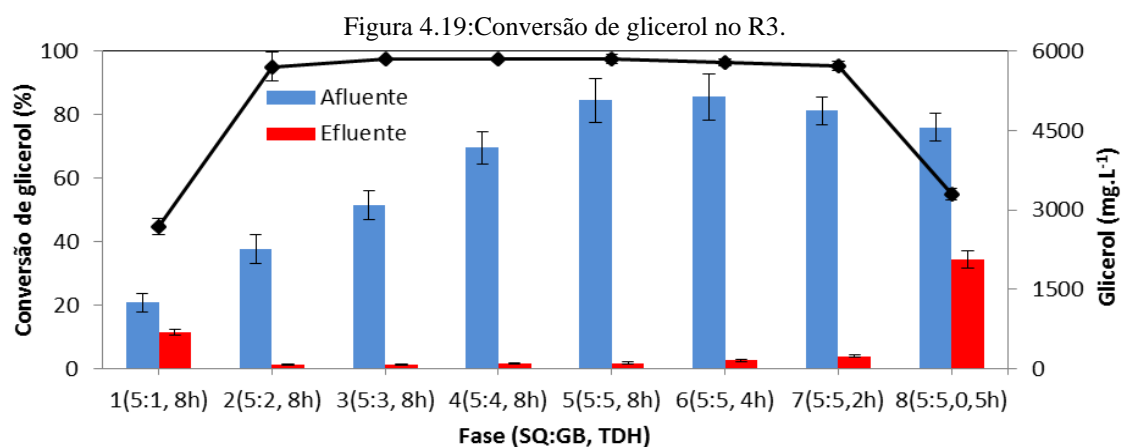
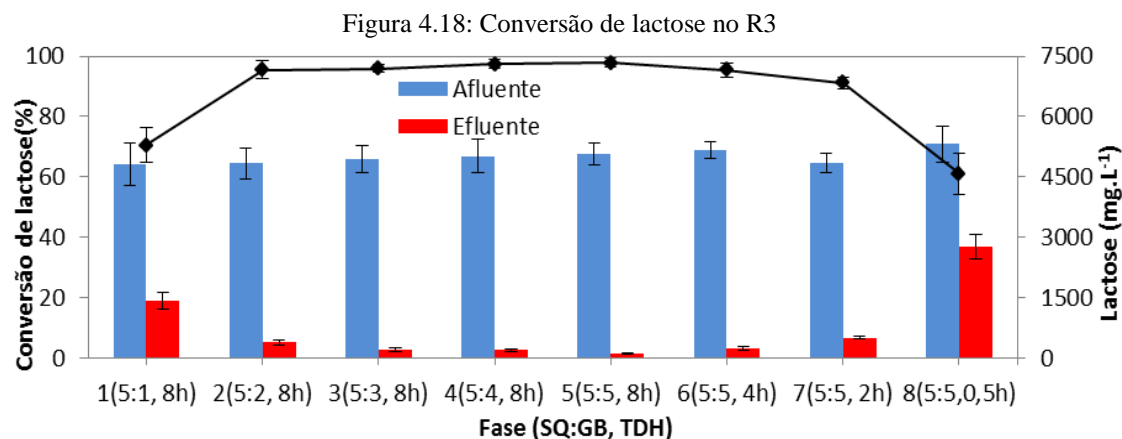
Wu et al. (2007) também verificaram favorecimento da produção de etanol após a redução do TDH e consequente aumento da carga orgânica aplicada. Os autores utilizaram CSTR operado em TDH de 8 até 0,5 h e sacarose (20g DQO.L⁻¹) como fonte de carbono para cultura mista mantida a 35°C. Em TDH de 4 h foi detectado maior rendimento de hidrogênio, 1,18 molH₂.mol sacarose. Após a redução do TDH para 0,5 h foi observado maior rendimento de etanol, 0,9 mol EtOH.mol⁻¹ hexose, enquanto que o rendimento de hidrogênio apresentou valores abaixo de 0,1.

4.3 EGSB alimentado com soro de queijo e glicerol bruto – R3

4.3.1 Conversão de substrato no R3

As Figuras 4.18 e 4.19 e Tabelas 4.11 e 4.12 apresentam os valores de conversão de lactose e glicerol respectivamente. Durante a operação do EGSB foram verificadas altas conversões tanto para a lactose quanto para o glicerol, o que implica adaptação da biomassa aos substratos utilizados. A conversão média de lactose na primeira fase foi 71%, da fase 2 a 7 a conversão de lactose se manteve alta e estável entre 91 e 98%, porém durante a fase 8, em TDH 0,5h e razão SQ:GB 5:5, a conversão diminuiu para 61%.

O perfil de conversão do glicerol bruto foi análogo ao da lactose, durante a primeira fase a conversão média foi 45%, porém a partir da fase 2 até a 7 as conversões verificadas para o glicerol bruto também se mantiveram estáveis e elevadas entre 95 e 98%. Após a aplicação do TDH de 0,5 h a conversão de glicerol reduziu para 55%.



A concentração de glicerol foi a variável avaliada nas cinco fases iniciais de operação do R3, nestas fases a concentração de glicerol bruto variou de maneira ascendente de 1 até 5g.L⁻¹. De acordo com os dados obtidos é possível perceber adaptação da biomassa a um substrato coletado diretamente da linha de produção sem nenhum tratamento prévio. Foi possível observar também que mesmo após a redução do TDH para 4 e 2 h a conversão dos substratos foi próxima à total eficiência, porém em TDH de 0,5 h foi observada a queda nos valores de conversão para ambos os substratos. A menor conversão observada na fase 8 possivelmente ocorreu em virtude do reduzido TDH aplicado, 0,5 h.

Marone et al. (2014) verificaram a produção de hidrogênio através da co-fermentação de soro de queijo, esterco de búfalo e glicerol bruto em batelada. O experimento empregando somente soro de queijo e glicerol apresentou consumo inferior aos observados no R3 para ambos os substratos. A fermentação contendo soro de queijo e glicerol nas concentrações 67 e 33% apresentou consumo de 39% e 3% respectivamente. No entanto, na fermentação com as concentrações inversas o consumo

foi de 54% para o soro de queijo e 5% para o glicerol bruto. Os autores relatam que a aclimação da cultura foi feita em meio contendo glicose, o que possivelmente tenha favorecido o consumo de soro de queijo em relação ao glicerol.

Wang e Yang (2013) avaliaram a co-fermentação de glicerol com glicose para produção de ácido propiônico em batelada e alcançaram conversões semelhantes às observadas no R3. Ao final de 110 h de fermentação foi observada quase completa conversão de ambos os substratos.

Rosales-Colunga et al. (2013) avaliaram a influência de diferentes substratos na produção de hidrogênio em batelada (37°C) pela espécie *E. coli* WDHL e também observaram altas conversões de substrato. Ao utilizar a lactose (15g.L⁻¹) foi observada completa conversão ao fim de 12 h de cultivo, porém em consequência de sua degradação houve liberação de glicose, totalmente convertida, e galactose apresentando concentração residual de 1,2g.L⁻¹. Nos cultivos alimentados com glicose (15g.L⁻¹) ou galactose (15g.L⁻¹) foi observado comportamento semelhante ao cultivo com lactose, a glicose foi totalmente consumida equanto que no experimento contendo galactose foi observada concentração residual de 4,2g.L⁻¹. A co-fermentação de glicose (7,5g.L⁻¹) e galactose (7,5g.L⁻¹) apresentou comportamento diferente, após a completa conversão de glicose a galactose passou a ser consumida, sua completa conversão foi detectada ao fim de 320 h de cultivo.

Em trabalhos como os de Rosa et al. (2014) e Lo et al. (2013), em que foi aplicado somente soro de queijo ou glicerol como substrato para obtenção de hidrogênio, é possível perceber conversões semelhantes às obtidas no R3. Rosa et al. (2014) verificaram altas conversões de lactose, utilizando RALF e concentração de lactose fixa em 5000mg_{DQO}.L⁻¹ os autores obtiveram conversão de 95% em TDH de 4 h, no entanto este valor reduziu para 85% após a redução do TDH para 1 h. Altas conversões de glicerol bruto como utilizado no presente trabalho, foram alcançadas por Lo et al. (2013) ao trabalharem em TDH fixo de 12 h. Os autores obtiveram conversão de 97% para glicerol bruto, em concentração inicial de 12g.L⁻¹ em CSTR operado sob condições mesofílicas.

Tabela 4.11: Conversão e concentração afluente e efluente para lactose utilizada no R3.

Fase (SQ:GB, TDH)	1(5:1, 8h)	2(5:2, 8h)	3(5:3, 8h)	4(5:4, 8h)	5(5:5, 8h)	6(5:5, 4h)	7(5:5, 2h)	8(5:5, 0,5h)
Conversão (%)	71±5,6	95,5±2,9	95,8±1,3	97,4±1,4	98 ±1,6	95,4±2,5	91±1,9	61±6,8
Afluente (mg.L⁻¹)	4805,8±529	4833,2±382	4951,6±336	5021,3±420	5072,1±285	5161,2±205	4855,8±247	5318,4±454
Efluente (mg.L⁻¹)	1412,9±208	389,7±57,4	208,7±36,5	201,3±31,1	126,3±17,5	237±39,4	501,9±33	2765,8±305

Tabela 4.12: Conversão e concentração afluente e efluente para o glicerol utilizado no R3

Fase (SQ:GB, TDH)	1(5:1, 8h)	2(5:2, 8h)	3(5:3, 8h)	4(5:4, 8h)	5(5:5, 8h)	6(5:5, 4h)	7(5:5, 2h)	8(5:5, 0,5h)
Conversão (%)	45±2,49	95,2±4,6	97,5±0,46	97,6±0,23	97,5±1,37	96,4±1,04	95,5±1,46	55,2±1,8
Afluente (mg.L⁻¹)	1249,2±181	2261±270,9	3088±274,8	4178 ±302,7	5076, ±413,8	5142,1±435	4874,2±257,2	4568,2±268,3
Efluente (mg.L⁻¹)	683,2±57,2	73,1±10,3	75±7,5	101,4±4,4	109,9±16	161,2±19	235,3±19,1	2064,3±161,4

4.3.2 Demanda química de oxigênio

O reator R3 tem seus valores de redução média de DQO apresentados na Figura 4.20 e Tabela 4.13. Como já dito previamente durante as cinco primeiras fases o TDH foi fixo em 8 h e avaliada a influência da relação SQ:GB. A primeira fase operacional, com razão SQ:GB 5:1, apresentou o maior valor de redução de DQO para o R3, 38%. A partir da segunda fase (SQ:GB de 5:2) foi observada queda nos valores de redução de DQO. Durante a fase 2 a redução média alcançou 20%. Na fase 3 (SQ:GB de 5:3) foi identificado a menor eficiência de remoção de matéria orgânica, 10%. Nas fases 4 e 5 (SQ:GB 5:4 e 5:5 respectivamente) os valores da eficiência de redução de DQO foram de 14 e 27%.

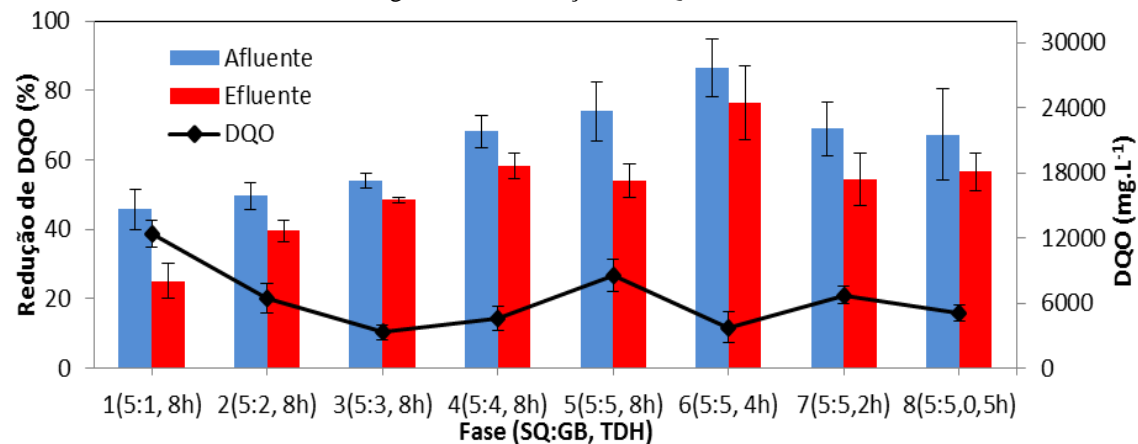
Durante as fases 6, 7 e 8 foi mantida a relação SQ:GB em 5:5 e avaliados diferentes TDH. Nestas três fases foi observada pouca variação na redução de DQO, os valores para o TDH de 4, 2 e 0,5 h foram 18, 21 e 16% respectivamente. Pelos valores apresentados, os baixos níveis de redução de DQO observados entre as fases 2 e 8 podem ocorrer em virtude da maior produção de ácidos orgânicos não relacionados à produção de hidrogênio, já a eficiência de 38% obtida na primeira fase pode ter ocorrido em virtude da maior produção de metabólitos em fase gasosa (H_2 e CO_2).

Guo et al. (2008) alcançaram máxima eficiência de remoção no valor de 38% em TDH de 24 h aos estudarem a produção de hidrogênio em EGSB a partir de amido. Já Liu et al. (2011) observaram redução de DQO em valores mais elevados, neste trabalho os autores também utilizaram EGSB, porém alimentado com chorume fresco. A máxima eficiência observada foi 66,9% obtida em TDH de 12 h. O EGSB é comumente utilizado no tratamento de águas residuárias e durante estes processos podem ser observadas elevadas remoções de matéria orgânica. Outro exemplo é o trabalho de Yoochatchaval et al. (2008) em que foi utilizada água residuária sintética composta por sacarose, acetato, propionato e extrato de levedura. Neste trabalho foi verificada remoção de DQO equivalente a 66% de um afluente com DQO total de 0,6 a $0,8g.L^{-1}$. Liu et al. (2010) alcançaram eficiência de 96% na redução de DQO ao utilizarem EGSB para tratamento de chorume, porém esta máxima eficiência foi obtida em TDH de 68 h, elevado quando comparado aos aplicados no R3.

Tabela 4.13: Conversão e concentração afluente e efluente de DQO para o R3.

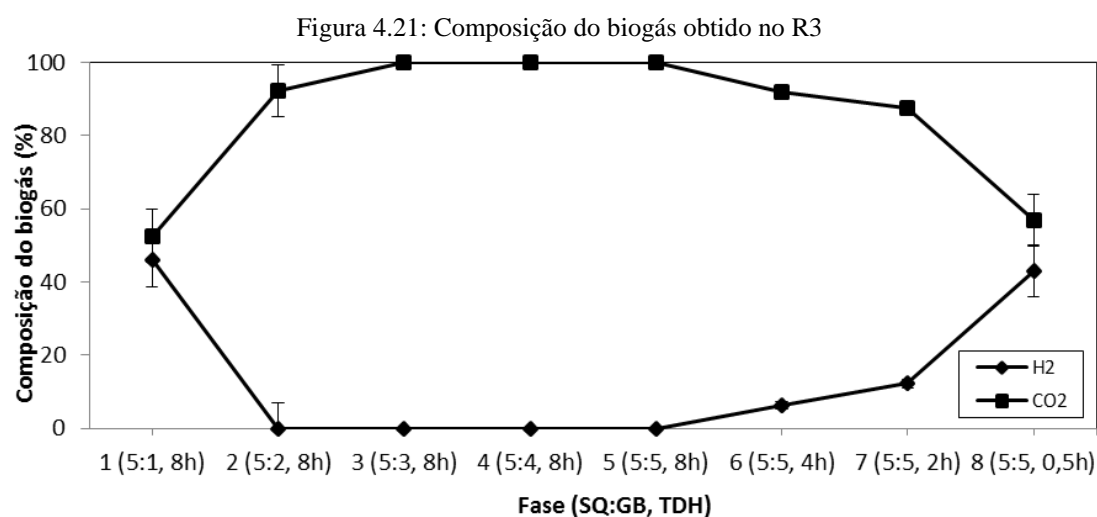
Fase (SQ:GB, TDH)	1(5:1, 8h)	2(5:2, 8h)	3(5:3, 8h)	4(5:4, 8h)	5(5:5, 8h)	6(5:5, 4h)	7(5:5,2h)	8(5:5,0,5h)
Conversão (%)	38,82±3,86	20,25±4,21	10,39±2,12	14±3,45	27±4,66	12±4,4	21±2,6	16±2,3
DQO Afl. (mg.L ⁻¹)	14634±1822,1	15907±1222	17307±656,2	21808±1435	23688±2726	27642±2673	22057±2497,2	21541±4219
DQO Efl. (mg.L ⁻¹)	8048±1579,7	12671±1016,2	15498±227	18675±1144	17307±1569	24446±3369,7	17441±2385,6	18121±1743,4

Figura 4.20: Remoção de DQO no R3.



4.3.3 Composição do biogás produzido no R3

O perfil de composição do biogás produzido pelo R3 está apresentado na Figura 4.21. De acordo com os dados obtidos o hidrogênio não foi produzido em todas as fases de operação. Durante a primeira fase o hidrogênio compôs 45% do biogás gerado, entretanto a partir da fase 2 até a 4 foi observado apenas CO₂ como componente do biogás. Nas fases subsequentes o hidrogênio voltou a ser produzido, porém em baixas concentrações. Durante as fases 5, 6 e 7 o biogás foi composto por hidrogênio em 3,7, 6,3 e 12% respectivamente. Na última fase verificada sob TDH de 0,5 h o hidrogênio voltou a apresentar valor expressivo, contabilizando 43% do biogás produzido.



Pelos valores obtidos fica claro que tanto as razões SQ:GB quanto os diferentes TDH aplicados tiveram efeito sobre a produção de hidrogênio. A alta relação SQ:GB aplicada na primeira fase, bem como a redução no TDH aplicada nas 3 últimas foi capaz de influenciar diretamente na produção de hidrogênio, favorecendo rotas propícias para geração do biogás. Em outra via, em TDH de 8 h e relações SQ:GB próximas de 1 possivelmente favoreceram rotas responsáveis pela não produção e até mesmo consumo de hidrogênio. Rosales-Colunga et al. (2012) também observaram a influência do substrato na produção de hidrogênio ao obter rendimentos distintos de acordo com a fonte de carbono empregada. Apesar de apresentar menores conversões a galactose forneceu melhores condições para produção de hidrogênio quando comparado com a glicose e lactose.

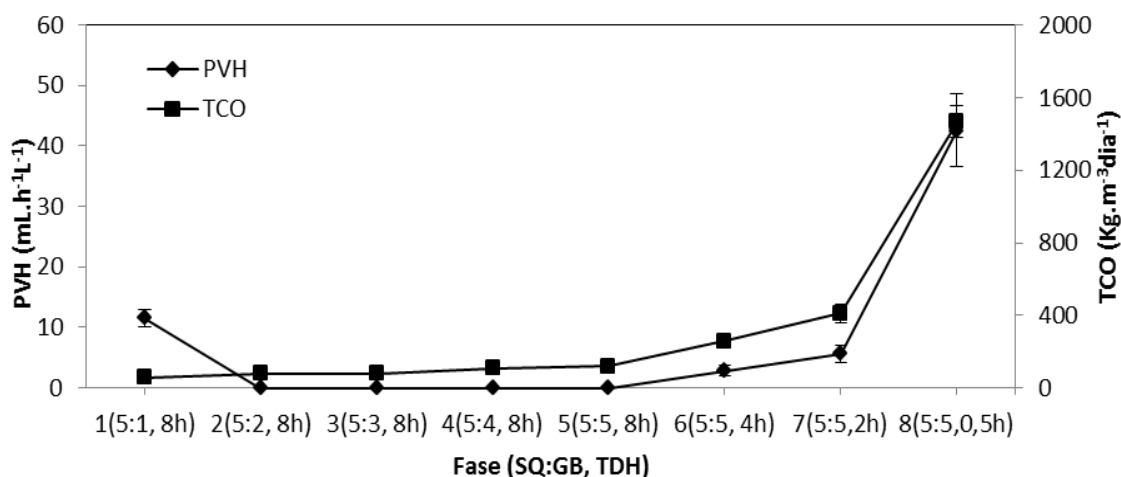
Dareoti e Kornaros (2014) observaram biogás com menor conteúdo de hidrogênio quando comparado com o R3, porém a produção de hidrogênio foi observada durante toda operação do reator. Os autores avaliaram a produção de hidrogênio por cultura mista durante a co-fermentação de efluente da fabricação de azeite (Olive Mill Wastewater-OMW) esterco líquido e soro de queijo na proporção 55/40/5 (v/v/v). Utilizando reator CSTR operado sob TDH decrescente (5, 3, 2, 1 e 0,75 dias) e concentração afluyente fixa em 95gDQO.L⁻¹ o máximo conteúdo de biogás 34,45% foi verificado durante o menor TDH aplicado.

Daeroti e Kornaros (2015) também observaram conteúdo de hidrogênio no biogás com valores inferiores aos observados durante a operação do R3. Neste trabalho os autores verificaram a co-fermentação de sorgo hidrolisado por tratamento alcalino, soro de queijo e esterco líquido na proporção 55/45/5 (v/v/v) e concentração total equivalente a 95g DQO.L⁻¹. O experimento foi conduzido em reator CSTR operado sob os TDH de 5, 3, 2, 1, 0,75 e 0,5 dias e como inóculo foi utilizado cultura mista mantida a 37°C. O maior conteúdo de hidrogênio, 33,42%, foi observado em TDH de 0,75 dias.

4.3.4 Produção volumétrica de hidrogênio

Na Figura 4.22 estão apresentados os valores de produção volumétrica de hidrogênio em função da TCO aplicada durante a operação do R3. A PVH obtida durante a co-fermentação de soro de queijo e glicerol bruto condiz com as frações de hidrogênio observadas no biogás. Na primeira fase de operação a PVH foi de 11,5 mL.h⁻¹.L⁻¹, porém nas fases 2, 3 e 4 o biogás passou a ser composto apenas por CO₂, em resposta disso não foi detectada produção volumétrica de hidrogênio. Da fase 5 em diante a concentração de hidrogênio no biogás se comportou de maneira ascendente, frente a isto a PVH seguiu perfil semelhante. Para as fases 5, 6 e 7 as produções volumétricas foram respectivamente 0,89, 2,9 e 5,7 mL.h⁻¹.L⁻¹. Durante a última fase, sob TDH de 0,5 h, foi observada maior PVH para o R3, totalizando 42,5 mL.h⁻¹.L⁻¹. Possivelmente a maior PVH obtida ocorreu em função da maior TCO aplicada (1467 Kg.m⁻³.d⁻¹) o que significa maior quantidade de matéria orgânica disponível para conversão e geração de metabólitos incluindo biogás.

Figura 4.22: Produtividade volumétrica de hidrogênio do R3



Ito et al. (2005) verificaram a produção de hidrogênio a partir de glicerol bruto em reator de leito empacotado com cerâmica de alta porosidade. Neste trabalho os autores verificaram PVH máxima de 0,63 mmolH₂h⁻¹.L⁻¹ a 37°C, o que corresponde a 16 mL.h⁻¹.L⁻¹ considerando a pressão de 1 atm. Davila-Vazquez et al. (2009) utilizaram soro de queijo como substrato em CSTR e verificaram o aumento da PVH com a redução do TDH de 10 até 6 h. Após a redução do TDH os autores obtiveram produtividade máxima de 0,583 LH₂.h⁻¹.L⁻¹. Porém, ao reduzir o TDH para 4 h houve queda drástica nos valores de produtividade chegando a valores menores que 0,1 L.h⁻¹.L⁻¹. Segundo os autores, esta queda ocorreu pelo fato do CSTR sofrer lavagem de células em baixos TDH.

Dareoti e Kornaros (2014) também observaram PVH superior à máxima obtida no R3. Os autores obtiveram 1,72 LH₂.L⁻¹.d⁻¹ em TDH de 0,75 dias aplicado ao CSTR alimentado com mistura de efluente da fabricação de azeite (55%), soro de queijo (45%) e esterco líquido (5%). Apesar das maiores produções volumétricas, neste trabalho os reatores operaram com TDH superiores aos aplicados no R1 e maiores concentrações de substrato, cerca de 95 g DQO.L⁻¹.

Ao trabalharem com diferentes substratos (glicose, lactose e galactose) para produção de hidrogênio Rosales-Colunga et al. (2012) observaram maior PVH, 24,45 mL.h⁻¹.L⁻¹ durante a co-fermentação de glicose (7,5g.L⁻¹) e galactose (7,5g.L⁻¹). Mesmo utilizando fonte de carbono com concentração superior às utilizadas no R3, a máxima PVH obtida pelos autores foi inferior aos 42,5 mLH₂.h⁻¹.L⁻¹ observados no presente trabalho.

Durante a avaliação de diferentes inóculos e substratos para produção de hidrogênio Rosa, Santos e Silva (2014) obtiveram valores de PVH superiores a máxima obtida no R3 ($1,02 \text{ L.d}^{-1}.\text{L}^{-1}$). Para tal foram utilizados RALF mesofílicos com temperatura mantida em 30°C e TDH fixo em 6 h durante toda operação. A máxima produtividade volumétrica, $2,64 \text{ L.d}^{-1}.\text{L}^{-1}$, foi obtida em RALF inoculado com lodo utilizado para tratamento de água residuária de abatedouro de aves e como fonte de carbono foi aplicado soro de queijo em pó na concentração equivalente a 5 gDQO.L^{-1} . Durante a co-fermentação de soro de queijo em pó (67%) e glicose (33%) a maior PVH também foi obtida por este reator, contabilizando $2,40 \text{ L.d}^{-1}.\text{L}^{-1}$.

4.3.5 Metabólitos solúveis produzidos

Na Figura 4.23 e Tabela 4.14 estão apresentados os principais metabólitos solúveis produzidos durante a operação do R3, dentre eles foram verificados: etanol, 1,3-propanodiol e os ácidos: Acético, propiônico, láctico, fórmico, butírico, isobutírico e valérico. Os principais compostos verificados foram os ácidos: propiônico (máx. 69%) láctico (máx. 64%), butírico (máx. 36%) e acético (máx. 18%).

Na primeira fase foi verificada predominância de ácido láctico (64%) que provavelmente foi obtido pela via homofermentativa já que foram observadas baixas concentrações de ácido acético (6%). Com a redução da relação SQ:GB para 5:2, 5:3 e posteriormente 5:4 foi verificada a predominância de ácido propiônico, contabilizando de 62 a 69% dos metabólitos solúveis. Nestas fases também foi favorecida a produção de 1,3 propanodiol sendo encontrado de 12 a 14%. Estes dois metabólitos produzidos geralmente são relacionados ao baixo rendimento de hidrogênio. O 1,3-propanodiol obtido a partir do glicerol é produzido pela via reductiva, via esta concorrente à via oxidativa, responsável pela produção hidrogênio.

O aumento da concentração de glicerol certamente favoreceu a via dos ácidos carboxílicos, rota caracterizada por altas concentrações de propionato e baixos níveis de acetato, esta afirmação é válida, pois nas fases 2, 3 e 4 o ácido propiônico compôs de 62 a 69% enquanto o ácido acético de 7 a 12%. O máximo rendimento de ácido propiônico, $0,99 \text{ g.g}^{-1}_{\text{substrato}}$, foi obtido na terceira fase de operação em que foi aplicada razão SQ:GB 5:3 e TDH de 8 h.

Wang e Yang (2013) verificaram fenômeno semelhante ao observado no R3, ao aumentarem a concentração de glicerol durante a co-fermentação com a glicose foi

observado aumento na produção de ácido propiônico, sendo o máximo rendimento 0,65 g.g⁻¹ obtido sob razão glicerol:glicose equivalente a 4. Neste estudo os autores realizaram o cultivo em batelada mantida a 32°C, concentração inicial de substrato fixada em 30g.L⁻¹ e como inóculo células de *Propionibacterium freudenreichii* subespécie *shermanii*.

Kosmider et al. (2010) obteve rendimento de ácido propiônico no valor de 0,63g.g⁻¹_{substrato}, neste trabalho os autores utilizaram como inóculo a espécie *Propionibacterium freudenreichii* e como substrato soro de queijo e glicerol puro. Zhang e Yang (2009) alcançaram rendimento máximo de 0,71 g.g⁻¹_{substrato} utilizando cultura de *Propionibacterium acidipropionici* para produção de ácido propiônico a partir de glicerol puro. O rendimento máximo de ácido propiônico de 0,79 g.g⁻¹_{substrato} foi verificado por Zhu et al. (2010) utilizando glicerol puro como fonte de carbono para espécie *Propionibacterium acidipropionici*.

Apesar de não trabalhar com condições operacionais como temperatura, meio de cultivo e cultura específicas para produção de ácido propiônico, o R3 alcançou rendimentos superiores aos trabalhos direcionados à obtenção deste ácido.

Figura 4.23: Metabólitos solúveis produzidos em cada fase de operação do R3

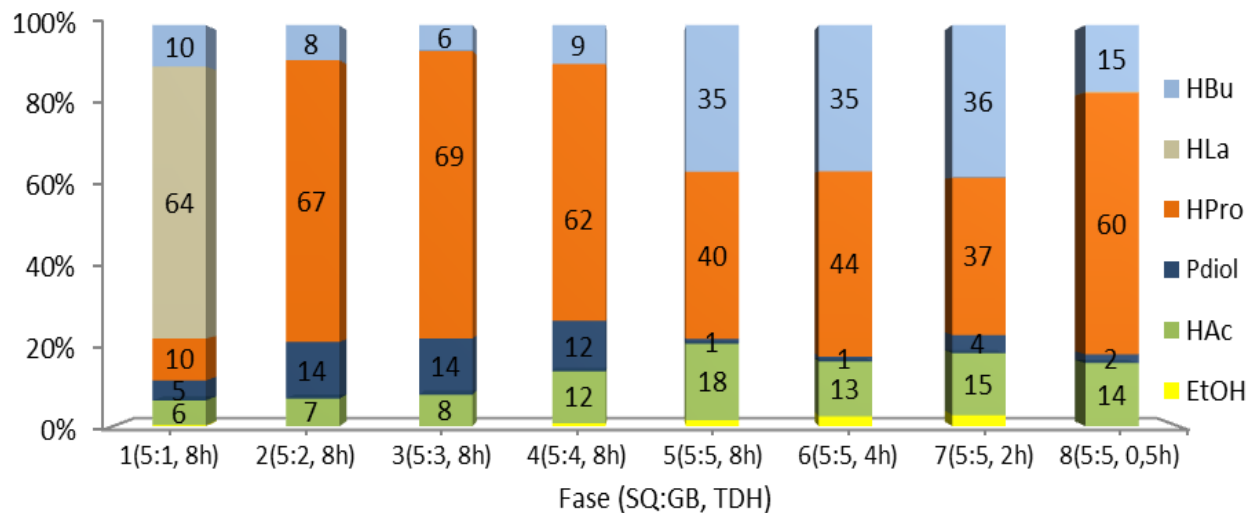


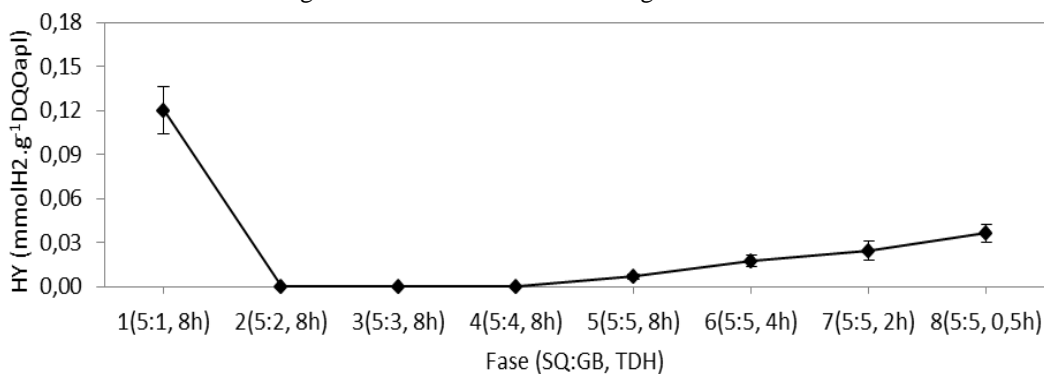
Tabela 4.14- Ácidos orgânicos e álcoois verificados no EGSB alimentado com soro de queijo e glicerol.

Ácidos orgânicos e álcoois detectados (mg.L ⁻¹) %																			
TDH (h)	SQ/GB	EtOH	%	HAc	%	1,3-Pdiol	%	HPr	%	HLa	%	HFo	%	HBu	%	HVa	%	HIsBu	%
8	5/1	3,8± 8,5	0,2	113,8±21,4	5,6	118±24,9	4,6	297,5±23,9	11,9	1884±190,2	61,8	70,4±8,7	4,5	307,8±28,7	10,3	0	0,0	31±2,8	1,0
	5/2	0	0,0	463,3±54,5	6,5	1213,3±125,8	13,5	5867,5±387	67,2	0	0	0	0	864,6±97,5	8,3	490,2±36,9	4,1	38,7±8,3	0,4
	5/3	0	0,0	699,0±37,5	7,5	1597±143,8	13,6	7915,6±786	69,3	0	0	0	0	841,7±71	6,2	457,5±71	2,9	66,6±5,5	0,5
	5/4	62,5±9,5	0,7	1378,6±206,3	12,5	1707,5±77,6	12,2	8418,8±587	61,7	0	0	0	0	1510±181,3	9,3	521,5±46,4	2,8	145,6±20,2	0,9
	5/5	78,8±2,9	1,5	1285,8±121,2	18,3	103,8±26,9	1,2	3478±415	40,0	0	0	0	0	3621±246,9	35,0	319,2±46,5	2,7	143,6±12,2	1,4
4	5/5	132±22,6	2,4	956±55,8	13,2	109±28,8	1,2	3983±436	44,4	0	0	0	0	3737,6±238	35,1	286,4±19,1	2,3	158,6±32,6	1,5
2	5/5	117,8±2,2	2,6	858,6±63,2	14,7	321±56	4,3	2686,8±246	37,4	0	0	0	0	3098,4±405	36,3	248,3±29,5	2,5	179,3±18,3	2,1
0,5	5/5	0	0,0	330,5±37,5	14,9	59,2±17,7	2,1	1690,5±205	61,6	0	0,2	0	1,0	419,8±187,4	12,9	209,3±36,7	5,5	58,6±8,6	1,8

4.3.6 Seletividade (SL) Rendimento de hidrogênio para o R3.

Os valores de rendimento de hidrogênio para o R3 estão apresentados na Figura 4.24. O maior rendimento médio, $0,12 \text{ mmolH}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{DQO}_{\text{aplicada}}$, foi observado na primeira fase. Durante as fases 2, 3 e 4 não foram detectados rendimento de hidrogênio, possivelmente em virtude do favorecimento da produção de ácido propiônico. A partir da fase 5 o HY voltou a ser contabilizado e apresentou perfil ascendente, nesta fase o rendimento obtido foi de $0,01 \text{ mmolH}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{DQO}_{\text{aplicada}}$. Durante a fase 6 o rendimento alcançou $0,018 \text{ mmolH}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{DQO}_{\text{aplicada}}$, com a redução do TDH e consequente aumento da carga orgânica o HY aumentou para $0,025 \text{ mmolH}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{DQO}_{\text{aplicada}}$. Na ultima fase sob TDH de 0,5 h foi observado novo aumento no rendimento médio de hidrogênio, contabilizando $0,036 \text{ mmolH}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{DQO}_{\text{aplicada}}$.

Figura 4.24: Rendimento de hidrogênio do R3.



A interrupção da produção de hidrogênio percebida nas fases 2, 3 e 4 possivelmente ocorreu devido à alta produção de ácido propiônico, uma vez que para produção deste ácido há o consumo de 2 mols de hidrogênio, conforme a Equação 12.



O rendimento novamente verificado a partir da fase 5 ocorreu devido a queda nas concentrações de ácido propiônico e aumento de ácido butírico, levando a crer que a rota do butirato também foi favorecida. Apesar de ser observada novamente a produção de hidrogênio a partir da fase 5, os rendimentos ficaram abaixo do valor médio observado na fase 1. Este fato pode ser justificado pelas diferentes condições de substrato e TDH aplicados, que podem ter interferido no fluxo metabólico contribuindo para produção concomitante de ácido propiônico e hidrogênio a partir de rotas mistas.

Rosa, Santos e Silva (2014) verificaram a produção de hidrogênio em RALF a partir da co-fermentação de soro de queijo e glicose em diferentes proporções, o maior rendimento obtido foi $1.7 \text{ mmolH}_2.\text{g}^{-1}\text{DQO}$ porém este valor foi obtido empregando somente soro de queijo como substrato. Em co-fermentação o maior rendimento obtido foi $1,6 \text{ mmolH}_2.\text{g}^{-1}\text{DQO}$ com as concentrações de soro de queijo e glicose fixada em 67 e 33% respectivamente. Marone et al. (2014) avaliaram produção de hidrogênio através da co-fermentação de diferentes substratos, dentre eles o glicerol e o soro de queijo nas proporções 67 e 33% respectivamente ou com concentrações inversas 33% de soro de queijo e 67% de glicerol. O rendimento verificado na condição em que o soro de queijo estava em maior concentração foi $95 \text{ mL H}_2.\text{gSV}_{\text{adicionados}}$, enquanto que na condição em que o glicerol teve maior concentração o rendimento foi menor, totalizando $72 \text{ mL H}_2.\text{gSV}_{\text{adicionados}}$.

Ainda no âmbito da co-fermentação de resíduos visando a produção de hidrogênio, Wang et al. (2013) utilizaram vinhaça de mandioca e lodo ativado como substrato e alcançaram rendimento máximo de $57.8 \text{ ml.g}^{-1}\text{SV}_{\text{adicionados}}$, 28% maior que o verificado na fermentação contendo somente vinhaça de mandioca. Os autores também observaram que os resultados obtidos em co-fermentação foram superiores aos experimentos com substratos simples. O que agrega ainda mais valor a estratégia de co-fermentação durante a obtenção de bioenergia e metabólitos com aplicação industrial.

A Figura 4.25 apresenta o rendimento de hidrogênio e de ácido propiônico (PropY) ambos em função da DQO aplicada. Já a Figura 4.26 mostra a influência do TDH e das relações SQ:GB sobre a seletividade de hidrogênio e ácido propiônico. Baseado nos dados de rendimento e seletividade fica claro que a produção de hidrogênio ocorre de modo inversamente proporcional à produção de ácido propiônico. De acordo com os dados obtidos foi possível perceber que em TDH fixo em 8 h a produção de hidrogênio foi favorecida nas relações SQ:GB , 5:1 e 5:5, enquanto que para as relações 5:2, 5:3 e 5:4 os sistema apresentou alta produção apenas ácido propiônico. Já na etapa em que o TDH variou de forma decrescente ocorreu produção simultânea de ácido propiônico e hidrogênio, porém em concentrações menores.

Figura 4.25 - HY e PropY durante a operação do R3

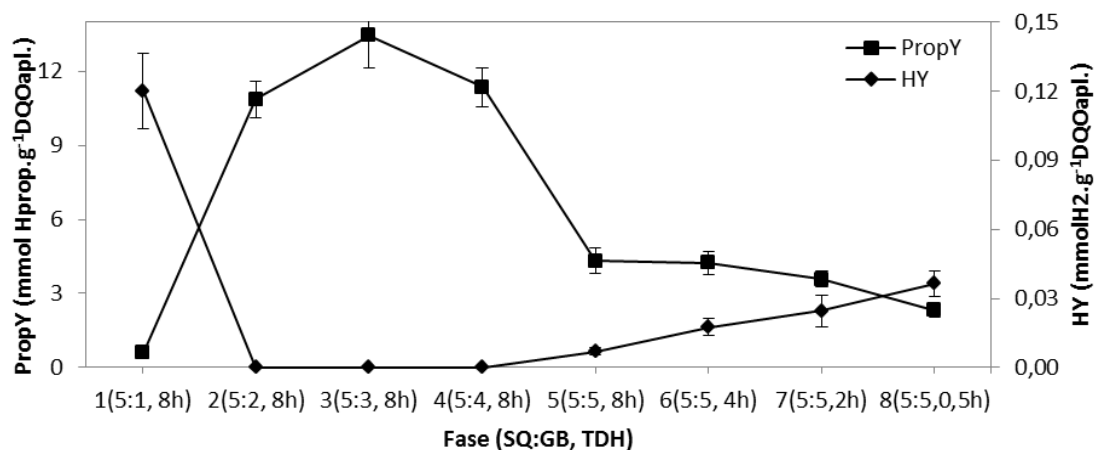
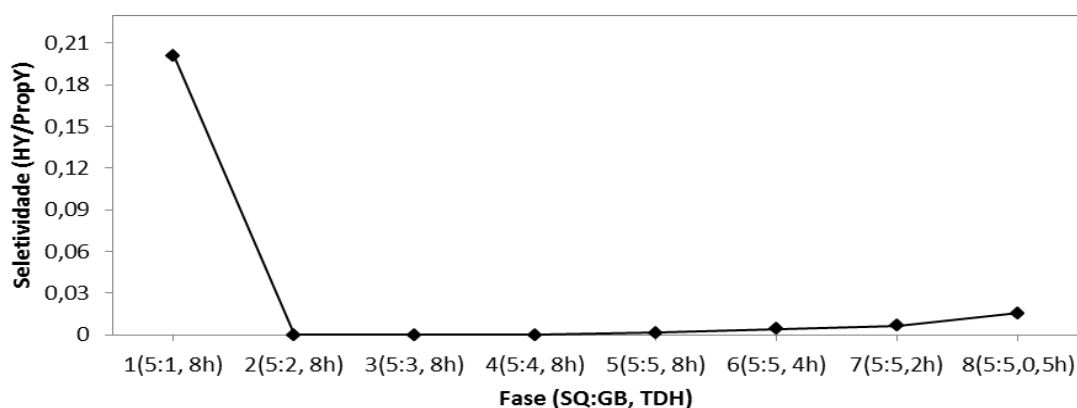


Figura 4.26- Efeito da relação SQ:GB e TDH na seletividade para o R3.



4.4 pH e sólidos suspensos

Para o R3 o pH do afluente apresentou valores entre 8,70 e 9 sendo que este valor foi alcançado após adição de NaOH e bicarbonato de sódio (0,8g.L⁻¹) que agiu como auxiliar tamponante. Já o pH médio do afluente para as oito fases analisadas apresentou valores entre 3,7 até 4,3. Para o R1 os valores médios do pH afluente foram constantes em 4,0. Enquanto que os valores do pH efluente variaram de 4,5 até 5,5.

Para o R2 os valores médios de pH afluente se mantiveram estáveis em 8,7 enquanto os valores do pH efluente variaram entre 3,6 e 3,9.

As Figuras 4.27, 4.28 e 4.29 apresentam os valores médios para os reatores R1, R2 e R3 respectivamente.

Figura 4.27: pH afluente e efluente do R1

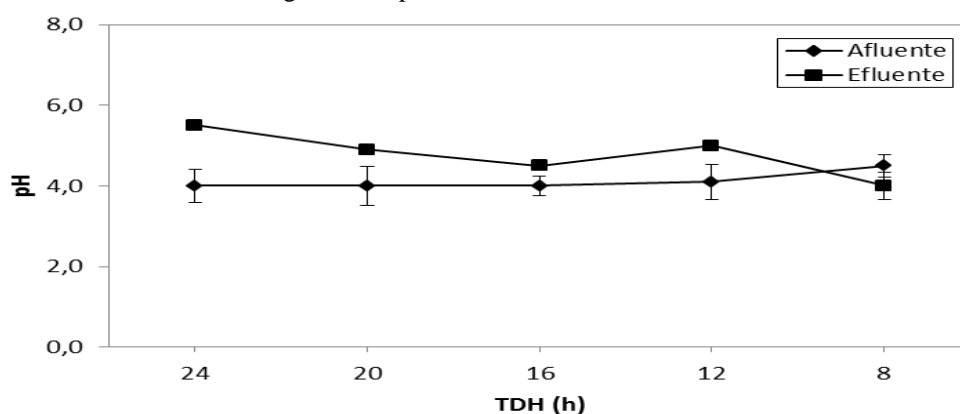


Figura 4.28: pH afluente e efluente do R2

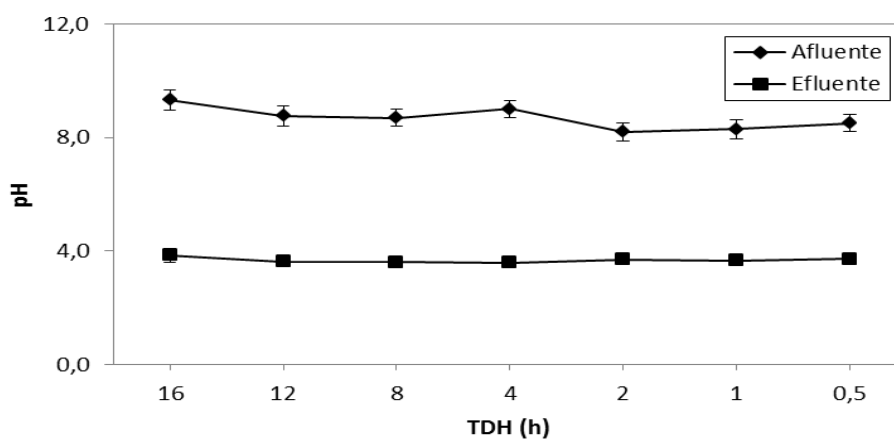
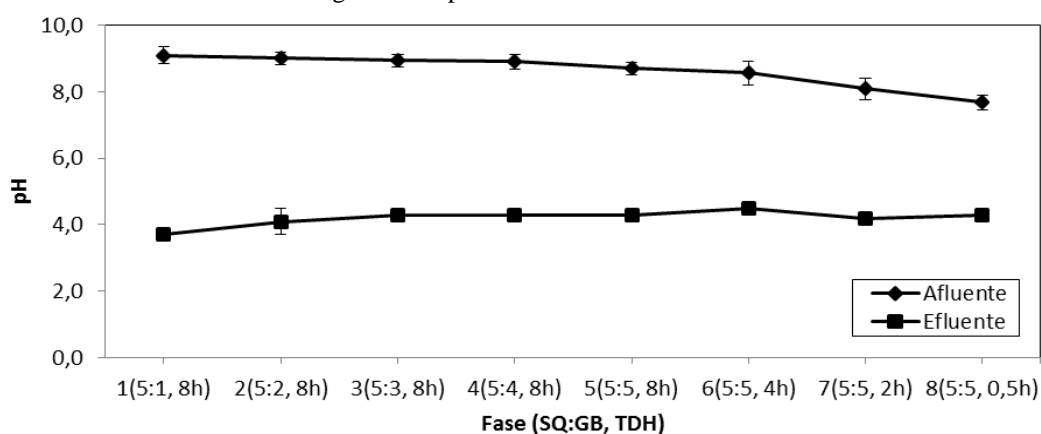


Figura 4.29: pH afluente e efluente do R3



A estratégia de operar o R1 com pH próximo de 4,0 objetivou também reduzir a possibilidade de ação das bactérias redutoras de sulfato. Hwang et al. (2009a) afirmam que pH acima de 5,5 pode favorecer a atividade dessas bactérias responsáveis por baixos rendimento de hidrogênio. Os autores obtiveram recuperação de sulfato próxima a 99% quando trabalharam em baixas faixas de pH 4,0-5,0 em quimiostato operado sob

TDH de 24 h. Ainda sobre o R1, percebe-se que o pH de entrada é ligeiramente menor que o do efluente, tal fato também foi observado por Kongjian e Angelidaki (2010), os autores empregaram palha de trigo hidrolisada em reator CSTR e UASB para produção de hidrogênio, em ambos reatores o pH do afluente foi controlado em 4,9, entretanto os autores observaram que o sistema se estabilizava em valores de pH entre 5,0 e 5,3.

Na Tabela 4.15 estão apresentados os valores médios de sólido suspensos voláteis (SSV) ao longo das fases operacionais dos três reatores. Para o R1 os SSV variaram de 65,8 até 206,4 mg.L⁻¹, para o R2 a variação foi de 104,8 até 187,9 mg.L⁻¹ e para o R3 os valores variaram de 971 até 2530 mg.L⁻¹.

Tabela 4.15-Valores médios de sólidos suspensos voláteis (SSV) ao longo das fases operacionais

Reator	SSV (mg.L ⁻¹)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
R1	107,1	65,8	128	206,4	142,4	-	-	-
R2	119,5	104,8	118,5	137,6	187,9	154,5	169,1	-
R3	971	1014	1330	1542,5	2530	2200	1735	1997,7

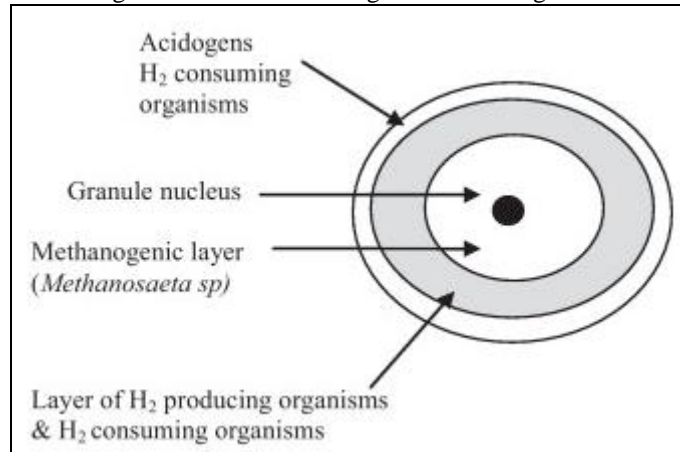
4.5 Microscopia Eletrônica de varredura

As análises de microscopia eletrônica de varredura para identificação e confirmação da adesão microbiológica aos grânulos deve ser feita somente em amostras imediatamente retiradas do reator, não sendo possível executar está análise em grânulos previamente congelados. Por este motivo somente as amostras do R2 e R3 foram submetidas à técnica de MEV, pois no período de execução das análises microscópicas a operação do R1 já havia sido encerrada.

Analisando as Figuras 4.31 e 4.32 percebe-se que o método para adesão da biomassa aos respectivos suportes teve êxito, pois foi observada densa presença de microrganismos aderidos aos materiais suporte. Tanto para o R2 quanto para o R3 a forma bacilo foi verificada em predominância, morfologia esta características de gêneros como: Klebsiella, Clostridium e Thermoanaerobacterium.

De acordo com Abbasi e Abbasi (2012), quando *in natura*, os grânulos utilizados como suporte para o R3 possuem estrutura semelhante a apresentado pela Figura 4.30. Através da Figura 4.32b percebe-se que onde se localizavam as arqueias metanogênicas agora se encontra um espaço vazio, sugerindo assim eficiência do tratamento adotado para eliminação das mesmas.

Figura 4.30- Estrutura do grânulo metanogênico.



Fonte: Abbasi e Abbasi (2012)

Figura 4.31- MEV das amostras do R2 em TDH de 0,5 h a) aumento de 20000x b) aumento de 15000x.

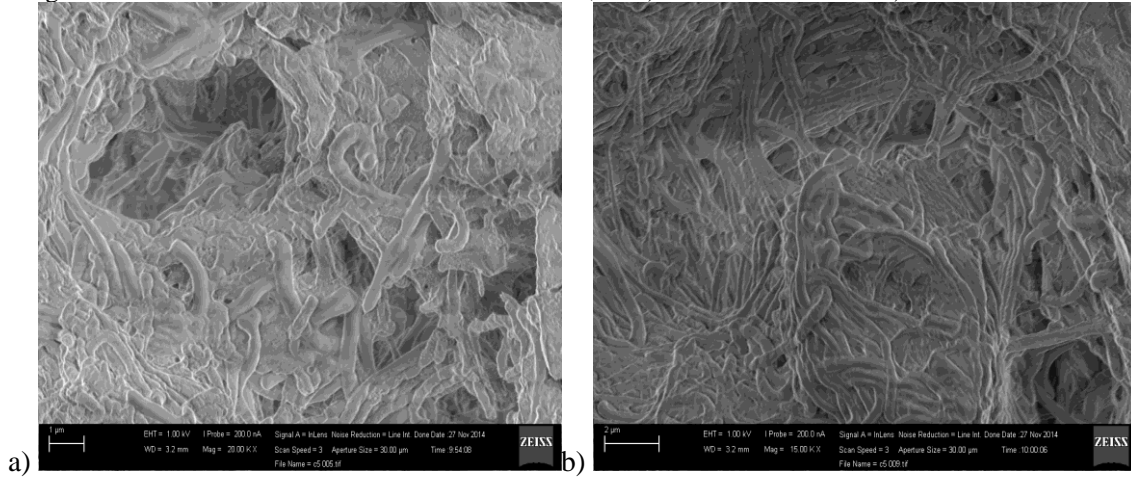
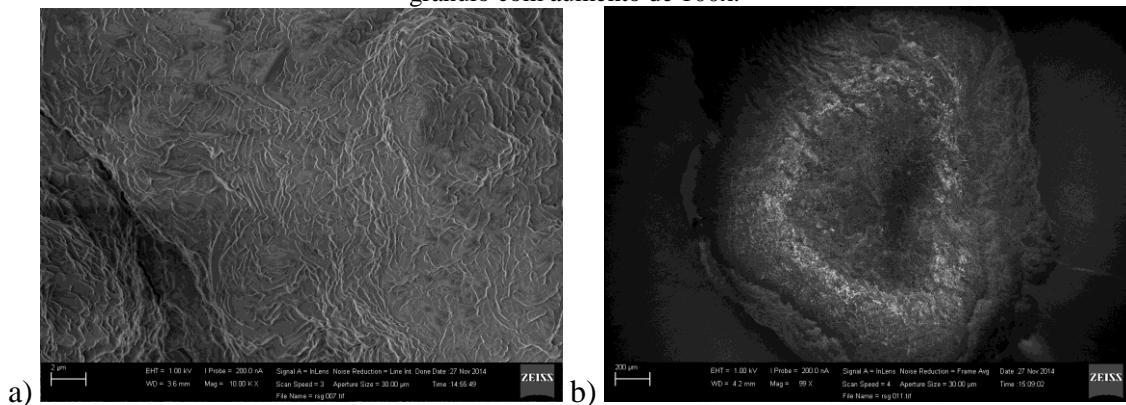


Figura 4.32- MEV das amostras do R3 sob TDH de 0,5 h a) aumento de 10000x b) corte transversal do grânulo com aumento de 100x.



4.6 Análise comparativa e avaliação energética

Neste tópico foram feitas comparações entre os reatores nos quesitos de rendimento de hidrogênio em relação a DQO aplicada e a disponibilidade energética levando em consideração a produtividade de hidrogênio e etanol.

A análise comparativa dos rendimentos obtidos pelos três reatores revelou melhor resultado para o R1, contabilizando $2,02 \text{ mmolH}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{DQO}$ obtido em TDH de 8 h, seguido do R2 com rendimento de $1,55 \text{ mmolH}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{DQO}$, observado em TDH de 16 h. Para o R3 o maior rendimento verificado foi $0,120 \text{ mmolH}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{DQO}$ obtido na primeira fase de operação. A Tabela 4.16 apresenta uma comparação com a literatura em relação aos trabalhos empregando hidrolisado de matriz celulósica ou mistura de xilose e glicose como substrato, já a Tabela 4.17 apresenta uma comparação entre os rendimentos em $\text{mol H}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{DQO}$ englobando os três reatores avaliados e trabalhos encontrados na literatura em que foram utilizadas fontes de carbono complexas empregando co-substrato ou não.

Para executar a avaliação energética os cálculos foram feitos seguindo o modelo proposto por Han et al. (2012), adotando poder calorífico do hidrogênio de $286 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ e para o etanol $1366 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$. Energeticamente o R2 se mostrou superior, pois teve produção concomitante de hidrogênio e etanol em TDH reduzido, o que contribuiu também para maior vazão de etanol produzido. Para o R2 foi verificado $47 \text{ kJ} \cdot \text{h}^{-1} \text{L}^{-1}$ durante o TDH de 0,5 h. O R1 alcançou produtividade de $7,4 \text{ kJ} \cdot \text{h}^{-1} \text{L}^{-1}$ em TDH de 8 h e para o R3 foi observado $5,1 \text{ kJ} \cdot \text{h}^{-1} \text{L}^{-1}$ durante o TDH de 2 h.

Tabela 4.16: Comparação entre os valores de HY obtidos no R1, R2 com a literatura.

Substrato	Agente hidrolítico	Reator	TDH (h)	T (°C)	Máximo HY obtido	Referência
Xilose e glicose	-	Batelada	-	60	2,37 molH ₂ .mol ⁻¹ açúcar	Ren et al. (2008)
Xilose e glicose	-	Batelada	-	37	2,75 molH ₂ .mol ⁻¹ glicose	Chaganti, Kim e Lalman (2012)
Xilose e glicose	-	Batelada	-	37	2,01 mol H ₂ .mol ⁻¹ açúcar	Xu et al. (2010)
Xilose e glicose	-	Batelada	24	70	0,2mol H ₂ . mol ⁻¹ hexose	Chenxi et al. (2013)
Xilose e glicose	-	UASB	12	70	0,58 molH ₂ .mol ⁻¹ hexose	Zhao, Lu e Wang (2013)
Bagaço da cana-de-açúcar	Clostridium TCW1	Batelada	-	37	6,24mmol H ₂ .g ⁻¹ substrato	Lo et al. (2009a)
Palha aveia	HCl 2%	Filtro biológico	24	30	2.9 molH ₂ .mol ⁻¹ glicose	Arriaga et al. (2011)
Palha de arroz/resíduo de cozinha	H ₂ SO ₄ 55%	CSTR	4	37	0,69 molH ₂ .mol ⁻¹ açúcar total	Liu et al. (2013)
CMC	Cellulomonas uda E3-01	Batelada	-	37	4,79 mmolH ₂ .g ⁻¹ açúcar redutor	Lo et al. (2009b)
Talo de milho	Enzima	Batelada sequencial	12	60	1,9molH ₂ .mmol ⁻¹ substrato	Zhao et al. (2014)
Bagaço	H ₂ SO ₄ 0,5%	Batelada	-	37	1.73 mol H ₂ .mol ⁻¹ açúcar total	Pattra et al. (2008)
Palha de milho	H ₂ SO ₄ 1.69%	Batelada	-	60	2.24 mol H ₂ mol ⁻¹ sugar	Cao et al. (2009)
Celulose microcristalina	H ₂ SO ₄ 15%	RALF	8	55	1,1molH ₂ .mol ⁻¹ glicose	Este estudo
Xilose e glicose	-	RALF	16	55	0,401molH ₂ .molglieq ⁻¹	Este estudo

Tabela 4.17- Comparação dos rendimentos em $\text{mmolH}_2.\text{g}^{-1}\text{DQO}$ entre o R1, R2, e R3 com a literatura.

Substrato	Reator	TDH (h)	T (°C)	Máximo HY obtido $\text{mmolH}_2.\text{gDQO}$	Referência
Soro de queijo	RALF	6	30	1,9	Rosa, Santos e Silva (2014)
Glicose e manipueira	RALF	10	30	1,0	Rosa et al. (2014)
vinhaça	RALF	6	55	2,23	Santos et al. (2014)
Talo de milho e resíduo de cozinha	CSTR	96	35	2,0	Li et al. (2008)
Resíduo vegetal de cozinha	CSTR	96	55	1,7	Lee et al. (2010)
Soro de queijo	CSTR	24	55	9,0	Azbar et al. (2009)
Efluente do Processamento de maçã	Batelada	-	23	4,08	Van Ginkel et al. (2005)
Esgoto doméstico	Batelada	-	25	6,01	Fernandes et al. (2010)
Efluente do processamento de azeite	Batelada	-	37	1,30	Chong et al. (2009)
Água do processamento de soro de queijo	CSTR	24	35-38	3,21	Yang et al. (2007)
Ácido tereftálico	CSTR	6	35	19,29	Zhu et al. (2010)
Resíduo alimentar	Batelada	-	55	0,48	Lee et al. (2008)
Celulose microcristalina	RALF	8	55	2,02	Este estudo
Xilose e glicose	RALF	16	55	1,55	Este estudo
Soro de queijo e glicerol bruto	EGSB	8	30	0,120	Este estudo

5 CONCLUSÕES

O presente trabalho demonstrou a aplicabilidade dos reatores RALF e EGSB bem como dos resíduos e subprodutos agroindustriais na obtenção de metabólitos com valor agregado.

Em relação ao RALF termofílico alimentado com hidrolisado celulósico (R1) foi observada a boa adaptação da biomassa ao substrato empregado, o que forneceu altas conversões de carboidratos. O biogás produzido apresentou maior concentração de hidrogênio em quase toda operação, com exceção da fase 4 (TDH 12 h). Os principais metabólitos solúveis produzidos foram ácido acético, durante as 4 primeiras fases e etanol apresentando maior concentração em TDH de 8 h. De acordo com os dados obtidos sobre a produção de hidrogênio em TDH de 8 h foram obtidos os melhores resultados para PVH e HY, $115 \text{ mLH}_2\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$ e $1,11 \text{ mol H}_2\cdot\text{mol}^{-1}\text{glicose}_{\text{convertida}}$ respectivamente. Com a estratégia de controle de pH em valores menores que 5, não foi detectada ação de bactérias redutoras de sulfato, fato confirmado com a recuperação desse íon em torno de 83%.

No RALF alimentado com xilose ($2\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e glicose ($2\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) foi demonstrada capacidade de assimilação dos dois açúcares empregados, porém a glicose apresentou conversões superiores, fato este também observado na literatura. O biogás produzido no R2 apresentou maior fração de hidrogênio em todas as fases observadas, ficando entre 55 e 65% do biogás. No R2 foi observada produção de hidrogênio e etanol em diferentes momentos. TDH mais elevados favoreceram a produção de hidrogênio enquanto TDH reduzidos proporcionaram maiores concentrações de etanol. O maior rendimento de hidrogênio, $0,401\text{molH}_2\cdot\text{mol}^{-1}\text{glieq}$, foi observado em TDH de 16 h, enquanto que o maior rendimento de etanol, $0,28\text{molEtOH}\cdot\text{mol}^{-1}\text{glieq}$, foi observado em TDH de 0,5 h. A maior PVH foi observada em TDH de 0,5 h, contabilizando $279,9 \text{ mLH}_2\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$.

O EGSB alimentado com soro de queijo e glicerol bruto apresentou boa adaptação da biomassa a ambos os substrato, pois as conversões se mantiveram em torno de 95% tanto para o SQ quanto para o GB. Pelos resultados obtidos foi verificado que em TDH de 8 h e razão SQ:GB 5:1 forneceu o melhor rendimento de hidrogênio, $0,12 \text{ mmolH}_2\cdot\text{g}^{-1}\text{DQO}_{\text{aplicada}}$, porém sob as razões 5:2, 5:3 e 5:4 e TDH fixo em 8 h foi favorecida a produção de ácido propiônico em altas concentrações e cessada a produção

de hidrogênio. O maior rendimento de ácido propiônico verificado, $0,99 \text{ g.g}^{-1}_{\text{substrato}}$, foi obtido em razão SQ:GB 5:3. Mantida a razão SQ:GB 5:5 passando a operar com TDH decrescente foi observada produção concomitante de hidrogênio e ácido propiônico porém em baixas concentrações. O fato de o ácido propiônico compor até 69% dos metabólitos solúveis é vantajoso do ponto de vista processual, pois esta alta concentração reflete em menor custo para sua separação e concentração.

Ao comparar os rendimentos de hidrogênio em $\text{mmolH}_2.\text{g DQO}$ aplicada, foi observado maior valor para o RALF termofílico alimentado com hidrolisado celulósico, neste reator foi verificado rendimento de $2,02 \text{ mmolH}_2.\text{g}^{-1}\text{DQO}$ em TDH de 8 h. Em análise sobre eficiência energética o RALF termofílico operado em co-fermentação de xilose e glicose se sobressaiu frente aos outros reatores com $47 \text{ KJ.h}^{-1}\text{L}^{-1}$ obtidos em TDH de 0,5 h. Esta maior eficiência energética verificada no R2 deve-se ao fato de que somente neste reator ocorreu produtividade de etanol e hidrogênio em TDH reduzidos como de 1 e 0,5 h.

6 SUGESTÕES

Embasado nos resultados obtidos no presente trabalho, seguem as seguintes propostas para trabalhos futuros:

- Verificar a produção de hidrogênio a partir de matriz celulósica vegetal hidrolisada como: bagaço da cana-de-açúcar, aguapé e serragem.
- Investigar a possibilidade de co-fermentação de resíduos de setores com forte atividade industrial no país como: papel e celulose, sucroenergético e alimentos.
- Avaliar a possibilidade de aplicação de resíduos sólidos durante a produção de hidrogênio e metabólitos solúveis.
- Verificar os efeitos da salinidade tanto na seleção microbiana quanto no fluxo metabólico durante a produção de hidrogênio.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbasi T. e Abbasi S. A. Formation and impact of granules in fostering clean energy production and wastewater treatment in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16(3): 1696-1708, 2012.

Amorim C., E. L., A. R. Barros, M. H. Rissato Zamariolli Damianovic and E. L. Silva. Anaerobic fluidized bed reactor with expanded clay as support for hydrogen production through dark fermentation of glucose. *International Journal of Hydrogen Energy* 34(2): 783-790, 2009.

Andalib, M., E. Elbeshbishy, N. Mustafa, H. Hafez, G. Nakhla and J. Zhu. Performance of an anaerobic fluidized bed bioreactor (AnFBR) for digestion of primary municipal wastewater treatment biosolids and bioethanol thin stillage. *Renewable Energy* 71(0): 276-285, 2014.

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

Argun, H. and F. Kargi. Effects of sludge pre-treatment method on bio-hydrogen production by dark fermentation of waste ground wheat. *International Journal of Hydrogen Energy* 34(20): 8543-8548, 2009.

Arreola-Vargas, J., L. B. Celis, G. Buitrón, E. Razo-Flores and F. Alatrísté-Mondragón . Hydrogen production from acid and enzymatic oat straw hydrolysates in an anaerobic sequencing batch reactor: Performance and microbial population analysis. *International Journal of Hydrogen Energy* 38(32): 13884-13894, 2013.

Assawamongkholisiri, T., A. Reungsang and S. Pattra . Effect of acid, heat and combined acid-heat pretreatments of anaerobic sludge on hydrogen production by anaerobic mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy* 38(14): 6146-6153, 2013.

Azbar, N., F. T. Çetinkaya Dokgöz, T. Keskin, K. S. Korkmaz and H. M. Syed. Continuous fermentative hydrogen production from cheese whey wastewater under thermophilic anaerobic conditions. *International Journal of Hydrogen Energy* 34(17): 7441-7447, 2009.

Baghchehsaraee, B., G. Nakhla, D. Karamanev and A. Margaritis. Effect of extrinsic lactic acid on fermentative hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy* 34(6): 2573-2579, 2009.

Barros, A. R., E. L. Cavalcante de Amorim, C. M. Reis, G. M. Shida and E. L. Silva . Biohydrogen production in anaerobic fluidized bed reactors: Effect of support material and hydraulic retention time. *International Journal of Hydrogen Energy* 35(8): 3379-3388, 2010.

Barros, A. R. and E. L. Silva. Hydrogen and ethanol production in anaerobic fluidized bed reactors: Performance evaluation for three support materials under different operating conditions. *Biochemical Engineering Journal* 61(0): 59-65, 2012.

Bičáková, O. and P. Straka. Production of hydrogen from renewable resources and its effectiveness. *International Journal of Hydrogen Energy* 37(16): 11563-11578, 2012.

Bisaillon, A., J. Turcot and P. C. Hallenbeck. The effect of nutrient limitation on hydrogen production by batch cultures of *Escherichia coli*. *International Journal of Hydrogen Energy* 31(11): 1504-1508, 2006.

Bósio, M. Produção de hidrogênio e metabólitos em reator anaeróbico de leito fluidizado e em reator de leito granular expandido a partir de glicerol. São Carlos Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de São Carlos, 2104.

Cai, J., Q. Wu, G. Wang and C. Deng . Fermentative hydrogen production by a new mesophilic bacterium *Clostridium* sp. 6A-5 isolated from the sludge of a sugar mill. *Renewable Energy* 59(0): 202-209, 2013.

Carvalho, F., A. R. Prazeres and J. Rivas . Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. *Science of The Total Environment* 445–446(0): 385-396, 2013.

Chaganti, S. R., D.-H. Kim and J. A. Lalman. Impact of oleic acid on the fermentation of glucose and xylose mixtures to hydrogen and other byproducts. *Renewable Energy* 42(0): 60-65, 2012.

Chandra, R., H. Takeuchi and T. Hasegawa. Methane production from lignocellulosic agricultural crop wastes: A review in context to second generation of biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16(3): 1462-1476, 2012.

Chang, A. C. C., Y.-H. Tu, M.-H. Huang, C.-H. Lay and C.-Y. Lin. Hydrogen production by the anaerobic fermentation from acid hydrolyzed rice straw hydrolysate. *International Journal of Hydrogen Energy* 36(21): 14280-14288, 2012.

Chen, S.-D., K.-S. Lee, Y.-C. Lo, W.-M. Chen, J.-F. Wu, C.-Y. Lin and J.-S. Chang. Batch and continuous biohydrogen production from starch hydrolysate by *Clostridium* species. *International Journal of Hydrogen Energy* 33(7): 1803-1812, 2008.

Chenxi, Z., L. Wenjing, W. Hongtao and P. Xiangliang . Simultaneous hydrogen and ethanol production from a mixture of glucose and xylose using extreme thermophiles I: Effect of substrate and pH. *International Journal of Hydrogen Energy* 38(23): 9701-9706, 2013.

Chong, M.-L., R. A. Rahim, Y. Shirai and M. A. Hassan. Biohydrogen production by *Clostridium butyricum* EB6 from palm oil mill effluent. *International Journal of Hydrogen Energy* 34(2): 764-771, 2009.

Chookaew, T., S. O-Thong and P. Prasertsan. Fermentative production of hydrogen and soluble metabolites from crude glycerol of biodiesel plant by the newly isolated thermotolerant *Klebsiella pneumoniae* TR17. *International Journal of Hydrogen Energy* 37(18): 13314-13322, 2012.

Chookaew, T., S. O-Thong and P. Prasertsan . Biohydrogen production from crude glycerol by immobilized *Klebsiella* sp. TR17 in a UASB reactor and bacterial quantification under non-sterile conditions. *International Journal of Hydrogen Energy* 39(18): 9580-9587, 2014.

Chookaew, T., S. O-Thong and P. Prasertsan . Statistical optimization of medium components affecting simultaneous fermentative hydrogen and ethanol production from crude glycerol by thermotolerant *Klebsiella* sp. TR17. *International Journal of Hydrogen Energy* 39(2): 751-760, 2014.

Dareiotti, M. A. and M. Kornaros . Effect of hydraulic retention time (HRT) on the anaerobic co-digestion of agro-industrial wastes in a two-stage CSTR system. *Bioresource Technology* 167(0): 407-415, 2014.

da Silva, G. P., M. Mack and J. Contiero . Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advances* 27(1): 30-39, 2009.

Davila-Vazquez, G., A. de León-Rodríguez, F. Alatraste-Mondragón and E. Razo-Flores . The buffer composition impacts the hydrogen production and the microbial community composition in non-axenic cultures. *Biomass and Bioenergy* 35(7): 3174-3181, 2011.

Davila-Vazquez, G., C. B. Cota-Navarro, L. M. Rosales-Colunga, A. de León-Rodríguez and E. Razo-Flores. Continuous biohydrogen production using cheese whey: Improving the hydrogen production rate. *International Journal of Hydrogen Energy* 34(10): 4296-4304, 2009.

Davila-Vazquez, G., F. Alatraste-Mondragón, A. de León-Rodríguez and E. Razo-Flores . Fermentative hydrogen production in batch experiments using lactose, cheese whey and glucose: Influence of initial substrate concentration and pH. *International Journal of Hydrogen Energy* 33(19): 4989-4997, 2008.

Del Nery, V. Utilização de lodo anaeróbio imobilizado em gel no estudo da partida de reatores de fluxo ascendente com manta de lodo. São Carlos. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 1987.

Dinsdale, R. M., F. R. Hawkes and D. L. Hawkes . Anaerobic digestion of short chain organic acids in an expanded granular sludge bed reactor. *Water Research* 34(9): 2433-2438, 2000.

Dishisha, T., A. Stahl, S. Lundmark and R. Hatti-Kaul. An economical biorefinery process for propionic acid production from glycerol and potato juice using high cell density fermentation. *Bioresour Technol* 135: 504-512, 2013.

Djalma Nunes Ferraz Júnior, A., J. Wenzel, C. Etchebehere and M. Zaiat. Effect of organic loading rate on hydrogen production from sugarcane vinasse in thermophilic acidogenic packed bed reactors. *International Journal of Hydrogen Energy* 39(30): 16852-16862, 2014.

Dragone, G., S. I. Mussatto, J. B. Almeida e Silva and J. A. Teixeira . Optimal fermentation conditions for maximizing the ethanol production by *Kluyveromyces fragilis* from cheese whey powder. *Biomass and Bioenergy* 35(5): 1977-1982, 2011.

Dubois, M. et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

Erdei, B., B. Frankó, M. Galbe and G. Zacchi. Glucose and xylose co-fermentation of pretreated wheat straw using mutants of *S. cerevisiae* TMB3400. *Journal of Biotechnology* 164(1): 50-58, 2013.

Ergüder, T. H., U. Tezel, E. Güven and G. N. Demirer. Anaerobic biotransformation and methane generation potential of cheese whey in batch and UASB reactors. *Waste Management* 21(7): 643-650, 2001.

Fan, Y.-T., Y.-H. Zhang, S.-F. Zhang, H.-W. Hou and B.-Z. Ren . Efficient conversion of wheat straw wastes into biohydrogen gas by cow dung compost. *Bioresource Technology* 97(3): 500-505, 2006.

Fang, C., K. Boe and I. Angelidaki . Biogas production from potato-juice, a by-product from potato-starch processing, in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) and expanded granular sludge bed (EGSB) reactors. *Bioresource Technology* 102(10): 5734-5741, 2011.

Favaro, L., L. Alibardi, M. C. Lavagnolo, S. Casella and M. Basaglia . Effects of inoculum and indigenous microflora on hydrogen production from the organic fraction of municipal solid waste. *International Journal of Hydrogen Energy* 38(27): 11774-11779, 2013.

Ferchichi, M., E. Crabbe, G.-H. Gil, W. Hintz and A. Almadidy . Influence of initial pH on hydrogen production from cheese whey. *Journal of Biotechnology* 120(4): 402-409, 2005.

Fernandes, B. S., G. Peixoto, F. R. Albrecht, N. K. Saavedra del Aguila and M. Zaiat. Potential to produce biohydrogen from various wastewaters. *Energy for Sustainable Development* 14(2): 143-148, 2010.

Ferreira Rosa, P. R., S. C. Santos and E. L. Silva . Different ratios of carbon sources in the fermentation of cheese whey and glucose as substrates for hydrogen and ethanol production in continuous reactors. *International Journal of Hydrogen Energy* 39(3): 1288-1296, 2014.

Gadow, S. I., H. Jiang, T. Hojo and Y.-Y. Li . "Cellulosic hydrogen production and microbial community characterization in hyper-thermophilic continuous bioreactor." *International Journal of Hydrogen Energy* 38(18): 7259-7267, 2013.

Gadow, S. I., Y.-Y. Li and Y. Liu . Effect of temperature on continuous hydrogen production of cellulose. *International Journal of Hydrogen Energy* 37(20): 15465-15472, 2012.

Gallardo, R., C. Faria, L. R. Rodrigues, M. A. Pereira and M. M. Alves. Anaerobic granular sludge as a biocatalyst for 1,3-propanediol production from glycerol in continuous bioreactors. *Bioresource Technology* 155(0): 28-33, 2014.

Gouveia, E. R., Nascimento, R. T., Souto-Maior, A. M., Rocha, G. J. M. Validação de metodologia para caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. *Química Nova* (32):1500-1503, 2009.

Guo, W.-Q., J. Ding, G.-L. Cao, C. Chen, X.-J. Zhou and N.-Q. Ren. Accelerated startup of hydrogen production expanded granular sludge bed with l-Cysteine supplementation. *Energy* 60(0): 94-98, 2013.

Guo, W.-Q., N.-Q. Ren, X.-J. Wang, W.-S. Xiang, Z.-H. Meng, J. Ding, Y.-Y. Qu and L.-S. Zhang. Biohydrogen production from ethanol-type fermentation of molasses in an expanded granular sludge bed (EGSB) reactor. *International Journal of Hydrogen Energy* 33(19): 4981-4988, 2008.

Guo, W.-Q., N.-Q. Ren, Z.-B. Chen, B.-F. Liu, X.-J. Wang, W.-S. Xiang and J. Ding. 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* 33(24): 7397-7404, 2008a.

Haghighi Mood, S., A. Hossein Golfeshan, M. Tabatabaei, G. Salehi Jouzani, G. H. Najafi, M. Gholami and M. Ardjmand . Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 27(0): 77-93, 2013.

Hallenbeck, P. C. and J. R. Benemann. Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. *International Journal of Hydrogen Energy* 27(11–12): 1185-1193, 2002.

Han, W., H. Chen, A. Jiao, Z. Wang, Y. Li and N. Ren. Biological fermentative hydrogen and ethanol production using continuous stirred tank reactor. *International Journal of Hydrogen Energy* 37(1): 843-847, 2012.

Hawkes, F. R., R. Dinsdale, D. L. Hawkes and I. Hussy. Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimisation. *International Journal of Hydrogen Energy* 27(11–12): 1339-1347, 2002.

Hniman, A., P. Prasertsan and S. O-Thong. Community analysis of thermophilic hydrogen-producing consortia enriched from Thailand hot spring with mixed xylose and glucose. *International Journal of Hydrogen Energy* 36(21): 14217-14226, 2011.

Hniman, A., S. O-Thong and P. Prasertsan. Developing a thermophilic hydrogen-producing microbial consortia from geothermal spring for efficient utilization

of xylose and glucose mixed substrates and oil palm trunk hydrolysate. *International Journal of Hydrogen Energy* 36(14): 8785-8793, 2011.

Hwang, M. H., N. J. Jang, S. H. Hyun and I. S. Kim. Anaerobic bio-hydrogen production from ethanol fermentation: the role of pH. *J Biotechnol* 111(3): 297-309, 2004.

Hwang, J.-H., J.-A. Choi, R. A. I. Abou-Shanab, A. Bhatnagar, B. Min, H. Song, E. Kumar, J. Choi, E. S. Lee, Y. J. Kim, S. Um, D. S. Lee and B.-H. Jeon. Effect of pH and sulfate concentration on hydrogen production using anaerobic mixed microflora. *International Journal of Hydrogen Energy* 34(24): 9702-9710, 2009a.

Hwang, J.-H., G.-C. Cha, T.-Y. Jeong, D.-J. Kim, A. Bhatnagar, B. Min, H. Song, J.-A. Choi, J.-H. Lee, D.-W. Jeong, H.-K. Chung, Y.-T. Park, J. Choi, R. A. I. Abou-Shanab, S. Eun Oh and B.-H. Jeon. Effect of COD/SO₄²⁻-ratio and Fe(II) under the variable hydraulic retention time (HRT) on fermentative hydrogen production. *Water Research* 43(14): 3525-3533, 2009b.

Ito, T., Y. Nakashimada, K. Senba, T. Matsui and N. Nishio. Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 100(3): 260-265, 2005.

Junghare, M., S. Subudhi and B. Lal. Improvement of hydrogen production under decreased partial pressure by newly isolated alkaline tolerant anaerobe, *Clostridium butyricum* TM-9A: Optimization of process parameters. *International Journal of Hydrogen Energy* 37(4): 3160-3168, 2012.

Kan, E. Effects of pretreatments of anaerobic sludge and culture conditions on hydrogen productivity in dark anaerobic fermentation. *Renewable Energy* 49(0): 227-231, 2013.

Kapdan, I. K. and F. Kargi. Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme and Microbial Technology* 38(5): 569-582, 2006.

Kargi, F., N. S. Eren and S. Ozmihci. Hydrogen gas production from cheese whey powder (CWP) solution by thermophilic dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy* 37(3): 2260-2266, 2012.

Kargi, F., N. S. Eren and S. Ozmihci. Bio-hydrogen production from cheese whey powder (CWP) solution: Comparison of thermophilic and mesophilic dark fermentations. *International Journal of Hydrogen Energy* 37(10): 8338-8342, 2012.

Kim, M.-S., E.-H. Choi and Y.-K. Oh. Characterization of hydrogenase from purple sulfur bacterium *Thiocapsa roseopersicina* and its prolonged in vitro hydrogen evolution. *International Journal of Hydrogen Energy* 33(5): 1496-1502, 2008.

Kim, T.-H., Y. Lee, K.-H. Chang and S.-J. Hwang .Effects of initial lactic acid concentration, HRTs, and OLRs on bio-hydrogen production from lactate-type fermentation. *Bioresource Technology* 103(1): 136-141, 2012.

Kirtay, E. Recent advances in production of hydrogen from biomass. *Energy Conversion and Management* 52(4): 1778-1789, 2011.

Kivistö, A., V. Santala and M. Karp. Non-sterile process for biohydrogen and 1,3-propanediol production from raw glycerol. *International Journal of Hydrogen Energy* 38(27): 11749-11755, 2013.

Kongjan, P. and I. Angelidaki . Extreme thermophilic biohydrogen production from wheat straw hydrolysate using mixed culture fermentation: Effect of reactor configuration. *Bioresource Technology* 101(20): 7789-7796, 2010.

Kongjan, P., O. T. S, M. Kotay, B. Min and I. Angelidaki. Biohydrogen production from wheat straw hydrolysate by dark fermentation using extreme thermophilic mixed culture. *Biotechnol Bioeng* 105(5): 899-908, 2010.

Kósmider, A., Drozdzyńska, A., Blaszką, K., Leja, K. e Czaczyk, K. Propionic acid production by *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *Shermanii* Using industrial wastes: Crude glycerol and whey lactose. *Polish Journal of Environmental Studies* 19(6): 1249-1253, 2010.

Kovács, K. L.; Maróti, G.; Rákhely, G. A novel approach for biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 31, n. 11, p. 1460-1468, 9// 2006.

Laurent, B., H. Serge, M. Julien, H. Christopher and T. Philippe . Effects of Hydrogen Partial Pressure on Fermentative Biohydrogen Production by a Chemotropic Clostridium Bacterium in a New Horizontal Rotating Cylinder Reactor. *Energy Procedia* 29(0): 34-41, 2012.

Lazaro, C. Z., V. Perna, C. Etchebehere and M. B. A. Varesche. Sugarcane vinasse as substrate for fermentative hydrogen production: The effects of temperature and substrate concentration." *International Journal of Hydrogen Energy* 39(12): 6407-6418, 2014.

Lee, Z.-K., S.-L. Li, J.-S. Lin, Y.-H. Wang, P.-C. Kuo and S.-S. Cheng . Effect of pH in fermentation of vegetable kitchen wastes on hydrogen production under a thermophilic condition. *International Journal of Hydrogen Energy* 33(19): 5234-5241, 2008.

Lee JS1, Chung MJ, Seo JG. In Vitro Evaluation of Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria against *Clostridium difficile*. *Toxicol Res.* 2013.

Lee, K.-S., T.-S. Tseng, Y.-W. Liu and Y.-D. Hsiao. Enhancing the performance of dark fermentative hydrogen production using a reduced pressure fermentation strategy. *International Journal of Hydrogen Energy* 37(20): 15556-15562, 2012.

Léon, A. Hydrogen Technology. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2008.

Levin, D. B., L. Pitt and M. Love. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *International Journal of Hydrogen Energy* 29(2): 173-185, 2004.

Levin, D. B., R. Islam, N. Cicek and R. Sparling. Hydrogen production by *Clostridium thermocellum* 27405 from cellulosic biomass substrates. *International Journal of Hydrogen Energy* 31(11): 1496-1503, 2006.

Li, S., C. Lai, Y. Cai, X. Yang, S. Yang, M. Zhu, J. Wang and X. Wang. High efficiency hydrogen production from glucose/xylose by the ldh-deleted *Thermoanaerobacterium* strain. *Bioresource Technology* 101(22): 8718-8724, 2010.

Lin, C.-Y., C.-C. Wu and C.-H. Hung . Temperature effects on fermentative hydrogen production from xylose using mixed anaerobic cultures. *International Journal of Hydrogen Energy* 33(1): 43-50, 2008.

Lin, C.-Y. and H.-P. Chen. Sulfate effect on fermentative hydrogen production using anaerobic mixed microflora. *International Journal of Hydrogen Energy* 31(7): 953-960, 2006.

Lin, C.-Y. and W.-C. Hung. Enhancement of fermentative hydrogen/ethanol production from cellulose using mixed anaerobic cultures. *International Journal of Hydrogen Energy* 33(14): 3660-3667, 2008.

Lin, C.-Y., C.-C. Wu and C.-H. Hung. Temperature effects on fermentative hydrogen production from xylose using mixed anaerobic cultures. *International Journal of Hydrogen Energy* 33(1): 43-50, 2008.

Lin, C.-Y., C.-C. Wu, J.-H. Wu and F.-Y. Chang. Effect of cultivation temperature on fermentative hydrogen production from xylose by a mixed culture. *Biomass and Bioenergy* 32(12): 1109-1115, 2008.

Lin, C.-Y., S.-Y. Wu, P.-J. Lin, J.-S. Chang, C.-H. Hung, K.-S. Lee, C.-H. Lay, C.-Y. Chu, C.-H. Cheng, A. C. Chang, J.-H. Wu, F.-Y. Chang, L.-H. Yang, C.-W. Lee and Y.-C. Lin. A pilot-scale high-rate biohydrogen production system with mixed microflora. *International Journal of Hydrogen Energy* 36(14): 8758-8764, 2011.

Liu, B., K. Christiansen, R. Parnas, Z. Xu and B. Li. Optimizing the production of hydrogen and 1,3-propanediol in anaerobic fermentation of biodiesel glycerol. *International Journal of Hydrogen Energy* 38(8): 3196-3205, 2013.

Liu, C., W. Shi, M. Kim, Y. Yang, Z. Lei and Z. Zhang. Photocatalytic pretreatment for the redox conversion of waste activated sludge to enhance biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy* 38(18): 7246-7252, 2013.

Liu, C.-M., C.-Y. Chu, W.-Y. Lee, Y.-C. Li, S.-Y. Wu and Y.-P. Chou. Biohydrogen production evaluation from rice straw hydrolysate by concentrated acid pre-treatment in both batch and continuous systems. *International Journal of Hydrogen Energy* 38(35): 15823-15829, 2013.

Liu, J., J. Hu, J. Zhong, J. Luo, A. Zhao, F. Liu, R. Hong, G. Qian and Z. P. Xu. The effect of calcium on the treatment of fresh leachate in an expanded granular sludge bed bioreactor. *Bioresource Technology* 102(9): 5466-5472, 2011.

Liu, J., J. Zhong, Y. Wang, Q. Liu, G. Qian, L. Zhong, R. Guo, P. Zhang and Z. P. Xu. Effective bio-treatment of fresh leachate from pretreated municipal solid waste in an expanded granular sludge bed bioreactor. *Bioresource Technology* 101(5): 1447-1452, 2010.

Liu, Q., X. Zhang, L. Yu, A. Zhao, J. Tai, J. Liu, G. Qian and Z. P. Xu. Fermentative hydrogen production from fresh leachate in batch and continuous bioreactors. *Bioresource Technology* 102(9): 5411-5417, 2010.

Liu, L., Y. Zhu, J. Li, M. Wang, P. Lee, G. Du and J. Chen. Microbial production of propionic acid from propionibacteria: current state, challenges and perspectives. *Crit Rev Biotechnol* 32(4): 374-381, 2012.

Liu, Z. L., P. J. Slininger, B. S. Dien, M. A. Berhow, C. P. Kurtzman and S. W. Gorsich. Adaptive response of yeasts to furfural and 5-hydroxymethylfurfural and new chemical evidence for HMF conversion to 2,5-bis-hydroxymethylfuran. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 31(8): 345-352, 2004.

Lo, Y. C., C.-Y. Huang, T.-N. Fu, C.-Y. Chen and J.-S. Chang. Fermentative hydrogen production from hydrolyzed cellulosic feedstock prepared with a thermophilic anaerobic bacterial isolate. *International Journal of Hydrogen Energy* 34(15): 6189-6200, 2009a.

Lo, Y.-C., Y.-C. Su, C.-Y. Chen, W.-M. Chen, K.-S. Lee and J.-S. Chang. Biohydrogen production from cellulosic hydrolysate produced via temperature-shift-enhanced bacterial cellulose hydrolysis. *Bioresource Technology* 100(23): 5802-5807, 2009b.

Lo, Y.-C., X.-J. Chen, C.-Y. Huang, Y.-J. Yuan and J.-S. Chang. Dark fermentative hydrogen production with crude glycerol from biodiesel industry using indigenous hydrogen-producing bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy* 38(35): 15815-15822, 2013.

Luo, G., L. Xie, Z. Zou, Q. Zhou and J.-Y. Wang. Fermentative hydrogen production from cassava stillage by mixed anaerobic microflora: Effects of temperature and pH. *Applied Energy* 87(12): 3710-3717, 2010.

Marone, A., C. Varrone, F. Fiocchetti, B. Giussani, G. Izzo, L. Mentuccia, S. Rosa and A. Signorini. Optimization of substrate composition for biohydrogen production from buffalo slurry co-fermented with cheese whey and crude glycerol,

using microbial mixed culture. *International Journal of Hydrogen Energy* 40(1): 209-218, 2015.

Martinez, A., M. E. Rodriguez, S. W. York, J. F. Preston and L. O. Ingram. Effects of Ca(OH)₂ treatments ("overliming") on the composition and toxicity of bagasse hemicellulose hydrolysates. *Biotechnol Bioeng* 69(5): 526-536, 2000.

Metsoviti, M., K. Paraskevaidi, A. Koutinas, A.-P. Zeng and S. Papanikolaou. Production of 1,3-propanediol, 2,3-butanediol and ethanol by a newly isolated *Klebsiella oxytoca* strain growing on biodiesel-derived glycerol based media. *Process Biochemistry* 47(12): 1872-1882, 2012.

Mohagheghi, A., M. Ruth and D. J. Schell. Conditioning hemicellulose hydrolysates for fermentation: Effects of overliming pH on sugar and ethanol yields. *Process Biochemistry* 41(8): 1806-1811, 2006.

Mosier, N., C. Wyman, B. Dale, R. Elander, Y. Y. Lee, M. Holtzapple and M. Ladisch. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* 96(6): 673-686, 2005.

Mulder, David W., Eric M. Shepard, Jonathan E. Meuser, N. Joshi, Paul W. King, Matthew C. Posewitz, Joan B. Broderick and John W. Peters. Insights into [FeFe]-Hydrogenase Structure, Mechanism, and Maturation. *Structure* 19(8): 1038-1052, 2011.

Nissilä, M. E., C.-H. Lay and J. A. Puhakka. Dark fermentative hydrogen production from lignocellulosic hydrolyzates – A review. *Biomass and Bioenergy* 67(0): 145-159, 2014.

Nissilä, M. E., H. P. Tähti, J. A. Rintala and J. A. Puhakka. Thermophilic hydrogen production from cellulose with rumen fluid enrichment cultures: Effects of different heat treatments. *International Journal of Hydrogen Energy* 36(2): 1482-1490, 2011.

Nissilä, M. E., Y.-C. Li, S.-Y. Wu, C.-Y. Lin and J. A. Puhakka. Hydrogenic and methanogenic fermentation of birch and conifer pulps. *Applied Energy* 100(0): 58-65, 2012.

Noike, T., H. Takabatake, O. Mizuno and M. Ohba (2002). Inhibition of hydrogen fermentation of organic wastes by lactic acid bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy* 27(11–12): 1367-1371, 2002.

Núñez, L. A. and B. Martínez. Anaerobic treatment of slaughterhouse wastewater in an Expanded Granular Sludge Bed (EGSB) reactor. *Water Science and Technology* 40(8): 99-106, 1999.

Pakarinen, O., A. Lehtomäki and J. Rintala. Batch dark fermentative hydrogen production from grass silage: The effect of inoculum, pH, temperature and VS ratio. *International Journal of Hydrogen Energy* 33(2): 594-601, 2008.

Pandelia, M.-E., W. Nitschke, P. Infossi, M.-T. Giudici-Orticoni, E. Bill and W. Lubitz. Characterization of a unique [FeS] cluster in the electron transfer chain of the oxygen tolerant [NiFe] hydrogenase from *Aquifex aeolicus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(15): 6097-6102, 2011.

Panagiotopoulos, I. A., G. D. Lignos, R. R. Bakker and E. G. Koukios . Effect of low severity dilute-acid pretreatment of barley straw and decreased enzyme loading hydrolysis on the production of fermentable substrates and the release of inhibitory compounds. *Journal of Cleaner Production* 32(0): 45-51, 2012.

Pandey, A. et al. Biohydrogen. In: PANDEY, A.;CHANG, J.-S., et al (Ed.). *Biohydrogen*. Oxford: Elsevier, v.1, 2013. p.358.

Panesar, P. S., J. F. Kennedy, D. N. Gandhi and K. Bunk). Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chemistry* 105(1): 1-14, 2007.

Patra, S., S. Sangyoka, M. Boonmee and A. Reungsang. Bio-hydrogen production from the fermentation of sugarcane bagasse hydrolysate by *Clostridium butyricum*. *International Journal of Hydrogen Energy* 33(19): 5256-5265, 2008.

Prakasham, R. S., P. Brahmaiah, T. Sathish and K. R. S. Sambasiva Rao. Fermentative biohydrogen production by mixed anaerobic consortia: Impact of glucose to xylose ratio. *International Journal of Hydrogen Energy* 34(23): 9354-9361, 2009.

Prazeres, A. R., F. Carvalho and J. Rivas. Cheese whey management: A review. *Journal of Environmental Management* 110(0): 48-68, 2012.

Reilly, M., R. Dinsdale and A. Guwy. Mesophilic biohydrogen production from calcium hydroxide treated wheat straw. *International Journal of Hydrogen Energy* 39(30): 16891-16901, 2014.

Reis, C. M. and E. L. Silva. Effect of upflow velocity and hydraulic retention time in anaerobic fluidized-bed reactors used for hydrogen production. *Chemical Engineering Journal* 172(1): 28-36, 2011.

Ren, N., A. Wang, G. Cao, J. Xu and L. Gao. Bioconversion of lignocellulosic biomass to hydrogen: Potential and challenges. *Biotechnology Advances* 27(6): 1051-1060, 2009.

Ren, N., G. Cao, A. Wang, D.-J. Lee, W. Guo and Y. Zhu. Dark fermentation of xylose and glucose mix using isolated *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16. *International Journal of Hydrogen Energy* 33(21): 6124-6132, 2008.

Ren, N.-Q., J.-F. Xu, L.-F. Gao, L. Xin, J. Qiu and D.-X. Su. Fermentative biohydrogen production from cellulose by cow dung compost enriched cultures. *International Journal of Hydrogen Energy* 35(7): 2742-2746, 2010.

Reungsang, A., S. Sittijunda and I. Angelidaki. Simultaneous production of hydrogen and ethanol from waste glycerol by *Enterobacter aerogenes* KKU-S1. *International Journal of Hydrogen Energy* 38(4): 1813-1825, 2013.

Reungsang, A., S. Sittijunda and S. O-thong. Bio-hydrogen production from glycerol by immobilized *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 on heat-treated UASB granules as affected by organic loading rate. *International Journal of Hydrogen Energy* 38(17): 6970-6979, 2013.

Robledo-Narváez, P. N., K. M. Muñoz-Páez, H. M. Poggi-Varaldo, E. Ríos-Leal, G. Calva-Calva, L. A. Ortega-Clemente, N. Rinderknecht-Seijas, C. Estrada-Vázquez, M. T. Ponce-Noyola and J. A. Salazar-Montoya. The influence of total solids content and initial pH on batch biohydrogen production by solid substrate fermentation of agroindustrial wastes. *Journal of Environmental Management* 128(0): 126-137, 2013.

Rosa, P. R. F., S. C. Santos, I. K. Sakamoto, M. B. A. Varesche and E. L. Silva. Hydrogen production from cheese whey with ethanol-type fermentation: Effect of hydraulic retention time on the microbial community composition. *Bioresource Technology* 161(0): 10-19, 2014.

Rosa, P. R. F., S. C. Santos, I. K. Sakamoto, M. B. A. Varesche and E. L. Silva. The effects of seed sludge and hydraulic retention time on the production of hydrogen from a cassava processing wastewater and glucose mixture in an anaerobic fluidized bed reactor. *International Journal of Hydrogen Energy* 39(25): 13118-13127, 2014.

Rosa, P. R., S. C. Santos and E. L. Silva. Different ratios of carbon sources in the fermentation of cheese whey and glucose as substrates for hydrogen and ethanol production in continuous reactors. *International Journal of Hydrogen Energy* 39(3): 1288-1296, 2014.

Rosales-Colunga, L. M., E. Razo-Flores and A. De Leon Rodriguez. Fermentation of lactose and its constituent sugars by *Escherichia coli* WDHL: impact on hydrogen production. *Bioresour Technol* 111: 180-184, 2012.

S. Grba, V.S. Tomas, D. Stanzer, N. Vahcic, A. Skrlin. Selection of yeast strain *Kluyveromyces marxianus* for alcohol and biomass production on whey, *Chem.Biochem. Eng. Q.* 16, 13–1, 2002.

Sakihama, Y., T. Hasunuma, and A. Kondo. Improved ethanol production from xylose in the presence of acetic acid by the overexpression of the HAA1 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 119(3): 297-302, 2015.

Salminen, E. and J. Rintala. Anaerobic digestion of organic solid poultry slaughterhouse waste-a review. *Bioresour Technol* 83(1): 13-26, 2002.

Santos, S. C., Produção de hidrogênio em reator anaeróbico de leito fluidificado termofílico com vinhaça como substrato orgânico. São Carlos. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, 2014.

Santos, S. C., P. R. F. Rosa, I. K. Sakamoto, M. B. Amâncio Varesche and E. L. Silva. Hydrogen production from diluted and raw sugarcane vinasse under thermophilic anaerobic conditions. *International Journal of Hydrogen Energy* 39(18): 9599-9610, 2014b.

Santos, S. C., P. R. Ferreira Rosa, I. K. Sakamoto, M. B. Amâncio Varesche and E. L. Silva. Continuous thermophilic hydrogen production and microbial community analysis from anaerobic digestion of diluted sugar cane stillage. *International Journal of Hydrogen Energy* 39(17): 9000-9011, 2014a.

Saripan, A. F. and A. Reungsang. Simultaneous saccharification and fermentation of cellulose for bio-hydrogen production by anaerobic mixed cultures in elephant dung. *International Journal of Hydrogen Energy* 39(17): 9028-9035, 2014.

Sarma, S. J., G. S. Dhillon, S. K. Brar, Y. Le Bihan, G. Buelna and M. Verma. Investigation of the effect of different crude glycerol components on hydrogen production by *Enterobacter aerogenes* NRRL B-407. *Renewable Energy* 60(0): 566-571, 2013.

Sarma, S. J., S. K. Brar, E. B. Sydney, Y. Le Bihan, G. Buelna and C. R. Soccol. Microbial hydrogen production by bioconversion of crude glycerol: A review. *International Journal of Hydrogen Energy* 37(8): 6473-6490, 2012.

Scully, C., G. Collins and V. O'Flaherty. Anaerobic biological treatment of phenol at 9.5–15°C in an expanded granular sludge bed (EGSB)-based bioreactor. *Water Research* 40(20): 3737-3744, 2006.

Selembo, P. A., J. M. Perez, W. A. Lloyd and B. E. Logan. Enhanced hydrogen and 1,3-propanediol production from glycerol by fermentation using mixed cultures. *Biotechnology and Bioengineering* 104(6): 1098-1106, 2009.

Shams Yazdani, S. and R. Gonzalez. Engineering *Escherichia coli* for the efficient conversion of glycerol to ethanol and co-products. *Metabolic Engineering* 10(6): 340-351, 2008.

Shi, X., D.-H. Kim, H.-S. Shin and K.-W. Jung. Effect of temperature on continuous fermentative hydrogen production from *Laminaria japonica* by anaerobic mixed cultures. *Bioresource Technology* 144(0): 225-231, 2013.

Shida, G. M., A. R. Barros, C. M. d. Reis, E. L. C. d. Amorim, M. H. Rissato Zamariolli Damianovic and E. L. Silva. Long-term stability of hydrogen and organic acids production in an anaerobic fluidized-bed reactor using heat treated anaerobic sludge inoculum. *International Journal of Hydrogen Energy* 34(9): 3679-3688, 2009.

Shida, G. M., L. T. Sader, E. L. Cavalcante de Amorim, I. K. Sakamoto, S. I. Maintinguer, N. K. Saavedra, M. B. Amâncio Varesche and E. L. Silva. Performance and composition of bacterial communities in anaerobic fluidized bed reactors for hydrogen production: Effects of organic loading rate and alkalinity. *International Journal of Hydrogen Energy* 37(22): 16925-16934, 2012.

Shin, C., E. Lee, P. L. McCarty and J. Bae. Effects of influent DO/COD ratio on the performance of an anaerobic fluidized bed reactor fed low-strength synthetic wastewater. *Bioresource Technology* 102(21): 9860-9865, 2011.

Sittijunda, S. and A. Reungsang. Biohydrogen production from waste glycerol and sludge by anaerobic mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy* 37(18): 13789-13796, 2012.

Sittijunda, S., A. F. Tomas, A. Reungsang, O. t. S and I. Angelidaki. Ethanol production from glucose and xylose by immobilized *Thermoanaerobacter pentosaceus* at 70 degrees C in an up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. *Bioresour Technol* 143: 598-607, 2013.

Temudo, M. F., R. Poldermans, R. Kleerebezem and M. C. M. van Loosdrecht. Glycerol fermentation by (open) mixed cultures: A chemostat study. *Biotechnology and Bioengineering* 100(6): 1088-1098, 2008.

Temudo, M., T. Mato, R. Kleerebezem and M. M. van Loosdrecht. Xylose anaerobic conversion by open-mixed cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology* 82(2): 231-239, 2009.

Tufvesson, P., A. Ekman, R. R. Sardari, K. Engdahl and L. Tufvesson. Economic and environmental assessment of propionic acid production by fermentation using different renewable raw materials. *Bioresour Technol* 149: 556-564, 2013.

Trchounian, K., V. Sanchez-Torres, T. K. Wood and A. Trchounian. *Escherichia coli* hydrogenase activity and H₂ production under glycerol fermentation at a low pH. *International Journal of Hydrogen Energy* 36(7): 4323-4331, 2011.

Varrone, C., S. Rosa, F. Fiocchetti, B. Giussani, G. Izzo, G. Massini, A. Marone, A. Signorini and A. Wang. Enrichment of activated sludge for enhanced hydrogen production from crude glycerol. *International Journal of Hydrogen Energy* 38(3): 1319-1331, 2013.

Venetsaneas, N., G. Antonopoulou, K. Stamatelatou, M. Kornaros and G. Lyberatos. Using cheese whey for hydrogen and methane generation in a two-stage continuous process with alternative pH controlling approaches. *Bioresource Technology* 100(15): 3713-3717, 2009.

Wang, B., Y. Li and N. Ren (2013). Biohydrogen from molasses with ethanol-type fermentation: Effect of hydraulic retention time. *International Journal of Hydrogen Energy* 38(11): 4361-4367, 2013.

Wang, B., W. Wan and J. Wang. Inhibitory effect of ethanol, acetic acid, propionic acid and butyric acid on fermentative hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy* 33(23): 7013-7019, 2008.

Wang, J. and W. Wan. Effect of temperature on fermentative hydrogen production by mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy* 33(20): 5392-5397, 2008.

Wang, J. and W. Wan. Comparison of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing bacteria from digested sludge. *International Journal of Hydrogen Energy* 33(12): 2934-2941, 2008.

Wang, J. and W. Wan. Effect of concentration on fermentative hydrogen production by mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy* 33(4): 1215-1220, 2008b.

Wang, J. and W. Wan. Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy* 34(2): 799-811, 2009.

Wang, Z. and S.-T. Yang. Propionic acid production in glycerol/glucose co-fermentation by *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*. *Bioresource Technology* 137(0): 116-123, 2013.

C. Wu, J. Zhang, G. Du and J. Chen. Heterologous expression of *Lactobacillus casei* RecO improved the multiple-stress tolerance and lactic acid production in *Lactococcus lactis* NZ9000 during salt stress. *Bioresour Technol* 143:238-241, 2013.

Wu, K.-J., Y.-C. Lo, S.-D. Chen and J.-S. Chang. Fermentative production of biofuels with entrapped anaerobic sludge using sequential HRT shifting operation in continuous cultures. *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers* 38(3-4): 205-213, 2007.

Wu, X.-B., G.-F. Huang, L.-P. Bai, M.-N. Long and Q.-X. Chen. Enhanced hydrogen production from xylose and bamboo stalk hydrolysate by overexpression of xylulokinase and xylose isomerase in *Klebsiella oxytoca* HP1. *International Journal of Hydrogen Energy* 39(1): 221-230, 2014.

Xia, Y., L. Cai, T. Zhang and H. H. P. Fang. Effects of substrate loading and co-substrates on thermophilic anaerobic conversion of microcrystalline cellulose and microbial communities revealed using high-throughput sequencing. *International Journal of Hydrogen Energy* 37(18): 13652-13659, 2012.

Xu, J.-F., N.-Q. Ren, A.-J. Wang, J. Qiu, Q.-L. Zhao, Y.-J. Feng and B.-F. Liu. Cell growth and hydrogen production on the mixture of xylose and glucose using a novel strain of *Clostridium* sp. HR-1 isolated from cow dung compost. *International Journal of Hydrogen Energy* 35(24): 13467-13474, 2010.

Yang, P., R. Zhang, J. A. McGarvey and J. R. Benemann. Biohydrogen production from cheese processing wastewater by anaerobic fermentation using mixed microbial communities. *International Journal of Hydrogen Energy* 32(18): 4761-4771, 2007.

Ying M, Hu T, Zhang DJ, Wang W, Xiu ZL. Microbial production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* using crude glycerol from biodiesel preparations. *Biotechnol Lett*;28:1755e9, 2006.

Yoochatchaval, W., Ohashi A., Harada H., Yamaguchi T. and Syutsubo, K. Characteristics of Granular Sludge in an EGSB Reactor for Treating low Strength Wastewater. *Int. J. Environmental Research*. 2 (4): 319-328, 2008.

Zhang, A. and S.-T. Yang. Propionic acid production from glycerol by metabolically engineered *Propionibacterium acidipropionici*. *Process Biochemistry* 44(12): 1346-1351, 2009.

Zhang, Y. and J. Shen. Effect of temperature and iron concentration on the growth and hydrogen production of mixed bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy* 31(4): 441-446, 2006.

Zhang, Z.-P., J.-H. Tay, K.-Y. Show, R. Yan, D. Tee Liang, D.-J. Lee and W.-J. Jiang. Biohydrogen production in a granular activated carbon anaerobic fluidized bed reactor. *International Journal of Hydrogen Energy* 32(2): 185-19, 2007.

Zhang, Z.-P., K.-Y. Show, J.-H. Tay, D. T. Liang, D.-J. Lee and W.-J. Jiang. Effect of hydraulic retention time on biohydrogen production and anaerobic microbial community. *Process Biochemistry* 41(10): 2118-2123, 2006.

Zhao, C., D. Karakashev, W. Lu, H. Wang and I. Angelidaki. Xylose fermentation to biofuels (hydrogen and ethanol) by extreme thermophilic (70°C) mixed culture. *International Journal of Hydrogen Energy* 35(8): 3415-3422, 2010.

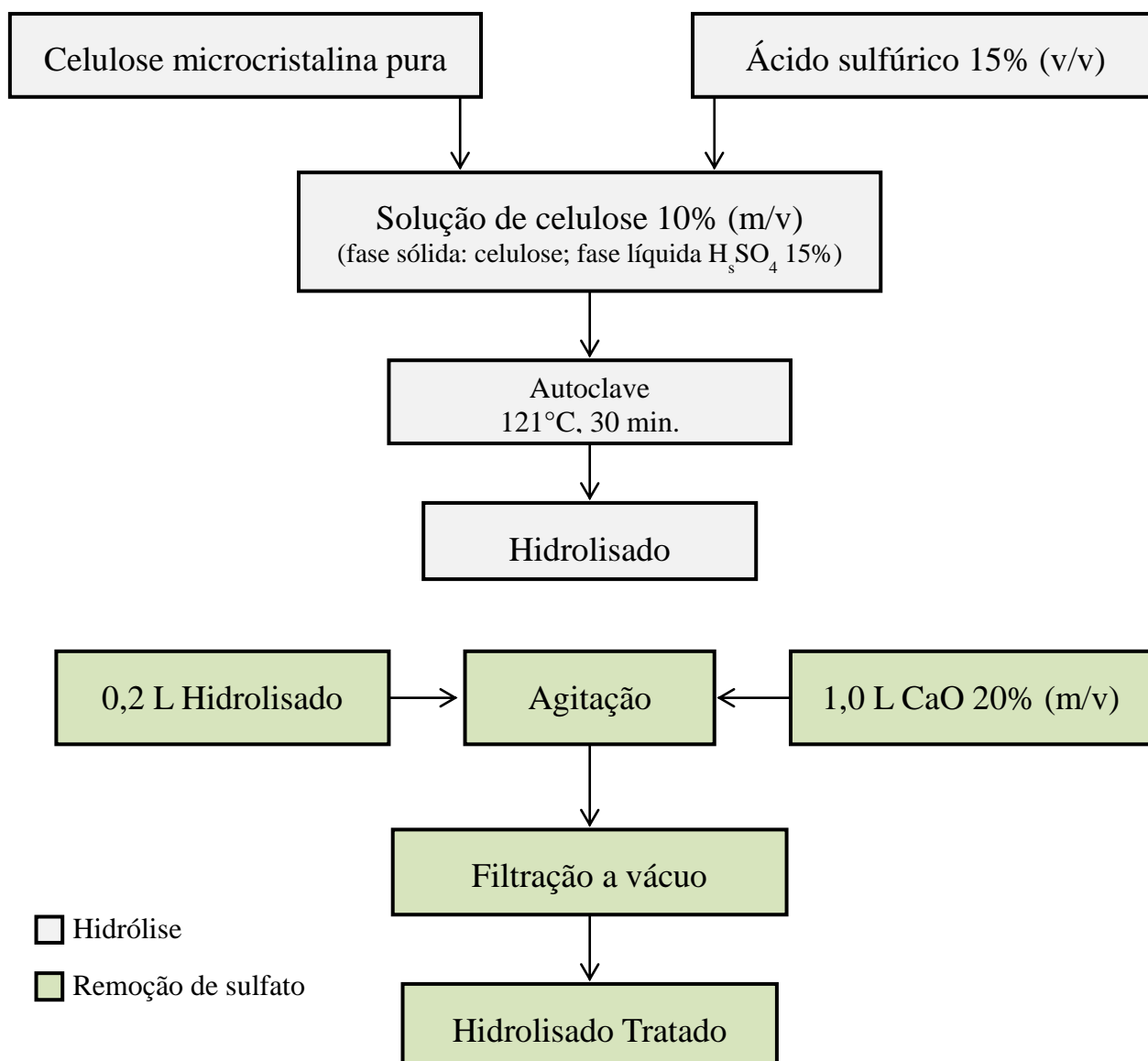
Zhao, C., W. Lu and H. Wang. Simultaneous hydrogen and ethanol production from a mixture of glucose and xylose using extreme thermophiles II: Effect of hydraulic retention time. *International Journal of Hydrogen Energy* 38(22): 9131-9136, 2013.

Zhao, L., G.-L. Cao, A.-J. Wang, H.-Y. Ren and N.-Q. Ren. Evaluation of continuous biohydrogen production from enzymatically treated cornstalk hydrolysate. *International Journal of Hydrogen Energy* 38(35): 15100-15104, 2013.

Zhu, Y., J. Li, M. Tan, L. Liu, L. Jiang, J. Sun, P. Lee, G. Du and J. Chen. Optimization and scale-up of propionic acid production by propionic acid-tolerant *Propionibacterium acidipropionici* with glycerol as the carbon source. *Bioresour Technol* 101(22): 8902-8906, 2010.

Zhu, G.-F., P. Wu, Q.-S. Wei, J.-y. Lin, Y.-L. Gao and H.-N. Liu. Biohydrogen production from purified terephthalic acid (PTA) processing wastewater by anaerobic fermentation using mixed microbial communities. *International Journal of Hydrogen Energy* 35(15): 8350-8356, 2010.

ANEXO A- Fluxograma das etapas de hidrólise e remoção de sulfato.



ANEXO B- Balanço de DQO para o R1, R2 e R3.

DQO de álcoois, ácidos, carboidratos e SSV (mg/L) - R1																
Fase	TDH	HAc	HBu	EtOH	HLa	HPro	Xilitol	HFór	Glicerol	HMa	Glicose efl.	SSV	DQO total	DQO medida	Dif.%	
1	24	597	291	36	78	45	79	0	0	0	167	144	1435	1841	22	
2	20	222	249	32	0	0	0	0	0	0	145	88	736	1583	54	
3	16	174	393	0	0	0	0	0	0	0	120	172	858	1515	43	
4	12	689	135	32	0	0	0	0	0	0	78	277	1210	1378	12	
5	8	134	196	693	18	18	0	11	22	23	128	191	1434	1352	-6	

DQO de álcoois, ácidos, carboidratos e SSV (mg/L) - R2																
Fase	TDH	HAc	HBu	EtOH	HLa	HMal	HPro	HFór	Glicerol	Hsuc	Hcít	Glieq. efl.	SSV	DQO total	DQO medida	Dif.%
1	16	178	467	0	304	443	219	0	0	0	0	984	161	2755	3927	30
2	12	185	350	26	524	305	183	0	0	0	0	1707	140	3420	3886	12
3	8	254	484	47	689	193	92	0	0	0	0	1567	159	3485	3632	4
4	4	219	495	0	641	124	33	0	0	0	0	1990	184	3687	3835	4
5	2	89	188	645	181	15	39	6	248	2	10	2525	252	4200	3871	-8
6	1	65	75	321	193	15	27	5	235	3	3	2932	207	4082	3847	-6
7	0,5	32	55	302	176	25	5	3	165	1	0	2899	227	3888	3421	-14

DQO de ácidos, álcoois, glicerol e SSV (mg/L) - R3																
Fase	SQ/G	EtOH	Hac	1,3-Pdiol	Hpro	Hla	Hfór	Hbu	Hval	Hisobu	Glicerol efl.	Lactose efl.	SSV	DQO total	DQO medida	Dif.%
1	5+1	5	115	198	450	2008	24	559	0	56	824	1724	1302	7267	8006	9
2	5+2	0	466	2041	8878	0	0	1572	995	70	89	263	1359	15733	13477	-17
3	5+3	0	704	2686	11976	0	0	1530	929	121	98	255	1782	20081	15029	-34
4	5+4	87	1388	2872	12738	0	0	2745	1059	264	119	156	2067	23495	19304	-22
5	5+5	110	1294	175	5262	0	0	6583	648	261	132	131	3390	17986	19915	10
6	5+5	184	962	183	6026	0	0	6795	581	288	226	281	2948	18475	25486	28
7	5+5	164	864	540	4065	4	0	5633	504	326	273	630	2325	15327	16920	9
8	5+5	0	333	100	2558	8	6	763	425	106	3166	2511	2677	12653	16777	25