

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

**Aplicação de Biorreatores Anaeróbios em Diferentes Temperaturas para Produção de
Hidrogênio a partir de Águas Residuárias Agroindustriais**

Aluno: Lucas Rodrigues Ramos

Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Silva

São Carlos

2016

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

**Aplicação de Biorreatores Anaeróbios em Diferentes Temperaturas para Produção de
Hidrogênio a partir de Águas Residuárias Agroindustriais**

Lucas Rodrigues Ramos

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

São Carlos

2016

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

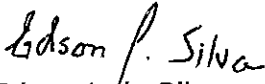
R175a Ramos, Lucas Rodrigues
Aplicação de biorreatores anaeróbios em diferentes temperaturas para produção de hidrogênio a partir de águas residuárias agroindustriais / Lucas Rodrigues Ramos. -- São Carlos : UFSCar, 2016.
138 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2016.

1. Água residuária agroindustrial. 2. Vinhaça de cana de açúcar. 3. Soro de queijo. 4. Reator anaeróbio de leito fluidizado. 5. Reator anaeróbio de leito granular expandido. I. Título.

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE LUCAS RODRIGUES RAMOS APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 18 DE MARÇO DE 2016.

BANCA EXAMINADORA:


Edson Luiz Silva
Orientador, UFSCar


José Alberto Domingues Rodrigues
IMT


Alberto Colli Badino Junior
UFSCar

DEDICATÓRIA

A Deus:

“Que diremos, pois, diante dessas coisas? Se Deus é por nós, quem será contra nós?”

Romanos 8:13

Aos meus amados Renata, Francisco, Joana e Natália:

Exemplos de amor, dedicação e empenho que guiam meus caminhos.

“No amor do próximo o pobre é rico; sem amor do próximo o rico é pobre.”

Santo Agostinho

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pois ainda que eu ande pelo vale da sombras, não temerei mal algum, porque tu estás comigo.

Ao Prof. Dr. Edson Luiz Silva, pela orientação, incentivo, presença, experiência paciência e comprometimento tão característicos que tornam todo este caminho sem igual. Agradeço pela luta, respeito e sinceridade que sol após sol moldam minha moral e ética profissional. Mesmo caído, sei que o senhor estará lá para levantar junto a mim. Muito obrigado pelas indicações culturais e exemplos de vida. Tudo está marcado em pedra. Mesmo que o senhor não esteja mais lá, serás consultado pela sua filosofia quando for a minha vez de orientar, ajudar e educar.

Ao Prof. Ass. Marcelo Zaiat, assim como ao meu orientador, Prof. Dr. Edson Luiz Silva, pela oportunidade de ter participado como bolsista vinculado ao projeto temático “Produção de Bioenergia no Tratamento de Águas Residuárias e Adequação Ambiental dos Efluentes e Resíduos Gerados”, financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo –FAPESP (Processo 2009/15.984-0).

À CAPES pelo apoio financeiro concedido por meio do auxílio financeiro.

Ao Prof. Dr. Alberto Colli Badino Junior (DEQ/UFSCar) e ao Prof. Dr. José Alberto Domingues Rodrigues (EMM/IMT) por aceitarem avaliar este trabalho. Muito obrigado pelo exemplo de postura pessoal e profissional.

A Profa. Dra. Paula Rúbia Ferreira Rosa e Dr. Fabrício Motteran pelos valiosos comentários, considerações e sugestões no Exame de Qualificação.

A Profa. Dra. Gabriela Cantarelli Lopes e à Profa. Dra. Mônica Lopes Aguiar, pelo auxílio na postura e na apresentação do projeto de dissertação de mestrado.

Ao Grupo São Martinho por disponibilizar as amostras de vinhaça de cana de açúcar. Agradeço em especial aos funcionários da usina São Martinho (Pradópolis/SP): Cláudio Frazão Araújo, Michele Fernanda Pires e todos os responsáveis pela área técnica pela gentil recepção, atenção e auxílio na coleta da vinhaça. O pronto atendimento, mesmo em períodos complicados, foi essencial para a realização deste estudo.

Ao técnico Oscar da Silva, profissional e artesão, pela montagem dos reatores, auxílio constante no laboratório que em diversas ocasiões não faz parte dos seus deveres, mas da dedicação e respeito que tem por todos.

À todos os técnicos, especialistas e professores ligados ao DEQ/UFSCar pela grande ajuda nos diferentes aspectos do ensino e da pesquisa que são a base do sucesso deste departamento.

À todas auxiliares de limpeza que passaram pelo DEQ/UFSCar pela lição de vida.

À Dra. Maria Ângela Tallarico Adorno e a Dra. Inês Noriko Tomita pelo auxílio nas análises cromatográficas.

Aos colegas que frequentaram e frequentam do Laboratório de Controle Ambiental II, do Departamento de Engenharia Química, da Universidade Federal de São Carlos com quem tive o prazer de conviver durante todos estes anos de formação (Aline, Andreza, Aruana, Camila, Carolina, Cristiane, Danilo, Filipe, Janaína, Gabriel, Gilberto, Helberth, Livia Bota, Livia Ottaviano, Marcus, Mariana, Morgana, Paula, Samantha, Talita, Talles e Tiago). Cada momento de aprendizado com todos vocês foi único e nunca será esquecido. Vocês fazem parte da minha vida profissional e são exemplos de dedicação.

Agradeço especialmente a Aruana e Cristiane por guiarem os meus primeiros passos no laboratório, ensinando sobre cada equipamento, procedimento e outros milhares de detalhes do LCA-II.

Agradeço imensamente aos meus amigos polêmicos Aline, Gabriel e Tiago por me mostrarem que bons trabalhos podem ser feitos de discussões sobre a vida regadas a café, tereré e queijo. Obrigado por me ensinarem que podemos ser sérios no trabalho sem perder a ternura com os nossos companheiros.

Aos grandes parceiros de graduação Adriano, Afonso, Ash, Dedé, Marcos Paulo, Goiás, Tonhão e Victor Hugo. Cada dia com vocês foi único e vou levar para sempre as nossas desventuras pelo interior a fora.

À todos os meus amigos de Santos e Cubatão que dividiram precisos momentos da nossa juvenil experiência cefetiana.

À Natália Yume, por todo amor, carinho, respeito e confiança que sempre depositou em mim. Por toda paciência em me ouvir e me reconfortar com suas palavras e seus abraços, mesmo nos dias mais escuros e complicados. Por entender que a nossa distância é o início da construção de planos e sonhos que vamos realizar juntos nos anos que virão. Não importam os quilômetros, pois você sempre está nos meus pensamentos, no fundo do meu coração. Te amo.

A todos os meus familiares, pelo apoio e confiança constate, por me fortalecerem pelo exemplo da perseverança que só aqueles que conquistaram a vida com o suor do próprio rosto podem mostrar do que somos verdadeiramente capazes. Minha avó, Joana, imagem singular de dedicação e gosto pelo trabalho. Meus pais, Renata e Francisco, obrigado por proporcionarem que todas as minhas conquistas fossem possíveis. Muito obrigado pela educação moral, familiar e profissional que presenciei durante estes 26 anos mesmo quando vocês se multiplicavam entre seus trabalhos e estudos. Graças a vocês, sei que nada é impossível se acreditarmos do fundo de nossas almas que podemos conseguir.

A todos, que mesmo aqui não citados, fizeram, fazem ou farão parte do meu aprendizado neste curto espaço de tempo que chamamos de vida.

Meus sinceros agradecimentos.

“A ciência humana é limitada, e quando eu tiver lhe ensinado matemática, física, história e as três ou quatro línguas vivas que falo, o senhor saberá o que sei;” ... “Aprender não é saber; há sabidos e sábios; é a memória que faz os primeiros, é a filosofia que faz os outros.”...
“Filosofia não se aprende; a filosofia é a reunião das ciências adquiridas pelo gênio que as aplica; a filosofia é a nuvem reluzente em que o Cristo pôs o pé para subir aos céus.”

Alexandre Dumas – “O Conde de Monte Cristo”

RESUMO

RAMOS, L.R. **Aplicação de biorreatores anaeróbios em diferentes temperaturas para produção de hidrogênio a partir de águas residuárias agroindustriais**. 2016. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2016.

Este estudo avaliou a influência do tempo de detenção hidráulica (TDH), da concentração de soro de queijo no afluente, da temperatura em faixa termofílica (55 a 75°C) e da cofermentação de vinhaça e soro de queijo na produção contínua de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidizado (RALF) e em reator anaeróbio de leito granular expandido, do inglês *expanded granular sludge bed* (EGSB). Foram utilizados sete reatores, sendo que em três reatores foi utilizada a configuração EGSB em temperatura mesofílica (30°C) alimentados em diferentes concentrações de soro de queijo inoculados com lodo mesofílico proveniente do tratamento de águas residuárias do abatedouro de aves (RM5, RM15 e RM25). Outros quatro reatores na configuração RALF foram operados na faixa termofílica foram inoculados com lodo termofílico proveniente do tratamento de vinhaça de cana de açúcar. Nestes foi avaliado o efeito da temperatura em faixa termofílica alimentado com soro de queijo (RTS) e vinhaça (RTV). Também foi avaliada cofermentação de vinhaça com soro de queijo (RTCv e RTCVS). Nos reatores RM5, RM15, RM25, RTS e RTV, foi observado o comportamento de elevação da produtividade volumétrica de H₂ (PVH) e na composição de H₂ no biogás partir da redução do TDH. No entanto, verificou-se redução do rendimento de H₂ (HY) em todos os reatores em valores reduzidos de TDH, alcançando valor máximo de $5,51 \pm 0,37$ mmol.g DQO⁻¹ (RTS). O aumento da concentração de soro de queijo no afluente favoreceu a produção de hidrogênio em reatores EGSB, com PVH máxima de $0,312 \pm 0,026$ L H₂.h⁻¹.L⁻¹ na concentração de 25.000mg lactose.L⁻¹ (RM25). Com a elevação da temperatura de 55°C para 75°C, a produção de hidrogênio foi reduzida devido dificuldade de adaptação da comunidade microbiana proveniente de inóculo originalmente termofílico. A estratégia de cofermentação possibilitou o aumento do HY no TDH de 8h, com valor máximo de $0,82 \pm 0,07$ mmol.g DQO⁻¹ (RTCVS). Os principais metabólitos relacionados com a elevada produção de hidrogênio foram os ácidos acético e butírico. Por outro lado, foram observadas elevadas concentrações de lactato em condições com baixa produção de hidrogênio.

Palavras-chave: Água residuária agroindustrial, co-substrato, vinhaça de cana de açúcar, soro de queijo, reator anaeróbio de leito fluidizado e reator anaeróbio de leito granular expandido.

ABSTRACT

RAMOS, L.R. **Application of anaerobic bioreactors in different temperatures for hydrogen production using agro-industrial wastewaters.** 2016. Dissertation (Masters) – Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2016.

The present evaluated the influence of hydraulic retention time (HRT), cheese whey substrate concentration, temperature in thermophilic range (55 a 75°C) and cofermentation of sugar cane stillage and cheese whey in continuous hydrogen production in anaerobic fluidized bed reactor (AFBR) and expanded granular sludge bed reactor (EGSB). Seven reactors were used, being three of them in EGSB configuration in mesophilic temperature (30°C) feed in different cheese whey concentrations were inoculated with mesophilic sludge from the poultry slaughterhouse wastewater (RM5, RM15 e RM25). Other four reactors in AFBR configuration, inoculated with thermophilic sludge from the treatment of sugarcane stillage, were operated in thermophilic range. In these it was evaluated the effect of temperature in thermophilic range using as substrate cheese whey (RTS) and sugar cane stillage (RTV). Also, it was evaluated the cofermentation of stillage with cheese whey (RTCv e RTCVS). In the reactors RM5, RM15, RM25, RTS and RTV, it was observed the volumetric H₂ production (HPR) and H₂ content increase behavior from the HRT decrease. However, there was a decrease in H₂ yield (HY) in lower HRT for all reactors, reaching a maximum of 5.51 ± 0.37 mmol.g DQO⁻¹ (RTS). The increase in cheese whey substrate concentration favored the hydrogen production in EGSB reactors, with maximum HPR of 0.312 ± 0.026 L H₂.h⁻¹.L⁻¹ in the concentration of 25,000mg lactose.L⁻¹ (RM25). The increase in temperature from 55°C to 75°C, the hydrogen production was reduced because of the difficult adaptation of the microbial community originally from a thermophilic sludge. The cofermentation strategy enabled the increase of HY in the HRT of 8h, with a maximum of 0.82 ± 0.07 mmol.g DQO⁻¹ (RTCVS). The main soluble metabolites related to hydrogen production were acetic and butyric acids. On the other hand, higher lactate concentrations were observed in conditions with low hydrogen production.

Keywords: Agroindustrial wastewater, co-substrate, sugarcane stillage, cheese whey, anaerobic fluidized bed reactor and expanded granular sludge bed reactor.

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 3.1 – Evolução da produção mundial de queijo..... | 9 |
| Figura 3.2 – Evolução da produção brasileira de queijo..... | 10 |
| Figura 3.3 - Diagrama de blocos da produção de etanol a partir de cana de açúcar..... | 16 |
| Figura 3.4 - Efeito da pressão parcial de hidrogênio na energia livre de Gibbs na reação de redução do próton H^+ a H_2 | 24 |
| Figura 4.1 – Esquema da instalação dos reatores..... | 55 |
| Figura 4.2 - Fotos do RALF e do material suporte..... | 56 |
| Figura 4.3 – Fotos do EGSB e dos grânulos antes e depois da adaptação..... | 58 |
| Figura 4.4 – Diagrama de blocos do procedimento geral da inoculação dos reatores..... | 62 |
| Figura 4.5 – Diagrama de blocos da análise do efeito da concentração de soro de queijo e do TDH em reator EGSB mesofílico..... | 65 |
| Figura 4.6 – Diagrama de blocos da análise do efeito da temperatura em RALF termofílico alimentado com soro de queijo..... | 67 |
| Figura 4.7 – Diagrama de blocos da análise do efeito da temperatura em RALF alimentado com vinhaça..... | 69 |
| Figura 4.8 - Diagrama de blocos da análise do efeito co-digestão de vinhaça e soro de queijo em RALF termofílico..... | 71 |
| Figura 5.1 – Variações dos valores fração molar de H_2 em função do TDH para diferentes concentrações de soro de queijo..... | 77 |
| Figura 5.2 – Variações dos valores de fração molar de CH_4 em função do TDH para RM5...78 | 78 |
| Figura 5.3 – Variação dos valores de PVH em função do TDH para diferentes concentrações de soro de queijo..... | 79 |
| Figura 5.4 – Variação dos valores de $PVCH_4$ em função do TDH para RM5..... | 80 |
| Figura 5.5 – Variação dos valores de HY em função do TDH para as diferentes concentrações..... | 81 |
| Figura 5.6 – Variação dos valores de CH_4Y em função do TDH para reator RM5..... | 81 |
| Figura 5.7– Distribuição principais dos metabólitos observados nos efluentes do reator RM5 em função do TDH..... | 85 |
| Figura 5.8– Distribuição principais dos metabólitos observados nos efluentes do reator RM15 em função do TDH..... | 85 |
| Figura 5.9 – Distribuição principais dos metabólitos observados nos efluentes do reator RM25 | |

| | |
|---|-----|
| em função do TDH..... | 86 |
| Figura 5.10 – Variações dos valores conteúdo de H ₂ em função do TDH para o RTS..... | 91 |
| Figura 5.11 – Variações dos valores conteúdo de H ₂ em função da temperatura para RTS..... | 92 |
| Figura 5.12 – Variação dos valores de PVH em função do TDH para RTS..... | 92 |
| Figura 5.13 – Variação dos valores de PVH em função da temperatura para RTS..... | 93 |
| Figura 5.14 – Variação dos valores de HY em função do TDH para RTS..... | 94 |
| Figura 5.15 – Variação dos valores de HY em função da temperatura para RTS..... | 95 |
| Figura 5.16 – Distribuição principais dos metabólitos observados nos efluentes do RTS..... | 99 |
| Figura 5.17 – Variação dos valores de composição de H ₂ em função do TDH para RTV..... | 104 |
| Figura 5.18 – Variação dos valores de composição de H ₂ em função da temperatura para RTV..... | 105 |
| Figura 5.19 – Variação dos valores de PVH em função do TDH para RTV..... | 105 |
| Figura 5.20 – Variação dos valores de PVH em função da temperatura para RTV..... | 106 |
| Figura 5.21 – Valores de rendimento de H ₂ (HY) em função do TDH para RTV..... | 107 |
| Figura 5.22 – Valores de rendimento de H ₂ (HY) em função da temperatura para RTV..... | 108 |
| Figura 5.23 – Distribuição dos principais metabólitos observados nos efluentes do RTV..... | 113 |
| Figura 5.24 – Variação dos valores de fração molar de H ₂ em função da condição de operação..... | 119 |
| Figura 5.25 – Valores de PVH para RTCV e RTCVS em função do TDH e da DQO afluente..... | 120 |
| Figura 5.26 – Valores de HY para RTCV e RTCVS em função do TDH e da DQO afluente..... | 121 |
| Figura 5.27 – Distribuição dos principais metabólitos observados nos efluentes do RTCV..... | 123 |
| Figura 5.28 – Distribuição dos principais metabólitos observados nos efluentes do RTCVS..... | 124 |
| Figura 5.29 – Rendimento e produtividade ótimos para cada reator..... | 126 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 3.1 – Oferta interna de energia do Brasil em 2015..... | 4 |
| Tabela 3.2 – Características do soro de queijo..... | 8 |
| Tabela 3.3 - Estudos comparativos para produção de hidrogênio a partir de soro de queijo.... | 10 |
| Tabela 3.4 - Composição de vinhaças de diferentes origens..... | 17 |
| Tabela 3.5 - Resultados de estudos para produção de hidrogênio a partir da vinhaça..... | 19 |
| Tabela 3.6 - Estudos avaliando o efeito da temperatura na produção de H ₂ | 25 |
| Tabela 3.7 - Principais resultados de estudos na produção termofílica de H ₂ | 33 |
| Tabela 4.1 - Identificação dos reatores utilizados em todos os experimentos..... | 52 |
| Tabela 4.2 - Composição do meio nutricional no afluente..... | 53 |
| Tabela 4.3 - Informação nutricional soro de queijo Elegê..... | 53 |
| Tabela 4.4 – Caracterização média da vinhaça de cana de açúcar..... | 54 |
| Tabela 4.5 - Características físicas da argila expandida..... | 56 |
| Tabela 4.6 - Diâmetro, densidade, porosidade e velocidade de mínima fluidização das partículas de argila expandida..... | 57 |
| Tabela 4.7 - Frequência das análises físico-químicas realizadas..... | 60 |
| Tabela 4.8 - Condições e parâmetros operacionais para avaliar o efeito da concentração de substrato e TDH em EGSB alimentado com soro de queijo..... | 64 |
| Tabela 4.9 – Condições e parâmetros operacionais para avalair o efeito da temperatura em RALF termofílico alimentado com soro de queijo..... | 66 |
| Tabela 4.10 – Condições e parâmetros operacionais para avaliar o efeito da temperatura em RALF alimentado com vinhaça..... | 68 |
| Tabela 4.11 - Condições e parâmetros operacionais para avaliar o efeito co-digestão de vinhaça e soro de queijo em RALF termofílico..... | 70 |
| Tabela 5.1 – Valores médios e desvios das conversões de açúcares totais e de matéria orgânica nas diferentes concentrações de soro de queijo..... | 74 |
| Tabela 5.2 – Valores médios e desvios do pH afluente e efluente nas diferentes concentrações de soro de queijo..... | 75 |
| Tabela 5.3 – Valores médios de SST, SSV e SSF para RM5, RM15 e RM25..... | 76 |
| Tabela 5.4 – Valores médios e desvios das frações molar de H ₂ e CH ₄ no biogás produzido nas diferentes concentrações de soro de queijo..... | 78 |
| Tabela 5.5 – Valores médios e desvios de PVH e PVCH ₄ em função do TDH nas diferentes | |

| | |
|---|-----|
| concentrações de soro de queijo..... | 80 |
| Tabela 5.6 – Valores médios e desvios de HY e CH ₄ Yem função do TDH e respectivas TCO nas diferentes concentrações..... | 82 |
| Tabela 5.7 – Valores de HY, PVH, TDH e TCO ótimos observados em estudos com soro de queijo..... | 83 |
| Tabela 5.8 – Distribuição dos metabólitos, HY e PVH nos reatores RM5, RM15 e RM25..... | 87 |
| Tabela 5.9 – Valores médios e desvios das conversões de açúcares totais e de matéria orgânica do reator RTS..... | 89 |
| Tabela 5.10 – Valores médios e desvios do pH afluente e efluente nas diferentes condições de operação do RTS..... | 90 |
| Tabela 5.11 – Valores médios de SST, SSV e SSF para RTS..... | 90 |
| Tabela 5.12 – Valores médios e desvios dos principais resultados obtidos na operação do RTS..... | 96 |
| Tabela 5.13 – Valores de HY, TDH e TCO observados em estudos com soro de queijo..... | 97 |
| Tabela 5.14 – Comparação de valores de HY relatados em estudos avaliando o efeito da temperatura..... | 98 |
| Tabela 5.15 – Principais metabólitos obtidos nas diferentes condições operacionais de operação do RTS..... | 100 |
| Tabela 5.16 – Valores médios e desvios das conversões de açúcares totais e de matéria orgânica no RTV..... | 102 |
| Tabela 5.17 – Valores médios e desvios do pH afluente e do pH efluente nas diferentes operações do RTV..... | 103 |
| Tabela 5.18 – Valores médios de SST, SSV e SSF para RTV..... | 104 |
| Tabela 5.19 – Valores médios e desvios dos principais resultados do RTV..... | 109 |
| Tabela 5.20 – Valores de HY, TDH e TCO ótimos observados em estudos com vinhaça..... | 110 |
| Tabela 5.21 – Comparação de valores de rendimento de hidrogênio relatados em estudos avaliando o efeito da temperatura..... | 110 |
| Tabela 5.22 – Principais metabólitos obtidos nas diferentes condições de operação do RTV..... | 113 |
| Tabela 5.23 - Valores médios e desvios das conversões da co-digestão de vinhaça e soro.... | 117 |
| Tabela 5.24 - Valores médios e desvios do pH afluente e efluente dos reatores de co- | |

| | |
|---|-----|
| digestão..... | 118 |
| Tabela 5.25 – Valores médios de SST, SSV e SSF para RTCV e RTCVS..... | 118 |
| Tabela 5.26 – Valores médios de fração molar de H ₂ nos experimentos de co-digestão..... | 119 |
| Tabela 5.27 – Variação dos valores de PVH na co-digestão de vinhaça com soro de queijo..... | 120 |
| Tabela 5.28 – Valores médios HY para RTCV e RTCVS..... | 121 |
| Tabela 5.29 – Valores de HY, PVH e TDH ótimos em trabalhos com vinhaça..... | 122 |
| Tabela 5.30 – Principais metabólitos observados nos reatores RTCV e RTCVS..... | 124 |
| Tabela 5.31 – Valores ótimos de rendimento de hidrogênio..... | 126 |
| Tabela 5.32 – Valores ótimos de produtividade de hidrogênio..... | 127 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|----------------------|---|
| ΔG^0 | Varição da Energia Livre de Gibbs Padrão |
| Acetil-CoA | Acetilcoenzima A |
| ASBR | Reator Anaeróbio Operado em Batelada Sequencial |
| ATP | Adenosina Trifosfato |
| $C_6H_{12}O_6$ | Glicose |
| $C_6H_{12}O_6$ | Galactose |
| $C_{12}H_{22}O_{11}$ | Lactose |
| CH_3COOH | Ácido Acético |
| $CH_3CH_2CH_2COOH$ | Ácido Butírico |
| CH_4 | Metano |
| CH_4Y | Rendimento de Metano |
| CO_2 | Dióxido de Carbono |
| $C_{ST,A}$ | Concentração de Carboidrato Total no Afluente |
| $C_{ST,E}$ | Concentração de Carboidrato Total no Efluente |
| CSTR | Reator de Mistura Ideal |
| DBO | Demanda Biológica de Oxigênio |
| DQO | Demanda Química de Oxigênio |
| EGSB | Reator Anaeróbio de Leito Granular Expandido |
| EtOH | Etanol |
| H_2 | Hidrogênio |
| H_2O | Água |
| H_2S | Sulfeto de Hidrogênio |
| H_2SO_4 | Ácido Sulfúrico |
| HAc | Ácido Acético |
| HBu | Ácido Butírico |
| HCl | Ácido Clorídrico |
| HLa | Ácido Lático |
| HPr | Ácido Propiônico |
| HY | Rendimento de produção de hidrogênio |
| LCA | Laboratório de Controle Ambiental |
| N | Nitrogênio |

| | |
|-------------|---|
| n_{H_2} | Taxa de Produção Molar de Hidrogênio |
| NADH | Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina |
| p_{H_2} | Pressão Parcial de Hidrogênio |
| PEC | Polímero Extracelular |
| PV_{CH_4} | Produtividade Volumétrica de Metano |
| PV_{H_2} | Produtividade Volumétrica de Hidrogênio |
| Q_A | Vazão Afluente |
| RALF | Reator Anaeróbico de Leito Fluidizado |
| RM5 | Reator EGSB Mesofílico com 5g carboidrato.L ⁻¹ |
| RM15 | Reator EGSB Mesofílico com 15g carboidrato.L ⁻¹ |
| RM25 | Reator EGSB Mesofílico com 25g carboidrato.L ⁻¹ |
| RTC | Reator Termofílico de Co-Fermentação Alimentado com Vinhaça |
| RTCVS | Reator Termofílico de Co-Fermentação com Vinhaça e Soro |
| RTS | Reator de Efeito da Temperatura Alimentado com Soro |
| RTV | Reator de Efeito da Temperatura Alimentado com Vinhaça |
| SST | Sólidos Suspensos Totais |
| SSV | Sólidos Suspensos Voláteis |
| TCO | Taxa de Carregamento Orgânico |
| TDH | Tempo de detenção hidráulica |
| UASB | Reator Anaeróbico de Manta de Lodo |
| V_{CH_4} | Taxa de Produção Volumétrica de Metano |
| V_{H_2} | Taxa de Produção Volumétrica de Hidrogênio |
| V_{mf} | Velocidade Mínima de Fluidização |
| V_R | Volume Real do Reator |

Sumário

| | |
|---|------|
| Resumo..... | i |
| Abstract..... | ii |
| Índice de Figuras..... | iii |
| Índice de Tabelas..... | v |
| Lista de Abreviaturas e Siglas..... | viii |
| 1.Introdução..... | 1 |
| 2. Objetivos..... | 3 |
| 3. Revisão Bibliográfica..... | 4 |
| 3.1 Importância do Hidrogênio e sua Produção Fermentativa..... | 4 |
| 3.2 Resíduos Utilizados na Produção de Hidrogênio..... | 7 |
| 3.2.1 Soro de Queijo..... | 7 |
| 3.2.2 Vinhaça de Cana de Açúcar..... | 14 |
| 3.3 Efeitos de Parâmetros Físico-Químicos..... | 20 |
| 3.3.1 Taxa de Carregamento Orgânico: Tempo de Detenção Hidráulica e Concentração de Substrato..... | 21 |
| 3.3.2 Temperatura..... | 22 |
| 3.4 Configurações de Reatores para Produção Fermentativa de Hidrogênio..... | 38 |
| 3.4.1 Reator Anaeróbico de Leito Fluidizado..... | 39 |
| 3.4.2 Reator Anaeróbico de Leito Granular Expandido..... | 44 |
| 3.5 Considerações Preliminares..... | 50 |
| 4. Materiais e Métodos..... | 52 |
| 4.1 Água Residuária..... | 52 |
| 4.1.1 Soro de Queijo..... | 53 |
| 4.1.2 Vinhaça de Cana de Açúcar..... | 54 |
| 4.2 Descrição dos Reatores..... | 54 |
| 4.2.1 Reator Anaeróbico de Leito Fluidizado Termofílico..... | 55 |
| 4.2.2 Reator Anaeróbico de Leito Granular Expandido Mesofílico..... | 57 |
| 4.3 Obtenção de Inóculo Produtor de Hidrogênio: Pré-tratamento Térmico..... | 58 |
| 4.3.1 Inóculo do Reator Anaeróbico de Leito Fluidizado Termofílico..... | 59 |
| 4.3.2 Inóculo do Reator Anaeróbico de Leito Granular Expandido Mesofílico..... | 59 |
| 4.4 Análises Físico-Químicas..... | 59 |
| 4.4.1 Metabólitos Solúveis..... | 60 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 4.4.2 | Determinação de Hidrogênio e da Composição do Biogás..... | 61 |
| 4.5 | Procedimento de Partida..... | 61 |
| 4.6 | Condições Operacionais dos Reatores..... | 62 |
| 4.6.1 | Análise do Efeito da Concentração de Substrato em Reator EGSB Alimentado com Soro de Queijo..... | 63 |
| 4.6.2 | Análise do Efeito da Temperatura em RALF Alimentado com Soro de Queijo..... | 65 |
| 4.6.3 | Análise do Efeito da Temperatura em RALF Alimentado com Vinhaça..... | 67 |
| 4.6.4 | Análise do Efeito da Co-digestão de Vinhaça e Soro de Queijo em RALF Termofílico..... | 69 |
| 4.7 | Parâmetros Operacionais..... | 71 |
| 5. | Resultados e Discussões..... | 74 |
| 5.1 | Efeito da Concentração de Substrato na Produção de Hidrogênio a partir de Soro de Queijo e do TDH em Reator EGSB Mesofílico..... | 74 |
| 5.2 | Efeito da Temperatura na Produção de Hidrogênio a partir de Soro de Queijo em RALF Termofílico..... | 89 |
| 5.3 | Efeito da Temperatura na Produção de Hidrogênio a partir de Vinhaça de Cana de Açúcar em RALF Termofílico..... | 102 |
| 5.4 | Efeito da Co-digestão de Vinhaça e Soro de Queijo em RALF Termofílico..... | 117 |
| 5.5 | Considerações Finais sobre as Melhores Condições Operacionais Observadas para a Produção de Hidrogênio..... | 126 |
| 6. | Conclusões..... | 129 |
| 7. | Sugestões..... | 131 |
| 8. | Referências Bibliográficas..... | 132 |

1. Introdução

O crescimento da demanda energética no século 21 expôs a dependência de combustíveis fósseis na economia global, uma fonte não renovável de energia e altamente poluidora. O uso do gás hidrogênio como fonte de energia é uma alternativa promissora, principalmente devido a sua característica não poluidora e alta eficiência de conversão energética. Entre as formas de produção de hidrogênio mais utilizadas, os processos biológicos têm uma demanda menor de energia, apresentam subprodutos de grande potencial econômico e utilizam matérias-primas renováveis.

Entretanto, a viabilidade econômica da produção fermentativa de hidrogênio depende do desenvolvimento de reatores e microrganismos que possam aprimorar rendimentos e produtividades a partir de matérias-primas ricas em carboidratos, econômicas e sustentáveis. Desta forma, os subprodutos agroindustriais tornam-se altamente atraentes devido ao seu baixo custo e elevado volume gerado.

Com este ponto de vista, a fermentação da vinhaça de cana de açúcar produzindo hidrogênio permite uma alternativa de destinação deste subproduto da indústria sucroalcooleira. Produzida na etapa de destilação após a fermentação do caldo de cana, o grande volume de vinhaça gerado desafia a indústria sucroalcooleira a encontrar formas alternativas de destinação. Atualmente a fertirrigação é a prática mais atrativa, regando o campo com a água e os fertilizantes inorgânicos presentes na vinhaça. Entretanto, a elevada concentração de matéria orgânica implica em um conjunto de impactos ambientais no solo. Desta forma, a produção de hidrogênio a partir da vinhaça associa recuperação energética, tratamento e destinação adequada ao reduzir a concentração de matéria orgânica na vinhaça a ser aplicada na fertirrigação do campo.

Outro subproduto de enorme valor agregado, o soro de queijo é uma opção viável para a produção de hidrogênio por vias biológicas. Fonte rica em carboidratos, este material é gerado durante a fabricação do queijo, na etapa de precipitação e remoção da caseína do leite. Apesar de uma enorme variedade de possibilidades de exploração, mais da metade da produção de soro de queijo não é tratada. Assim, a produção de hidrogênio torna-se uma alternativa conjunta às aplicações alimentícias do soro de leite, evitando competições econômicas.

Dentro do escopo da produção de hidrogênio, a aplicação de tecnologias que propiciem a co-fermentação de diferentes substratos enaltece a viabilidade da produção

biológica de hidrogênio. Esta estratégia de misturar compostos, preferencialmente águas residuárias, aprimora a tratabilidade e a disponibilidade da matéria orgânica de difícil conversão, melhorando a degradação microbiana de resíduos complexos. Além disso, as associações de águas residuárias possibilitam a complementação nutricional sinérgica entre estes resíduos. Deste forma, procura-se otimizar a associação de águas residuárias em co-fermentação para produção de hidrogênio.

Entre as configurações utilizadas para a produção biológica de hidrogênio, os sistemas de crescimento celular suspenso, como reator de mistura perfeita (CSTR), permitem elevada transferência de massa entre a comunidade microbiana e o substrato. Entretanto, a aplicação de reduzidos valores de tempo de detenção hidráulica (TDH) e, portanto, de elevadas taxas de carregamento orgânico (TCO) dificulta a manutenção da população produtora de hidrogênio no reator, ocasionando a lavagem de biomassa. De forma a dissociar o tempo de retenção da biomassa do TDH, as configurações de crescimento celular imobilizado utilizam um material suporte para formação de biofilme pelo crescimento das bactérias fermentativas, possibilitando o aumento da concentração de biomassa no reator. Nesta categoria, o reator anaeróbio de leito fluidizado (RALF) e o reator anaeróbio de leito granular expandido (EGSB) destacam-se por também favorecer a transferência de calor e de massa entre o meio fermentativo e o biofilme.

Dentre os parâmetros que influenciam a produção biológica de hidrogênio, a temperatura se destaca. O aumento da temperatura em uma faixa definida eleva as taxas das reações químicas e enzimáticas que ocorrem nas células dos microrganismos, acelerando as funções metabólicas e de crescimento celular. Além disso, as propriedades físicas e químicas da água residuária são alteradas. A elevação da temperatura no líquido reduz a solubilidade dos gases produzidos pelo processo biológico, como hidrogênio e CO₂. Esses efeitos da temperatura afetam de forma positiva o projeto e a operação de reatores e podem melhorar o rendimento de hidrogênio no processo. Mesmo assim, poucos estudos foram realizados na produção biológica de hidrogênio a partir de soro de leite utilizando o reator anaeróbio de leito fluidizado.

Em virtude destas considerações, o presente estudo investigou o processo contínuo de produção fermentativa de hidrogênio utilizando culturas mistas produtoras de biogás. Os diferentes experimentos avaliaram os efeitos singulares da concentração, TDH, TCO, temperatura e adição de co-substrato em função da capacidade de produção de hidrogênio e relacionados à distribuição dos metabólitos solúveis verificados nos reatores operados nas configurações RALF e EGSB alimentados com soro de queijo e vinhaça de cana de açúcar.

2. Objetivos

O objetivo geral deste estudo foi avaliar o efeito do TDH na produção de hidrogênio, etanol e ácidos orgânicos em reatores anaeróbios utilizando vinhaça de cana de açúcar e soro de queijo como fonte de carbono.

Visando alcançar o objetivo geral, foi proposta a compreensão aprofundada da operação dos reatores por meio dos seguintes objetivos específicos:

- a) Avaliar a influência da concentração de soro de queijo na produção mesofílica de hidrogênio em reatores EGSB;
- b) Estudar o efeito da temperatura na faixa termofílica na produção de hidrogênio a partir de soro de queijo em reator RALF;
- c) Avaliar o efeito da temperatura dentro da faixa termofílica na produção de hidrogênio a partir de vinhaça em reator RALF;
- d) Investigar a produção de H₂ pela estratégia de co-fermentação de vinhaça e soro de queijo em reator RALF termofílico;

3. Revisão Bibliográfica

3.1 Importância do Hidrogênio e sua Produção Fermentativa

A evolução da sociedade sempre foi associada ao uso de fontes de combustíveis que suprissem suas necessidades energéticas. Tendendo a formas mais eficientes, as tecnologias empregadas através dos tempos evoluíram desde madeira, gordura animal e carvão até o petróleo, gás natural e outras fontes de combustíveis fósseis. O uso indiscriminado destas fontes limitadas e a poluição gerada pela tecnologia atual afetam o clima, fauna e flora terrestres e ecossistemas aquáticos. Além disso, a dependência desta fonte não renovável expõe a fragilidade que o setor energético tem enfrentado nas últimas décadas. Atualmente no Brasil, que é líder mundial no uso de energias renováveis, apenas 41,7% da oferta interna de energia em novembro de 2015 foi de participação de fontes renováveis, como indicado na Tabela 3.1 (Ministério de Minas e Energia, 2015). Assim, o foco atual da evolução tecnológica de novas fontes de combustíveis deve convergir para a necessidade de alternativas renováveis, ambientalmente limpas e seguras associadas à viabilidade econômica e eficiência.

Tabela 3.1 – Oferta interna de energia do Brasil

| Especificação | Percentual de oferta (%) | |
|--------------------------|--------------------------|---------------|
| | Novembro 2014 | Novembro 2015 |
| Não renovável | 60,0 | 58,3 |
| Petróleo | 39,5 | 37,5 |
| Gás natural | 13,5 | 13,5 |
| Carvão mineral | 5,7 | 6,0 |
| Urânio | 1,3 | 1,3 |
| Renovável | 40,0 | 41,7 |
| Hidráulica | 11,5 | 11,3 |
| Lenha e carvão vegetal | 8,1 | 8,3 |
| Produtos da cana | 15,7 | 16,6 |
| Outras fontes renováveis | 4,7 | 5,5 |

Fonte: Ministério de Minas e Energia (2015)

Entre as alternativas estudadas, o hidrogênio é de grande interesse, pois apresenta a maior fração de energia por massa entre todos os combustíveis conhecidos (142 kJ.g^{-1}) e sua combustão gera apenas água, não poluindo o ambiente (Das e Veziroglu, 2008). Além disso, o hidrogênio é compatível com processos eletroquímicos e de combustão para conversão energética sem a emissão de compostos de carbono que contribuam a poluição ambiental (Levin, Pitt e Love, 2004).

Segundo Das e Veziroglu (2001), atualmente o hidrogênio é produzido principalmente de combustíveis fósseis pelos processos de reforma a vapor do gás natural, craqueamento térmico do gás natural, oxidação parcial de hidrocarbonetos e gaseificação do carvão. Alternativas a estes métodos que utilizam combustíveis fósseis são a eletrólise da água, a fotólise da água e a produção biológica de hidrogênio. Porém, processos termoquímicos e eletroquímicos consomem grandes quantidades de energia e muitas vezes são muito poluidores. Por outro lado, os processos de produção biológica de hidrogênio podem ser operados em temperaturas e pressões ambientes, consumindo menos energia.

Os processos de produção biológica envolvidos na produção de hidrogênio podem ser classificados em biofotólise da água usando algas e cianobactérias, fotodecomposição de compostos orgânicos por bactéria fotossintética, produção fermentativa de hidrogênio a partir de compostos orgânicos e sistemas híbridos usando bactérias fotossintéticas e fermentativas. Os dois primeiros processos citados necessitam da presença da luz para ocorrerem, enquanto a produção fermentativa, também chamada de acidogênese, apresenta vantagens como maiores taxas de produção que aqueles obtidos com processos fotobiológicos e a capacidade de trabalhar ao longo do dia por muito tempo, independentemente da fonte de luz (dark fermentation) (Das & Veziroglu, 2001). Além disso, a fermentação anaeróbia possibilita a produção de hidrogênio por processos simples a partir de uma enorme gama de substratos, principalmente resíduos (Das e Veziroglu, 2008).

O hidrogênio é um componente chave no metabolismo de muitos microrganismos. Culturas puras de *Clostridium* ou *Enterobacter* são usualmente estudadas para a produção fermentativa de hidrogênio. As espécies do gênero *Clostridium* são gram positivas, em forma de bastonetes e anaeróbias restritas formadoras de endósporos. As espécies do gênero *Enterobacter* são gram negativas, em forma de bastonetes e anaeróbias facultativas (Wang e Wan, 2009).

Segundo Hallenbeck (2009), dependendo do microrganismo, a produção de hidrogênio pode ser catalisada pela enzima NiFe hidrogenase (enterobacteriaceae) ou por [FeFe] hidrogenase (clostridia). A etapa da glicólise é comum a ambos, oxidando uma molécula de glicose para duas moléculas de piruvato, gerando duas moléculas de dinucleótido de nicotinamida e adenina na sua forma reduzida (NADH), importante transportador de elétrons, e duas moléculas de adenosina trifosfato (ATP) para armazenar energia.

Na fermentação mista realizada pela família de enterobacteriaceae o piruvato é convertido em acetilcoenzima A (acetil-CoA) e formiato sem a produção imediata de equivalentes redutores. Não há vantagem para que estas bactérias produzam hidrogênio a não

ser que o metabolismo ativo cause uma queda no pH do meio induzindo a conversão de ácido fórmico a hidrogênio pelas enzimas formato desidrogenase e NiFe hidrogenase para aliviar a acidificação. Como o hidrogênio é produzido a partir do formiato e no máximo 2 formiatos são formados por glicose, no máximo 2 mol H₂. mol glicose⁻¹ podem ser produzidos pela fermentação mista por bactérias entéricas. O acetil-CoA pode ser convertido de forma otimizada a acetato para produzir ATP ou em etanol para balancear os elétrons da glicólise. Entretanto, condições ácidas favorecem a conversão de piruvato a lactato transformando o NADH em sua forma oxidada (NAD⁺). Neste caso a produção de ácido láctico é onerosa para rota produtora de hidrogênio, pois, apesar de aliviar a tensão do meio devido ao pH ácido, consome NADH utilizado na de produção de hidrogênio (Hallenbeck, 2009).

No caso da classe clostridia, que são anaeróbios restritos, o piruvato é convertido a acetil coenzima A (acetil-CoA) e CO₂, produzindo ferredoxina reduzida. A ferredoxina reduzida transfere os elétrons para a [FeFe] hidrogenase, garantindo a produção de hidrogênio. Com isso, 2 mols de hidrogênio são produzidos por mol de glicose consumida. Ao contrário de outros microrganismos de fermentação mista, organismos anaeróbios produtores de hidrogênio possuem uma rota metabólica que os possibilita, em condições de baixa pressão parcial de hidrogênio, associar a oxidação de NADH ao processo de redução da ferredoxina. Portanto, estes organismos são capazes de produzir mais hidrogênio pela reoxidação do NADH gerado durante a glicólise. Como 2 mols de NADH são produzidos durante a glicólise, 2 mols adicionais de hidrogênio podem ser gerados, totalizando 4 mol H₂. mol glicose⁻¹. Caso não existam condições para a oxidação do NADH para produção de hidrogênio, rotas metabólicas com produtos mais reduzidos são favorecidas, como a produção de ácido butírico ou etanol (Hallenbeck, 2009).

Segundo Show *et al.* (2012), apesar dos fatores positivos da fermentação biológica de hidrogênio como a alta taxa de produção, baixa demanda energética, fácil operação e sustentabilidade, esta tecnologia ainda necessita maior eficiência e confiabilidade em escala industrial. A utilização do hidrogênio em processos eletroquímicos e de combustão para conversão energética necessita de taxas de produção elevadas o suficiente para alimentar células a combustível (Levin, Pitt e Love, 2004). Na prática, rendimentos de hidrogênio elevados estão associados a produção de ácido butírico e ácido acético. Sabendo o perfil metabólico real da comunidade microbiana utilizada, é possível direcionar a rota metabólica para uma maior razão de acetato/butirato e reprimir os consumidores de hidrogênio para que a fermentação tenha o maior rendimento de hidrogênio possível (Show *et al.*, 2012).

3.2. Resíduos Utilizados na Produção de Hidrogênio

De acordo com Show *et al* (2012), a produção de hidrogênio só é renovável caso a matéria prima utilizada seja renovável. Entretanto, viabilidade econômica deste processo necessita de uma fonte rica em carboidratos, pois a hidrólise de proteínas, gerando aminoácidos, e de lipídeos, gerando ácidos graxos de cadeia longa, não produz substratos para possíveis rotas de fermentação a hidrogênio (Hallenbeck, 2009). Recursos em potencial para a produção renovável de biohidrogênio são os subprodutos de processos agroindustriais, madeiras e resíduos de seu processamento, resíduos de processamento de alimentos, algas marinhas, efluentes da pecuária, entre outros. Muitos dos processos que produzem hidrogênio a partir de biomassa são complementares aos processos de produção de biomateriais. Portanto, países de grandes economias agrícolas têm potencial para se desenvolverem economicamente de forma significativa ao incorporarem a bioenergia na bioindústria. Os principais critérios para seleção de substratos adequados para a produção biológica de hidrogênio são a disponibilidade, o custo, a pureza do substrato e a sua biodegradabilidade (Show *et al.*, 2012).

3.2.1 Soro de Queijo

Dentro destes critérios, o soro de queijo é uma opção viável para a produção de hidrogênio. O soro de queijo é o líquido de coloração verde amarelada remanescente da precipitação e remoção da caseína do leite durante a fabricação do queijo. Este subproduto representa de 85% a 95% do volume do leite e retém 55% dos nutrientes do leite. Entre os nutrientes mais abundantes estão a lactose, proteínas solúveis, lipídeos e sais minerais (Siso, 1996).

O leite usado influencia nas características do queijo e do soro de queijo produzido. Como exemplo, soro de queijo bovino contém de 70 a 80% de lactose, 9% de proteínas e de 8 a 20% de minerais. O soro de ovelha tem uma razão nitrogênio por matéria seca maior e tem o dobro de proteínas solúveis (Carvalho, Prazeres e Rivas, 2013). Dessa forma, o leite deve ser padronizado por pré-tratamentos e pasteurização para possível produção de queijo. Este leite é então acidificado por bactérias lácticas produzindo ácido láctico ou pela adição direta de ácido (lactato ou HCl). Então tem início a etapa essencial para a produção de queijo, que envolve a coagulação da caseína para formar um gel que aprisione a gordura do leite. Dependendo do

processo de precipitação da caseína, o soro de queijo pode ser de dois tipos. O soro de queijo doce é obtido na coagulação pela proteólise induzida por enzimas selecionadas, como a quimiosina, processo comumente chamado de coagulação Rennet. A maioria das variedades de queijo são produzidas por esta coagulação enzimática, como por exemplo os queijos mussarela, cheddar, suíço e parmesão. O soro ácido é obtido pela acidificação até pH 4,6, ocasionando na coagulação isoeletrica da caseína e sua precipitação com sais, produzindo variedades como *cream cheese*, cottage, fromage, ricotta e outras variedades de queijos frescos. O soro de queijo produzido é então drenado do coalho formado que será processado e maturado em queijo (Fox *et al.*, 2000).

A maior fração da carga orgânica do soro de queijo doce é referente a lactose do leite (39-60 kg.m⁻³). Os valores de demanda biológica de oxigênio (DBO) variam de 27 a 60kg.m⁻³ e os de demanda química de oxigênio (DQO) variam de 50 a 102kg.m⁻³. No caso do soro ácido, observa-se alto conteúdo de matéria orgânica (60 a 80g.L⁻¹), maior salinidade, vinda da adição complementar de sais de cloreto de cálcio. Além disso, contém alta concentração de lactose (50g.L⁻¹) mas apresenta conteúdo inferior de vitaminas, aminoácidos e proteínas, tendo uso limitado no setor alimentício devido ao gosto ácido e alto conteúdo de sais entre 1,2 e 1,6g.L⁻¹, o dobro do soro doce (Carvalho, Prazeres e Rivas, 2013). Em ambos os casos, a relação de DBO/DQO é normalmente maior que 0,5, adequado para tratamento por processos biológicos. Os altos conteúdos de sódio, pH ácido (3-6,5) e alcalinidade reduzida afetam a eficiência do tratamento biológico. De forma geral, o soro de queijo (doce ou ácido) é um efluente rico em nutrientes, contendo de 93-94% de água, lactose, proteínas solúveis, minerais, ácido lático e gorduras (Prazeres, Carvalho e Rivas, 2012). Na Tabela 3.2 estão apresentadas as principais características do soro de queijo doce e ácido.

Tabela 3.2 – Características do soro de queijo

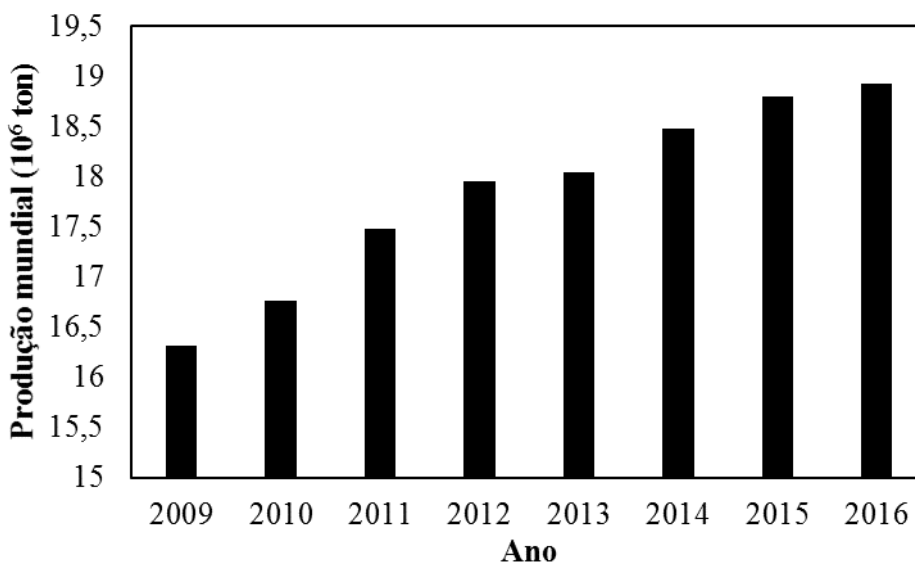
| Característica | Soro doce | Soro ácido |
|---------------------------------|--------------|------------|
| pH | 3,8 - 6,5 | 3,0 - 6,0 |
| Lactose (kg.m ⁻³) | 39 | 50 |
| Lipídeos (kg.m ⁻³) | 0,99 a 10,58 | 0,49 |
| Proteínas (kg.m ⁻³) | 1,4 a 8 | 0,5 a 8 |
| DQO (kg.m ⁻³) | 30 a 50 | 60 a 80 |
| DBO (kg.m ⁻³) | 27 a 60 | 30 |
| N (kg.m ⁻³) | 0,2 - 1,76 | 2 |
| P (kg.m ⁻³) | 0,124 - 0,54 | 0,28 |

Fonte: Prazeres, Carvalho e Rivas, 2013

Segundo Siso (1996), na produção de 1 kg de queijo, 9 kg de soro são produzidos. Apesar de uma enorme variedade de possibilidades de exploração, mais da metade da produção de soro de leite não é aproveitada devido a baixa concentração de componentes do leite, sendo descartada de forma inadequada. O soro de queijo pode causar excesso do consumo de oxigênio, impermeabilização, eutrofização e toxicidade dos ambientes onde ocorre o despejo (Prazeres, Carvalho e Rivas, 2012).

Como ilustrado na Figura 3.1, a produção mundial de queijo está em crescimento, podendo chegar a quase de 19 milhões de toneladas de queijo no final de 2016. O Brasil segue a tendência mundial, ilustrada na Figura 3.2, com perspectiva de chegar a 766 mil toneladas de queijo produzido em 2016 (United States Department of Agriculture, 2015). Com isso serão produzidos 171 milhões de toneladas de soro de leite no mundo, sendo 6,9 milhões de toneladas produzidas apenas no Brasil.

Figura 3.1 – Evolução da produção mundial de queijo



Fonte: United States Department of Agriculture (2015)

Na literatura encontram-se diferentes estudos de processos de fermentação anaeróbia a partir de soro de leite (Venetsaneas *et al.*, 2009), soro de leite diluído (Azbar *et al.*, 2009) e solução de soro de leite em pó (Kargi, Eren e Ozmihci, 2012a) realizados para a produção de hidrogênio. A produção molar de hidrogênio pode alcançar valor máximo de rendimento de 8,0mol H₂.mol lactose⁻¹ pela rota acética e 4,0mol H₂.mol lactose⁻¹ pela rota butírica, como mostrado nas equações 3.1 e 3.2. A Tabela 3.3 apresenta os principais estudos comparativos da produção de hidrogênio utilizando soro de queijo como substrato em diferentes configurações de reatores.

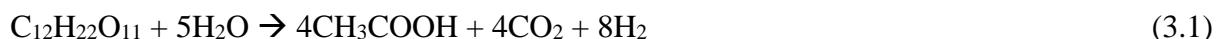
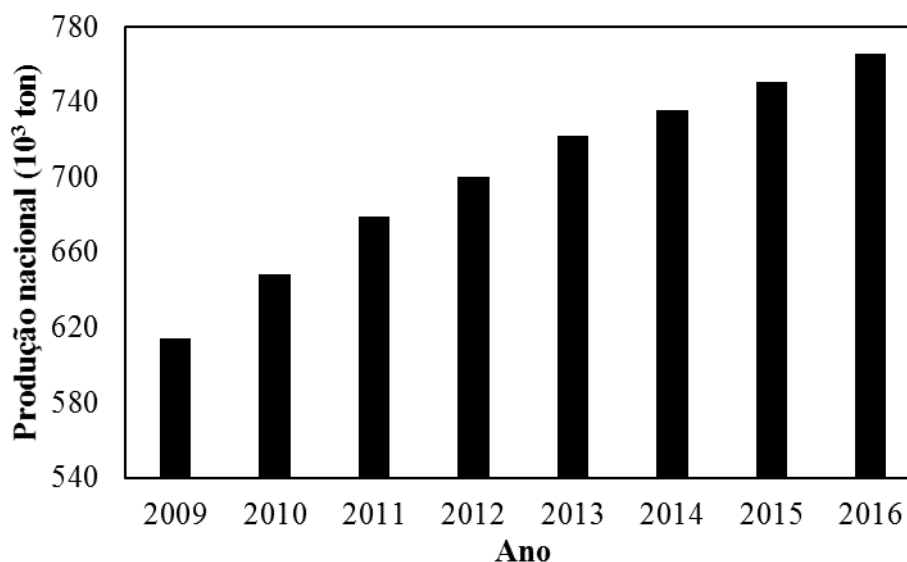


Figura 3.2 – Evolução da produção brasileira de queijo



Fonte: United States Department of Agriculture (2015)

Tabela 3.3 - Estudos comparativos para produção de hidrogênio a partir de soro de queijo

| Referência | Reator | TDH _{ótimo} (h) | TCO _{ótima} (kg.m ⁻³ .d ⁻¹) | PVH (L.h ⁻¹ .L ⁻¹) | HY (mmol.g DQO ⁻¹) | Metabólitos |
|--|---------------|-----------------------------|--|---|--|-----------------------|
| Collet <i>et al.</i> (2004) | CSTR | 35,7 | 6,7 | - | 3 mol H ₂ .mol lac ⁻¹ | HAc; EtOH; HLa |
| Yang <i>et al.</i> (2007) | CSTR | 24 | 14 | - | 2,3 | HAc; HBu EtOH |
| Azbar <i>et al.</i> (2009) | CSTR | 3,5 dias | 21 | - | 22 | HAc; HBu HLa; HFo |
| Castelló <i>et al.</i> (2009) | UASB | 12 | 20 | 122 mL H ₂ .L ⁻¹ .d ⁻¹ | - | HAc; HBu HPr |
| Davila-Vazquez <i>et al.</i> (2009) | CSTR | 6 | 184,4 | 1,14 | 2,8 mol H ₂ .mol lac ⁻¹ | HBu; HPr HAc |
| Venetsaneas <i>et al.</i> (2009) | CSTR | 24 | 30 | 2,9 | 0,78 mol H ₂ .mol glic ⁻¹ | HBu; HAc EtOH; HLa |
| Carrillo-Reyes <i>et al.</i> (2012) | UASB | 6 | 20 | 0,38 L H ₂ .L ⁻¹ .d ⁻¹ | - | HPr; HAc HBu |
| Perna <i>et al.</i> (2013) | Leito Fixo | 24 | 37 | 1,0 | 1,1 mol H ₂ .mol lac ⁻¹ | HAc; HBu HPr; HLa |
| Carrillo-Reyes <i>et al.</i> (2014) | UASB | 8 | 48 | 1,67 L H ₂ .L ⁻¹ .d ⁻¹ | - | HAc; HBu HPr |

CSTR – Reator de mistura ideal; HAc – Ácido acético; HBu – Ácido butírico; HFo – Ácido fórmico; HLa – Ácido láctico; HPr – Ácido propiônico; TCO – Taxa de carregamento orgânico; UASB – Reator anaeróbio de manta de lodo

Yu e Fang (2001) investigaram a influência da concentração do substrato (2-30 g.L⁻¹) na acidificação da água residuária da indústria de laticínios em reatores em batelada e um reator anaeróbio de manta de lodo (UASB) a 37°C. Observou-se que entre os constituintes do substrato, os carboidratos foram acidificados com maior eficiência, seguido pelas proteínas e com menor eficiência no caso dos lipídeos. Os resultados apresentados indicaram efeitos consideráveis da DQO do afluente na produção de hidrogênio e na distribuição dos produtos da acidificação. A taxa de produção de biogás foi elevada com o aumento da DQO da água residuária, reduzindo a produção de metano para níveis não detectáveis a partir de 8 g DQO.L⁻¹ em favorecimento da produção de hidrogênio, aumentando a sua pressão parcial para 0,52 atm em 12 g DQO.L⁻¹. Nesta condição, os principais metabólitos foram o acetato (584 mg.L⁻¹), propionato (701 mg.L⁻¹) e etanol (292 mg.L⁻¹). O efeito mais significativo do aumento da DQO do afluente foi o aumento das frações de propionato, propanol e butanol em detrimento do acetato e butirato, indicando que as rotas metabólicas presentes foram influenciadas significativamente pela concentração do substrato.

Utilizando a metodologia de superfície de resposta, Yang, Yu e Hwang (2003) avaliaram condições que maximizassem as taxas de produção dos ácidos acético e butírico com relação aos efeitos simultâneos do pH, temperatura e tempo de detenção hidráulica usando água residuária de soro de leite (10000 mg DQO.L⁻¹). A condição ótima obtida para a produção de ácido acético foi no TDH de 9,6 horas, pH 6,0 e temperatura de 54,1°C obtendo uma produção de ácido acético de 955,2 mg.L⁻¹.dia⁻¹ e de ácido butírico de 543 mg.L⁻¹.dia⁻¹.

Ferchichi *et al.* (2005) estudaram a influência do pH inicial (5-10) sobre a produção mesofílica (30°C) de hidrogênio a partir de soro de leite utilizando a *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*. A taxa de produção de hidrogênio e o rendimento obtiveram comportamentos similares, indicando que as culturas com valores menores de pH obtiveram melhores resultados. Os valores máximos de taxa de produção e de rendimento foram de 28,3 mL.hr⁻¹ e 7,89 mmol.g lactose⁻¹, respectivamente, no pH 6.

Buscando produzir hidrogênio a partir da água residuária da indústria de laticínios com uma comunidade mista de microrganismos, Mohan, Babu e Sarma (2007) variaram a taxa de carregamento orgânico (2,4, 3,5 e 4,7 kg DQO.m⁻³.dia⁻¹) de um reator anaeróbio de batelada seqüencial (AnSBR) no TDH de 24 horas e temperatura de 28°C. O rendimento e a produtividade máximos de 0,0245 mmol H₂. gDQO⁻¹ e 1,105 mmol H₂.m⁻³.min⁻¹, respectivamente, foram obtidos na taxa de carregamento orgânico de 3,5 kg DQO.m⁻³.dia⁻¹. O aumento da taxa de carregamento orgânico garantiu uma maior disponibilidade de substrato, acelerando a atividade do metabolismo, caracterizado pela concentração máxima de 3010

mg.L⁻¹ de ácidos. Com a produção de ácidos, o pH foi gradualmente reduzido de 6 para valores inferiores a 4,5, considerada a faixa ideal para o funcionamento das bactérias anaeróbias e inibição das bactérias metanogênicas.

Yang *et al.* (2007) estudaram em modos de operação em batelada e contínuo a fermentação anaeróbia de água residuária de soro de leite para produção de hidrogênio usando uma cultura mista. Nos experimentos em batelada o valor máximo de rendimento de hidrogênio de 10 mM H₂.g DQO⁻¹ foi obtido em DQO de 5 g.L⁻¹, produzindo principalmente os ácidos butírico e acético. Nos experimentos conduzidos em modo contínuo de mistura completa (CSTR), o valor máximo de rendimento de hidrogênio foi de 2,0 mM. g DQO⁻¹ na taxa de carregamento orgânico de 14 g DQO.L⁻¹.dia⁻¹ (TDH de 24 horas), com etanol e ácido acético produzidos em maiores rendimentos com baixos níveis de ácido propiônico. Observou-se que maiores taxas de carregamento orgânico podem ser eficientes para maiores produções de hidrogênio se as bactérias não forem inibidas pelo substrato aplicado. A faixa de pH entre 4,0 e 5,0 foi mais favorável para a fermentação de soro de leite. Entretanto, em valores reduzidos de taxa de carregamento orgânico, biofilmes foram formados nas paredes do biorreator e em materiais floculentos suspensos que favoreceram o crescimento de metanogênicos, mesmo com a queda do pH abaixo de 5,0, que deveria ser inibitório para este tipo de microrganismo.

A produção fermentativa de hidrogênio em condições termofílicas (55°C) utilizando lactose como substrato com um inóculo de cultura mista foi investigada por Calli *et al.* (2008) analisando o efeito do pH no rendimento de hidrogênio, taxas de produção e tipos de fermentação. Experimentos em batelada alimentada foram realizados com lactose controlando o pH nos valores de 5,0, 5,3, 5,5, 5,7 e 6,0. O valor máximo de rendimento de 3,43 mol H₂.mol lactose⁻¹ foi observado no pH 5,3, com prevalência de acetato e butirato. A maior taxa de produção de hidrogênio de 57,5 mL.L⁻¹.hr⁻¹ foi encontrada no pH 5,7 no seu segundo experimento. Os principais motivos para os baixos rendimentos de hidrogênio foram o efeito repressor da elevada pressão parcial de hidrogênio resultando na mudança da rota metabólica de produção de acetato para produção de butirato; a inibição dos produtores de hidrogênio por bactérias produtoras de ácido lático e o consumo do hidrogênio produzido para produção de acetato.

O estudo da cinética de produção de hidrogênio usando uma população mista a partir de glicose, lactose ou soro de leite em pó em experimentos em modo batelada foi realizado por Davila-Vazquez *et al.* (2008). Os valores de concentração inicial foram variados de 5 a 25 g.L⁻¹ com ponto central de 15 g.L⁻¹, enquanto os valores de pH foram variados de 4,5 a 7,5,

com ponto central no valor de 6,0. A composição de hidrogênio foi de 50-55%, a composição de CO₂ foi de 50-45% e metano foi detectado quando soro de queijo foi utilizado como substrato. O maior valor para rendimento de hidrogênio para a lactose foi de 3,6 mol H₂.mol lactose⁻¹ no valor de pH de 7,5 e no valor de concentração inicial de 5g.L⁻¹, observando uma tendência para os valores de rendimento de hidrogênio serem mais elevados em valores menores de concentração inicial e em valores maiores de pH. No caso da produção volumétrica utilizando lactose, o efeito do valor inicial de pH foi mais pronunciado, onde o maior valor experimental de produção volumétrica de hidrogênio foi de 5,6 mmol H₂.L⁻¹.h⁻¹. No caso do soro de leite em pó, o valor máximo de rendimento de hidrogênio de 3,1 mol H₂.mol lactose⁻¹ foi encontrado no pH 6,0 na concentração inicial de 15 g.L⁻¹, com o aumento da concentração inicial reduzindo os valores de rendimento. Os valores de produção volumétrica de hidrogênio com soro de leite aumentaram com o aumento da concentração inicial e do pH inicial, com valor máximo de produção volumétrica de 8,1 mmol H₂.L⁻¹.h⁻¹ no pH inicial de 7,5 e concentração inicial de 25 g.L⁻¹. A análise dos ácidos produzidos indicou a prevalência dos ácidos acético e butírico, com ácido propiônico sendo produzido em menores quantidades.

Azbar *et al* (2009) investigaram o processo de fermentação anaeróbia contínua para a produção de hidrogênio a partir do soro de queijo em condições termofílicas. Duas estratégias diferentes de carregamento orgânico foram utilizadas: variar o TDH mantendo constante a DQO; variar a DQO mantendo constante do TDH em um reator de mistura (CSTR) a 55°C. Avaliando o efeito da DQO afluente o TDH foi mantido no valor de 1 dia. A taxa de produção máxima de biogás de 13,2 L.dia⁻¹ foi observada na TCO de 47 g DQO.L⁻¹.dia⁻¹. Por outro lado, ao reduzir a TCO para 35 g DQO.L⁻¹.dia⁻¹ o rendimento máximo de 9 mmol H₂.g DQO⁻¹ foi observado. Os principais metabólitos foram acetato, propionato, butirato, isobutirato e lactato. Com a redução da TCO a produção de ácido láctico foi favorecida e metano foi identificado no biogás, indicando a presença de metanogênicos. Foi especulado que apesar das bactérias metanogênicas serem lavadas pelo baixo tempo de retenção hidráulico, parte delas aderiu as paredes do reator, resultando na produção de metano.

Na segunda parte do estudo de Azbar *et al* (2009), o efeito do TDH na produção de hidrogênio foi investigado mantendo constante a concentração do afluente em 47 g DQO.L⁻¹, mas reduzindo o TDH de 3,5 para 1 dia. O rendimento de hidrogênio foi máximo no TDH de 3,5 dias, com o valor de 22 mmol H₂.g DQO⁻¹. Com o aumento da taxa de carregamento orgânico pela subsequente redução do TDH para 1 dia o rendimento de hidrogênio foi reduzido para 4,7 mmol H₂.g DQO⁻¹. Os ácidos acético, propiônico, láctico e fórmico foram os

principais ácidos orgânicos produzidos em todos os valores de TDH testados. A principal bactéria identificada durante as condições boas e ruins de operação foi a *Thermoanaerobacteriaceae bacterium*, indicando que a população produtora de hidrogênio foi viável durante o tempo de cultura, mas sofreu variações devido a mudança dos parâmetros físico-químicos.

Experimentos em batelada com soro de queijo foram realizados por Kargi, Eren e Ozmihci (2012a) nas concentrações de 5,2 a 28,5g açúcares totais.L⁻¹ para avaliar a produção termofílica de hidrogênio a 55°C. A maior produção cumulativa de hidrogênio de 257 mL foi observada com 20g açúcares totais.L⁻¹. Observou-se que este aumento foi devido a limitações de substrato em baixas concentrações. Entretanto o aumento da concentração de açúcares resultou no aumento da concentração de ácidos, principalmente acético, butírico e láctico, causando inibição por substrato e por produtos. Assim, os maiores rendimentos de hidrogênio foram obtidos em baixas concentrações, com valor máximo de 1,03 mol H₂.mol glicose⁻¹ na concentração de 9,5g açúcares totais.L⁻¹.

De forma a comparar condições mesofílicas e termofílicas de produção de hidrogênio, Kargi, Eren e Ozmihci (2012b) realizaram experimentos em batelada utilizando soro de queijo (10,77 g açúcares totais.L⁻¹) cultivados nas temperaturas de 35 °C e 55 °C. Entre os resultados principais, observou-se que a fermentação termofílica obteve melhor rendimento de hidrogênio de 0,81 mol H₂. mol glicose⁻¹ em comparação com a temperatura mesofílica (0,47 mol H₂. mol glicose⁻¹). Além disso as concentrações finais de ácidos na condição termofílica (4,67g.L⁻¹) foram inferiores as obtidas na temperatura mesofílica (5,87g.L⁻¹). Apesar de a produção de hidrogênio ser proporcional a formação de ácidos, o rendimento obtido está relacionado a rota metabólica. Dependendo da bactéria dominante em cada temperatura e da rota utilizada, mais hidrogênio pode ser produzido com menor geração de ácidos como subprodutos. Assim, apesar de adaptações mais longas serem necessárias, a fermentação termofílica obteve melhores resultados devido a eliminação de bactérias consumidoras de hidrogênio e seleção de produtores de hidrogênio mais eficientes na elevada temperatura.

3.2.2 Vinhaça de Cana de Açúcar

Com o crescimento populacional associado ao desenvolvimento da atividade econômica a demanda energética cresceu rapidamente nas últimas décadas. Principais componentes da matriz energética mundial, os combustíveis fósseis devem ser reprimidos

devido as emissões de gases do efeito estufa e impactos no aquecimento global associados aos seus usos. Neste contexto, o uso do etanol tornou-se atrativo dentre as maiores economias globais. O Brasil é um dos maiores produtores de etanol no mundo e a cada litro produzido, 10 a 15 litros de vinhaça são gerados (Moraes, Zaiat e Bonomi, 2015)

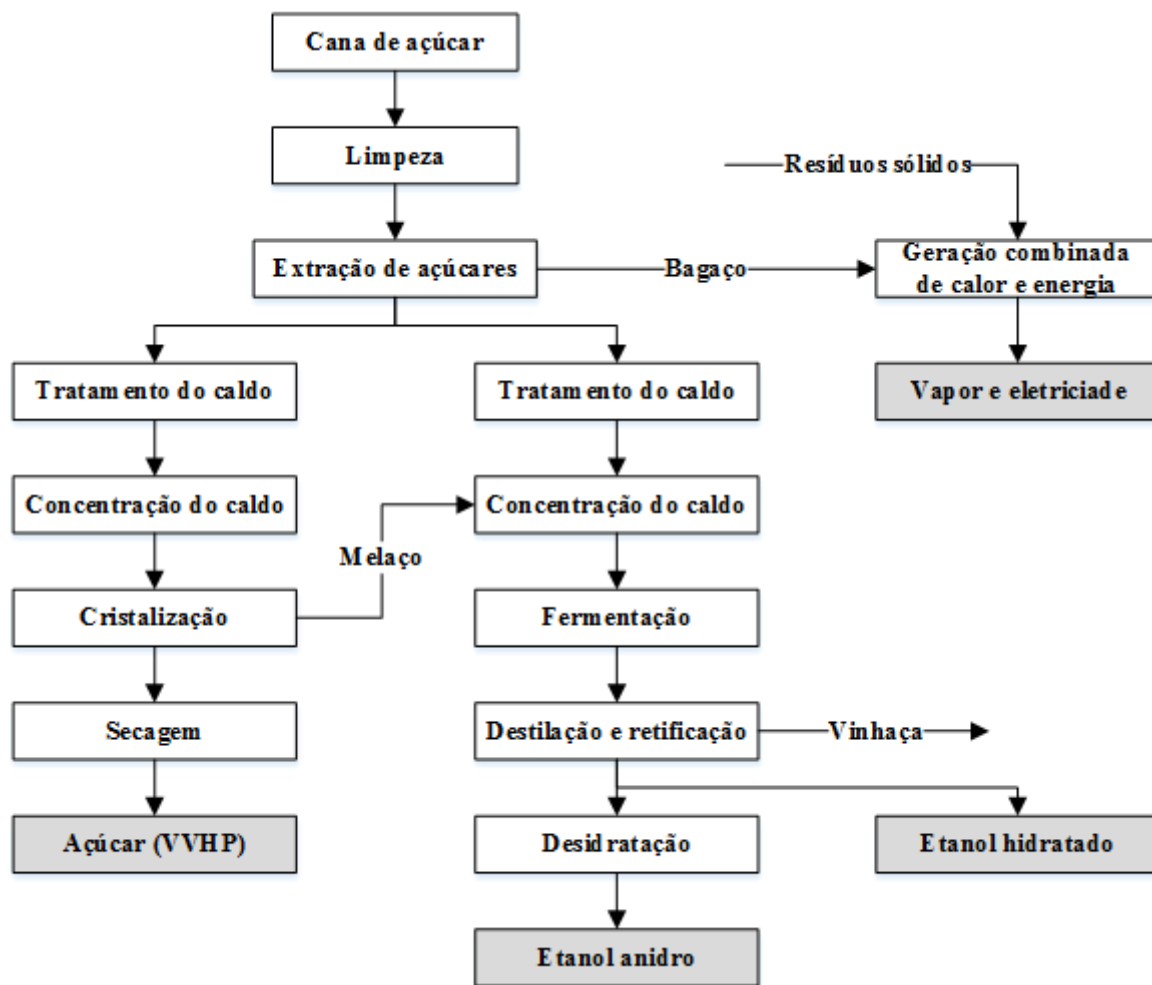
A disseminação do uso de fontes renováveis de energia em favor da sustentabilidade econômica e ambiental favorece o uso de bicomcombustíveis, especialmente em países como o Brasil que se sobressai nas aplicações do etanol a partir de cana de açúcar. A grosso modo a mudança para o etanol reduziria as emissões de gases do efeito estufa. Entretanto a produção deste biocombustível gera grandes volumes de água residuária, principalmente a vinhaça, que constitui um problema ambiental complexo dependendo da sua destinação final (Moraes, Zaiat e Bonomi, 2015).

As matérias primas convencionais para a produção de etanol incluem as baseadas em sacarose e as baseadas em amido. As matérias primas baseadas em açúcar incluem as plantações de beterrabas e de cana de açúcar. Os caldos de beterraba e cana contém açúcares redutores que estão disponíveis para as leveduras sem a necessidade de pré-tratamento, a não ser pela moagem. Entretanto, o preço do açúcar o mercado controla a implementação da produção de etanol. Dessa forma, o etanol é normalmente um subproduto da produção de açúcar, realizando a fermentação do melaço, que é o resíduo da etapa de cristalização do açúcar (Wilkie, Riedesel e Owens, 2000).

O etanol é produzido a partir da fermentação do caldo de cana de açúcar, mas em plantas com produção anexa de etanol e açúcar uma fração do caldo de cana é direcionada para a produção de açúcar enquanto que o remanescente é misturado com melaço para produção de etanol. A maioria das indústrias no Brasil mantém a produção concomitante de álcool e açúcar, possibilitando a flexibilidade econômica em função das demandas de mercado. A Figura 3.3 ilustra o diagrama de blocos do processo de produção de etanol a partir de cana de açúcar (Moraes, Zaiat e Bonomi, 2015).

Com a otimização dos processos, as plantas de álcool e açúcar atuais são autossuficientes energeticamente utilizando a queima do bagaço como fonte de energia. Com o desenvolvimento futuro de novas tecnologias, a produção de etanol a partir do bagaço (etanol de segunda geração) será viável economicamente. Utilizando o conceito de biorrefinaria, que integra a produção de combustíveis, energia e subprodutos, torna-se necessária a aplicação da energia produzida pelo biogás para redirecionar a aplicação do bagaço para a exclusiva produção de etanol (Moraes, Zaiat e Bonomi, 2015).

Figura 3.3 - Diagrama de blocos da produção de etanol a partir de cana de açúcar



Fonte: Moraes, Zaiat e Bonomi (2015)

A produção de açúcar e etanol necessita da recuperação e utilização de subprodutos para aprimorar a eficiência do processo. Além disso, deve possibilitar o despejo adequado dos subprodutos de forma ambientalmente responsável. A sustentabilidade ótima ocorrerá quando cada subproduto gerar retorno econômico máximo e impacto ambiental mínimo. Desta forma é válido minimizar o descarte de subprodutos que possam gerar retorno financeiro através de beneficiamento. A fermentação é normalmente operada em modo batelada e após o seu fim, o vinho contendo entre 2 a 12% de etanol é enviado as colunas de destilação para purificação do etanol a 95%. No fundo destas colunas os componentes menos voláteis do vinho formam a vinhaça (Wilkie, Riedesel e Owens, 2000).

As características da vinhaça apresentam grandes variações e dependem da qualidade da matéria prima e do processo. Entre os principais componentes encontrados na vinhaça estão o potássio, fósforo, sulfato, ácido lático, glicerol, etanol, aminoácidos, ácido acético, compostos fenólicos, melanoidinas e açúcar residual (Wilkie, Riedesel e Owens, 2000).

Devido as grandes quantidades de vinhaça gerada, tratamentos alternativos a fertirrigação devem ser propostos. As características da vinhaça variam dependendo do processo utilizado e durante a safra, devido as diferenças de composição da cana de açúcar a ser moída durante o ano. De forma geral, a vinhaça apresenta coloração escura e consiste de 93% de água e 7% de sólidos orgânicos e minerais (Christofoletti *et al.*, 2013). Na Tabela 3.4 estão apresentadas as principais características da vinhaça.

A vinhaça apresenta elevadas concentrações de componentes orgânicos e nutrientes (potássio, nitrogênio e fósforo). Origina-se na etapa de destilação do mosto/vinho, saindo do fundo do destilador entre 85 e 90°C. A presença de melanoidinas e alta concentração de ácidos orgânicos induzem a cor marrom escura e o baixo pH, respectivamente. Atualmente, a fertirrigação é a principal destinação da vinhaça pelo seus baixos custos e aplicação como fertilizante. Entretanto a legislação vigente é considerada superficial, pois restringe a aplicação da vinhaça apenas avaliando a concentração de potássio. A composição química relacionada a alta concentração de ácidos orgânicos e os impactos ambientais associados a emissões de gases estufa, salinização do solo e contaminação do lençol freático, não são apreciados da devida forma (Moraes, Zaiat e Bonomi, 2015).

Tabela 3.4 - Composição de vinhaças de diferentes origens

| Parâmetros | Matéria-prima da vinhaça | | |
|--|--------------------------|-------------|-------------|
| | Caldo de cana | Melaço | Mistura |
| pH | 3,7 - 4,6 | 4,2 - 5,0 | 3,9 - 4,6 |
| DBO (g.L ⁻¹) | 6,0 - 17,0 | 11,3 - 39,0 | 20,0 |
| DQO (g.L ⁻¹) | 15,0 - 33,0 | 22,0 - 84,9 | 31,5 - 45,0 |
| Potássio (mg.L ⁻¹) | 0,6 - 2,0 | 2,3 - 12 | 1,2 - 3,8 |
| Nitrogênio (mg.L ⁻¹) | 0,2 - 0,7 | 0,07 - 1,23 | 0,37 - 0,7 |
| Sulfato (mg.L ⁻¹) | 0,2 - 1,4 | 1,2 - 3,5 | 0,15 - 1,3 |
| Cálcio (mg.L ⁻¹) | 0,1 - 0,32 | 0,3 - 3,6 | 0,46 - 3,3 |
| Magnésio (mg.L ⁻¹) | 0,1 - 0,3 | 0,3 - 0,9 | 0,29 - 0,4 |
| Fósforo _{Total} (mg.L ⁻¹) | 0,004 - 0,25 | 0,04 - 0,2 | 0,37 - 0,7 |

Fonte: Moraes, Zaiat e Bonomi (2015)

Os principais compostos químicos presentes na vinhaça são os ácidos orgânicos (especialmente acetato e lactato), carboidratos residuais e alcoóis (glicerol e etanol). A presença de sulfato na vinhaça é originária da adição do ácido sulfúrico a suspensão de células de levedura para controle bacteriano da fermentação alcoólica. A composição da vinhaça também varia durante o período de safra devido a variação da composição da matéria prima

vinda das diferentes condições de maturação e crescimento em solos com diferentes características nutricionais; e variações no processo durante a operação da fermentação e destilação (Moraes, Zaiat e Bonomi, 2015).

O programa brasileiro de produção de etanol iniciou suas atividades nos anos 70 devido a crise do petróleo que incentivou a busca por fontes alternativas de combustível. Apesar do aprimoramento das leis sobre tratamento, reuso e descarte da vinhaça no setor sucroalcooleiro, as políticas atuais provam ser ineficientes. Com a proibição do descarte direto da vinhaça em corpos de água a alternativa encontrada foi a aplicação da vinhaça como fertilizante para as plantações de cana de açúcar, também conhecido como fertirrigação. O regulamento do estado de São Paulo estabelece diretrizes para a aplicação desta técnica prevendo impactos causados pela vinhaça no solo, água e lençóis freáticos de acordo com a concentração de potássio. Entretanto, a concentração de matéria orgânica e os impactos atmosféricos devido a emissões gasosas são desprezados (Moraes, Zaiat e Bonomi, 2015).

As principais alternativas sugeridas para a aplicação da vinhaça de cana de açúcar são a fertirrigação, concentração da vinhaça e produção de energia. A fertirrigação consiste na infiltração da vinhaça bruta no solo pela irrigação das plantações de cana de açúcar. Quando aplicada desta forma possibilita a fertilização do campo, reduzindo o uso de fertilizantes químicos, focando no uso racional dos recursos com baixo custo de investimento e de manutenção. Entretanto, a aplicação direta da vinhaça no solo pode causar percolação de metais para o lençol freático, salinização, desbalanceamento nutricional e aumento da toxicidade do solo. Além disso, parâmetros desconsiderados pela regulamentação, como as características do solo, retenção de água e proximidade de corpos de água devem ser apreciados (Christofoletti *et al.*, 2013).

Devido ao grande volume gerado, a concentração da vinhaça por evaporação torna-se uma alternativa. Após sua concentração, o produto obtido pode ser utilizado na produção de alimentos para pecuária ou para melhorar a qualidade da vinhaça como fertilizante. Também pode-se queimar a vinhaça concentrada para gerar energia ou reduzir o consumo de água da fábrica. Entretanto, o alto gasto energético necessário para evaporar parte da presente água é a principal restrição (Christofoletti *et al.*, 2013).

Neste contexto a aplicação da digestão anaeróbia torna-se atrativa possibilitando a conversão da matéria orgânica presente na vinhaça em energia. Além disso, o conteúdo inorgânico é mantido na vinhaça biodigerida, mantendo o seu potencial como fertilizante. Apesar das vantagens da aplicação desta tecnologia, vários desafios dificultam a sua implementação, principalmente devido a falta do desenvolvimento do conhecimento científico

do bioprocesso aplicado a resíduos com alto grau de especificidade (Moraes, Zaiat e Bonomi, 2015). A Tabela 3.5 apresenta os resultados de alguns dos diversos estudos com reatores anaeróbios para a produção de hidrogênio a partir de vinhaça.

Avaliando o efeito da taxa de carregamento orgânico na produção de hidrogênio, Ferraz Júnior et al. (2014) utilizaram 4 reatores de leito fixo operando a 55°C e em valores de TDH entre 24 a 8h, correspondendo a valores de TCO entre 36,2 a 108,8 kg DQO.m⁻³.dia⁻¹. A conversão de matéria orgânica resultou na produção dos ácidos acético, butírico e propiônico. Os valores máximos de produtividade e de rendimento de hidrogênio de 1023 mL H₂.d⁻¹.L⁻¹ e 2,4 mol H₂.mol carboidrato⁻¹ (0,7 mmol H₂.g DQO⁻¹) foram obtidos no valor de TDH de 12h, correspondendo a TCO de 72,4kg DQO.m⁻³.dia⁻¹. Ao aumentar a TCO para o valor de 108,6kg DQO.m⁻³.dia⁻¹, o rendimento e a produtividade de hidrogênio obtidos foram reduzidos em 63,9% e 42,8%, respectivamente. Ao compilar os dados de biologia molecular observou-se que o número de cópias de Fe-hidrogenase foi máximo na condição de maior rendimento de hidrogênio e a principal sequência genética foi 99% similar a *Thermoanaerobacterium*.

Tabela 3.5 - Resultados de estudos para produção de hidrogênio a partir da vinhaça

| Referências | Reator | TDH (h) | HY | HPR | Metabólitos |
|---------------------------------------|------------|-------------|---|--|----------------|
| Kongjan <i>et al.</i> (2010a) | UASB | 3 e 1 dia | 212 mL H ₂ .g açúcar ⁻¹ | 821 mL H ₂ .L ⁻¹ .dia ⁻¹ | Hac; Hla; Hbu |
| Luo <i>et al.</i> (2010a) | CSTR | 72,0 - 16,0 | 85 mL H ₂ . g SV ⁻¹ | 3600 mL H ₂ .L ⁻¹ .dia ⁻¹ | Hbu ;Hac; EtOH |
| Sreethawong <i>et al.</i> (2010) | AnSBR | 48 - 12,8 | 186 mL H ₂ .g DQO _{rem} ⁻¹ | 3800 mL H ₂ .L ⁻¹ .dia ⁻¹ | Hbu; Hac; Hpr; |
| Qiu, Wen e Jia (2011) | CSTR | - | 172 mL H ₂ .g SV ⁻¹ | 789 mL H ₂ .dia ⁻¹ | Hac; Hla; Hpr; |
| Searmsirimongkol <i>et al.</i> (2011) | AnSBR | 32 - 13 | 172 mL H ₂ .g DQO _{rem} ⁻¹ | 3310 mL H ₂ .L ⁻¹ .dia ⁻¹ | Hbu; Hac; Hpr |
| Ferraz Júnior <i>et al.</i> (2014) | Leito fixo | 24 - 8 | 0,77 mmol H ₂ .g DQO ⁻¹ | 1023 mL H ₂ .d ⁻¹ .L ⁻¹ | Hac; Hbu; HPr; |

Em operações de longa duração, o crescimento da biomassa no leito fixo pode reduzir a taxa de carregamento orgânico específica. Desta forma, mesmo em concentração inicial constante, a disponibilidade de substrato pode ser reduzida. Assim, Ferraz Júnior, Etchebere e Zaiat (2015) estudaram a influência em longo prazo (60 dias) da operação de reator anaeróbio de leito fixo em elevada taxa de carregamento orgânico (84,2 kg DQO.m⁻³.d⁻¹) na produção termofílica de hidrogênio usando vinhaça como substrato (35,2 g DQO.L⁻¹) no TDH de 10,2h. Metano não foi observado na operação do reator e a fração média de hidrogênio no biogás foi de 38,7%. Entretanto, apesar de a TCO ser mantida constante, a taxa de

carregamento orgânico específica foi reduzida de 1,38 a 0,72g carboidratos totais.g SV⁻¹.h⁻¹ durante a operação do reator, causando flutuações na produção de hidrogênio até a sua interrupção no dia 60. Durante a produção de hidrogênio os valores máximos de produtividade e de rendimento foram de 2284mL H₂.d⁻¹.L⁻¹ e 3,7mol H₂.mol carboidrato⁻¹, respectivamente, na taxa de carregamento orgânico específica de 0,98g carboidratos totais.g SV⁻¹.h⁻¹. Os principais metabólitos produzidos foram os ácidos acético, butírico e propiônico. Organismos pertencentes a gêneros reconhecidos como produtores de hidrogênio (*Caloramator*, *Clostridium*, *Oxobacter*, *Thermoanaerobacterium*, *Thermohydrogenium* e *Megasphaera*) foram identificados em amostras coletadas no meio e no final da operação do reator. Estes resultados indicam que o uso de lodo termofílico adaptado a vinhaça de cana de açúcar pode enriquecer a comunidade produtora de hidrogênio e inibir os consumidores de hidrogênio autóctones.

3.3 Efeitos de Parâmetros Físico-Químicos

As alternativas para contornar as barreiras de custo de produção e de baixo rendimento de hidrogênio estão relacionadas ao desenvolvimento de novas técnicas de engenharia metabólica, modificação genética de microrganismos e a avaliação do efeito de parâmetros físico-químicos no processo (Das e Veziroglu, 2008). Desta forma, cabe a microbiologia realizar a análise da fisiologia e da estrutura da comunidade microbiana, identificando e selecionando os microrganismos responsáveis pela produção, consumo, competição por substrato e auxílio na produção de hidrogênio.

Por outro lado, a engenharia tem como objetivo o aprimoramento do projeto e do desempenho de diferentes biorreatores que otimizem a produção de hidrogênio de forma a reduzir custos avaliando o efeito de parâmetros físico-químicos no processo. Estes parâmetros modificam continuamente as condições ambientais que regulam a fisiologia e a estrutura da comunidade microbiana. Sabendo o perfil metabólico real dos microrganismos, é possível direcionar a rota metabólica de forma a otimizar a produção de hidrogênio controlando os parâmetros físico-químicos como pH, intensidade de mistura, tempo de detenção hidráulica, taxa de carregamento orgânico, nutrientes e temperatura (Khanal et al, 2004).

3.3.1 Taxa de Carregamento Orgânico: Tempo de Detenção Hidráulica e Concentração de Substrato

A TCO de relaciona a quantidade de água residuária pelo volume do reator. Por ser uma variável de projeto, determina a capacidade e quais as condições de operação do reator. Definir a faixa de operação da taxa de carregamento orgânico é fundamental para otimizar a produção de hidrogênio. Variando a taxa de carregamento orgânico pode-se modificar as rotas metabólicas, a conversão de substrato e a comunidade microbiana presente no reator. Assim, torna-se possível a produção contínua de hidrogênio de forma estável maximizando o rendimento (Gioannis *et al.*, 2013).

Os parâmetros que constituem a TCO são a concentração de matéria orgânica e o TDH. A concentração de substrato deve ser selecionada de forma a suprir as necessidades de crescimento microbiano e de produção de hidrogênio e o seu aumento pode garantir uma produção de hidrogênio estável em alto rendimento (Santos *et al.*, 2014a). Entretanto, concentrações de matéria orgânica em excesso diminuem a conversão de substrato e o rendimento de hidrogênio devido ao acúmulo de compostos inibitórios no meio, reduzindo a competitividade dos produtores de hidrogênio em relação a outros microrganismos (Intanoo *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2014a; Barca *et al.*, 2015).

O TDH indica o tempo que a matéria orgânica permanece no reator. Este tempo depende da taxa de metabolização da matéria orgânica pela comunidade microbiana, podendo variar de acordo com o processo. O TDH pode ser usado para selecionar uma comunidade produtora de hidrogênio dependendo do substrato utilizado. A conversão de resíduos contendo açúcares simples necessita de valores reduzidos de TDH, enquanto que resíduos mais complexos precisam ter seus componentes hidrolisados a açúcares monoméricos, necessitando de valores elevados de TDH para sua conversão. Dessa forma, valores reduzidos de TDH podem diminuir a conversão de matéria orgânica. Entretanto, a redução do TDH possibilita o aumento da produtividade de hidrogênio. Estes valores reduzidos favorecem o crescimento de bactérias produtoras de hidrogênio e resultam em maiores taxas de alimentação de substrato ao reator, aumentando a sua disponibilidade. Até certo ponto, o rendimento de hidrogênio também pode ser elevado. Mas valores muito reduzidos de TDH ocasionam na conversão incompleta do substrato para componentes intermediários no processo de produção de hidrogênio, limitando cineticamente o rendimento (Barca *et al.*, 2015). Quanto maior o TDH de operação do reator, maior o seu custo. Portanto, o projeto

de reatores menores operando em valores reduzidos de TDH pode viabilizar economicamente a produção de hidrogênio.

3.3.2 Temperatura

Por ser um processo mediado por microrganismos, a produção fermentativa de hidrogênio tem como um de seus principais parâmetros físico-químicos a temperatura do meio, influenciando a atividade enzimática das hidrogenases, a produtividade e o rendimento de hidrogênio, alterando rotas metabólicas, selecionando a comunidade microbiana e modificando as propriedades físicas e químicas da água residuária. Segundo Lettinga, Rebac e Zeeman (2001), a solubilidade de compostos gasosos presentes no líquido diminui com a elevação da temperatura do meio. Isso implica em menores concentrações de CH₄, H₂, CO₂ e H₂S dissolvidos no efluente do reator, aumentando as suas concentrações no biogás. O emprego da temperatura no processo de produção de hidrogênio apresenta dois interesses, um está diretamente ligado ao aumento da atividade microbiana acidogênica e outro envolve a inativação dos microrganismos consumidores de hidrogênio (Huang et al., 2004).

A atividade microbiana é influenciada pela temperatura nas taxas de crescimento e nas rotas metabólicas preferenciais aos microrganismos. Com aumento da temperatura, as reações químicas e enzimáticas na célula ocorrem em taxas mais elevadas, acelerando o crescimento. Entretanto, acima da temperatura ótima, os componentes celulares essenciais são desnaturados, impossibilitando o crescimento. Portanto, o aumento da temperatura em uma faixa definida melhora as funções metabólicas e de crescimento até certo ponto onde as reações de desnaturação predominam. Assim, as reações fermentativas apresentam faixas ótimas de temperaturas que melhoram as funções metabólicas e de crescimento em condições mesofílicas (25-40°C), termofílicas (40-65°C), termofílicas extremas (65°C-80°C) ou hipertermofílicas (>80°C) (Sinha e Pandey, 2011; Zhang, Ren e Wang, 2012).

A maioria dos estudos foram realizados em condições mesofílicas que são as condições ideais para o crescimento e atividade de muitas bactérias produtoras de hidrogênio dos gêneros *Clostridium* e *Enterobacter* (Van Niel et al., 2002). A condição mesofílica é preferível à condição termofílica quando considerados única e exclusivamente os pontos de vista econômico e tecnológico. Se um alto rendimento de hidrogênio for obtido de forma estável nestas condições, pois a energia necessária para cultivar e manter a comunidade termofílica é aproximadamente 2,5 vezes maior que o caso de um reator mesofílico (Raj, Talluri e Christopher, 2012). Entretanto, quando a fermentação mesofílica ocorre, a presença

de bactérias não produtoras de hidrogênio é um problema crítico na sustentabilidade do processo interferindo na estrutura da comunidade microbiana produtora de hidrogênio, como a competição por substrato induzindo a produção de inibidores (Nokie *et al.*, 2002).

Por outro lado, processos termofílicos apresentam maior resistência a contaminação metanogênica, patogênica e de outros microrganismos não produtores de hidrogênio. A produção termofílica de hidrogênio se beneficia de algumas vantagens ao realizar processos em temperaturas elevadas, como viscosidade reduzida, melhor mistura, maior facilidade em manter condições anaeróbias, maiores taxas de reação, baixa solubilidade do hidrogênio e a subsequente facilitação da transferência de massa da fase líquida para fase vapor. As bactérias termofílicas e hipertermofílicas apresentam conversão mais eficiente de uma variedade de substratos complexos produzindo uma menor gama metabólitos secundários, conduzindo o metabolismo á rota acética que produz maiores quantidades de hidrogênio e de ATP (Talabardon, Schwitzguébel e Péringer, 2000; Verhaart *et al.*, 2010; Pawar e van Niel, 2013; Roy, Vishnuvardhan e Das, 2014). Estas vantagens sobre os processos mesofílicos, resultam em maiores produtividades e rendimentos de hidrogênio (Kargi, Eren e Ozmihci, 2012b).

De acordo com Sinha e Pandey (2011), o efeito da temperatura na produção de hidrogênio pode ser explicado termodinamicamente considerando as mudanças na energia livre de Gibbs e na entalpia padrão da conversão de glicose á acetato e assumindo o rendimento teórico de 4 mol H₂. mol glicose⁻¹ como ilustrado na equação abaixo.

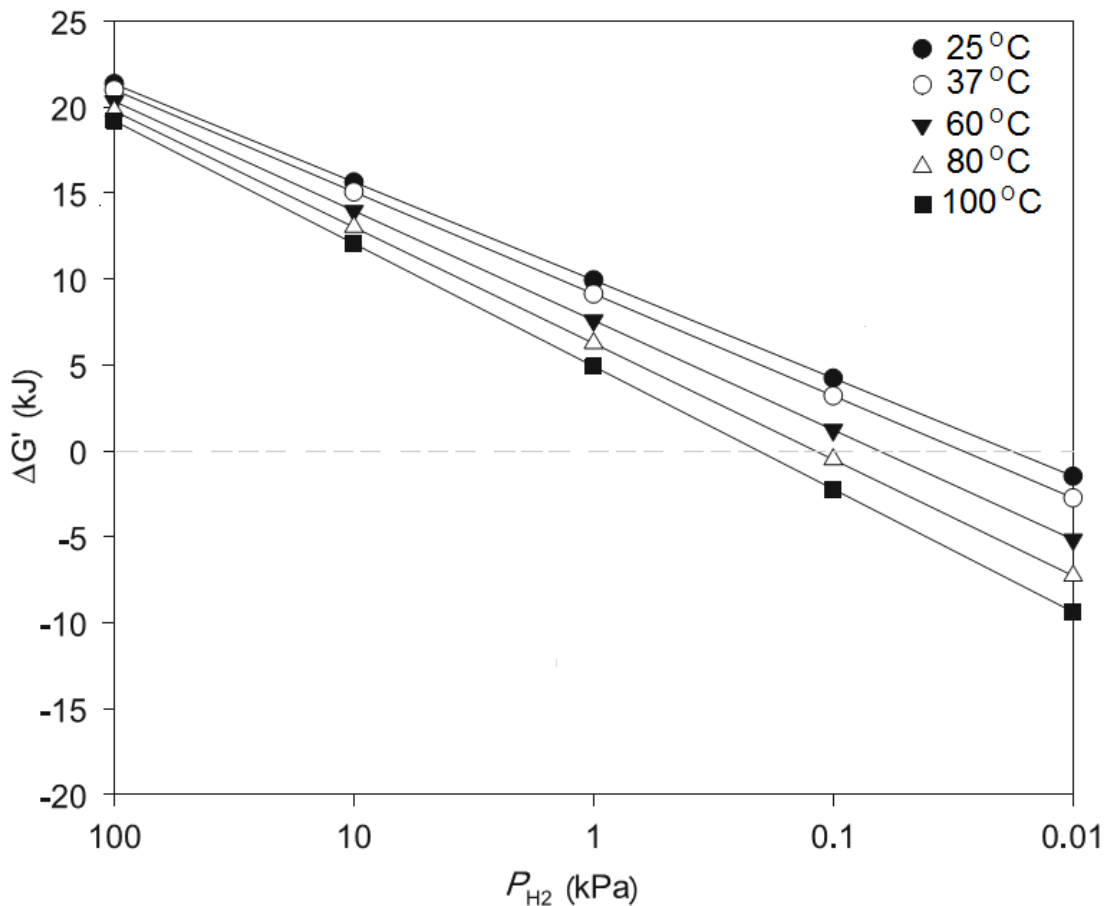


Valores de rendimento inferiores ao teórico são atribuídos a produção de hidrogênio termodinamicamente desfavorável em p_{H₂}>0,028 kPa e condições fisiológicas padrões (0,25M de substrato, 37°C e pH 7). A reação usando NADH na redução de um próton para gerar H₂ tem energia livre de Gibbs positiva (21kJ), indicando a sua não espontaneidade. Nestas condições estressantes de elevada pressão parcial de hidrogênio os microrganismos tendem a mudar o seu metabolismo para a produção de etanol e ácido láctico, que são mais favoráveis com ΔG⁰ de -27,5 kJ e - 25,0 kJ, respectivamente (Raj, Talluri e Christopher, 2012; Pawar e van Niel, 2013).

Por outro lado, microrganismos termofílicos apresentam maiores tolerâncias a p_{H₂}. Avaliando variação na energia livre de Gibbs em diferentes temperaturas e pressões parciais de hidrogênio na Figura 3.4, pode-se observar que esta reação torna-se termodinamicamente favorável em baixas pressões parciais de hidrogênio e que os limites termodinâmicos para a pressão parcial de hidrogênio aumentam para até 0,114 kPa em temperaturas entre 60°C e 80°C (Raj, Talluri e Christopher, 2012).

Muitos efluentes industriais, como o soro de queijo e a vinhaça, são produzidos em altas temperaturas. Portanto, tratar estes efluentes em condições mesofílicas requer um pré-resfriamento que aumenta os custos e corre o risco de perder a atividade da biomassa caso o sistema de resfriamento falhe (Yu e Fang, 2000). Assim, efluentes industriais com elevada carga orgânica gerados em altas temperaturas são atraentes substratos para produção termofílica de hidrogênio (Roy *et al.*, 2014). Alguns estudos foram realizados na investigação do efeito da temperatura na produção fermentativa de hidrogênio. Os seus principais resultados são apresentados na Tabela 3.6.

Figura 3.4 - Efeito da pressão parcial de hidrogênio na energia livre de Gibbs na reação de redução do próton H^+ a H_2



Fonte: Raj, Talluri e Christopher (2012)

Huang *et al.* (2004) observaram que a temperatura afetava a produção de H_2 . Os autores verificaram que a atividade das bactérias produtoras de hidrogênio foi acelerada a temperaturas mais elevadas, o que não ocorreu da mesma forma para microrganismos hidrogenotróficos. Portanto, aumentar a temperatura pode aumentar a habilidade das bactérias de produzir hidrogênio, mas a temperatura em níveis muito elevados reduz esta produção.

Tabela 3.6 - Estudos avaliando o efeito da temperatura na produção de H₂

| Referências | Reator | T (°C) | Substrato | HY | Metabólitos |
|-----------------------------------|----------|-----------------|-------------------------------|---|---------------------|
| Gilroyed <i>et al.</i> (2008) | Batelada | 36 a 60 | Esterco de vaca | 65 L H ₂ . kg ST ⁻¹ (52°C) | Hbu;Hac |
| Wang e Wan (2008) | Batelada | 20 a 55 | Glicose | 275 mL H ₂ . g glicose ⁻¹ (40°C) | Hac; EtOH |
| Akutsu <i>et al.</i> (2009) | CSTR | 35 e 55 | Amido | 2,8 mol H ₂ .mol glicose ⁻¹ (55°C) | Hac; Hbu |
| Karadag <i>et al.</i> (2009) | Batelada | 45 a 62 | Glicose | 1,7 mol H ₂ .mol glicose ⁻¹ (52°C) | Hac; Hbu; EtOH; Hla |
| Munro, Zinder e Walker (2009) | Batelada | 60 a 85 | Glicose | 3,8 mol H ₂ .mol glicose ⁻¹ (77=85°C) | Hac; Hla |
| Nazlina <i>et al.</i> (2009) | Batelada | 35 a 60 | Resíduos alimentícios | 593 ml H ₂ .g carboidrato ⁻¹ (55°C) | Hbu; Hac; Hla |
| Luo <i>et al.</i> (2010b) | Batelada | 37, 60 e 70 | Vinhaça de mandioca | 53,8 mL H ₂ . g SV ⁻¹ (60°C) | Hbu ;Hac; Hpr |
| Nissilä <i>et al.</i> (2011) | Batelada | 52 a 70 | Celulose | 2,4 mol H ₂ .mol hexose ⁻¹ (52°C) | Hac; Hbu; EtOH |
| Gadow, Li e Liu (2012) | CSTR | 37, 55 e 80 | Celulose | 19,0 mmol H ₂ .g celulose ⁻¹ (80°C) | Hac; Hbu |
| Obazu, Ngoma e Gray (2012) | RALF | 45 a 70 | Sacarose | 3,55 mol H ₂ .mol glicose ⁻¹ (70°C) | |
| Puhakka, Karadag e Nissilä (2012) | Batelada | 37 e 55 | Glicose | 1,8 mol H ₂ .mol glicose ⁻¹ (37°C) | EtOH; Hac; Hbu |
| Kargi, Eren e Ozmihci (2012b) | Batelada | 35 e 55 | Soro de leite | 0,81 mol H ₂ .mol glicose ⁻¹ (55°C) | Hac; Hbu; Hla |
| Gadow <i>et al.</i> (2013) | CSTR | 37, 55 e 80 | Celulose | 12,3 mmol H ₂ .g celulose ⁻¹ (55°C) | Hac; Hbu; EtOH |
| Muñoz-Páez <i>et al.</i> (2013) | RALF | Ambiente e 35 | Sacarose | 2,3 mmol H ₂ .g sacarose ⁻¹ (35°C) | Hac; Hbu; Hpr; EtOH |
| Shi <i>et al.</i> (2013) | ASBR | 35, 50 e 65 | Alga marinha | 61,3 mL H ₂ .g ST ⁻¹ (35°C) | Hac; Hbu |
| Lazaro <i>et al.</i> (2014) | Batelada | 37 e 55 | Vinhaça | 2,31 mmol H ₂ .g DQO ⁻¹ (55°C) | Hac; Hbu; HPr; EtOH |
| Zhang, K, Ren e Wang (2015) | Batelada | 30, 37, 55 e 70 | Hidrolisado de palha de milho | 7,74 mmol H ₂ .g açúcar ⁻¹ (55°C) | Hac; Hbu; |

CSTR – Reator de mistura ideal; HAC – Ácido acético; HBU – Ácido butírico; HFO – Ácido fórmico; HLA – Ácido lático; HPR – Ácido propiônico; RALF – Reator anaeróbio de leito fluidizado; UASB – Reator anaeróbio de manta de lodo

Wang e Wan (2008) avaliaram o efeito da temperatura na faixa entre 20°C a 55°C na

produção fermentativa de hidrogênio por culturas mistas em testes em batelada utilizando glicose na concentração de 1g.L^{-1} . Foi observado que o rendimento de hidrogênio e a concentração de biomassa aumentaram com a temperatura até 40°C , com a maior concentração de microrganismos possibilitando uma produção de hidrogênio mais eficiente com rendimento máximo de $275\text{mL H}_2.\text{g glicose}^{-1}$. A principal rota de produção de hidrogênio foi a aceto-alcoólica que apresentou a mesma evolução com o aumento da temperatura que foi observada no hidrogênio. Os resultados com temperaturas maiores obtiveram resultados inferiores, indicando a mudança de rota metabólica induzida pelas diferentes bactérias que foram dominantes em cada temperatura.

Utilizando amido em culturas mistas, Akutsu *et al.* (2009) avaliaram condições termofílicas (55°C) e mesofílicas (35°C) em testes em batelada. Foi observado que a produção de hidrogênio sem o pré-tratamento do inóculo foi estável a 55°C . Entretanto, não foi observada a mesma estabilidade em 35°C devido a maior atividade de microrganismos homoacetogênicos. Na condição termofílica a concentração de amido no afluente foi variada de 20g.L^{-1} até 70g.L^{-1} em um reator contínuo de mistura ideal (CSTR) no TDH de 24h. A produção de hidrogênio foi influenciada pela concentração de substrato, observando valor máximo de rendimento de $2,82\text{ mol H}_2.\text{mol glicose}^{-1}$ em 20g.L^{-1} e valor máximo de produtividade de $4,43\text{ L H}_2.\text{L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ em 30g.L^{-1} . Nestas condições os ácidos acético e butírico foram predominantes. Em concentrações maiores o rendimento de hidrogênio foi reduzido, associado a maior produção de etanol e ácido láctico, que são produtos mais reduzidos para consumir o excesso de elétrons na forma de NADH, e ácido fórmico, intermediário da produção de hidrogênio.

Karadag *et al.* (2009) estudaram o efeito de diversas condições selecionadas, entre elas a variação da temperatura entre 45 e 62°C e a concentração de glicose entre $4,5$ e 18g.L^{-1} em testes em batelada utilizando uma cultura isolada do sedimento de fonte termal pré-tratada termicamente. Com relação ao efeito da temperatura observou-se que o rendimento de hidrogênio aumentou $0,73\text{ mol H}_2.\text{mol glicose}^{-1}$ para o seu valor máximo de $1,37\text{ mol H}_2.\text{mol glicose}^{-1}$ com o aumento da temperatura de 45°C para $50,8^{\circ}\text{C}$, com valores similares na faixa entre $49,6$ e $54,8^{\circ}\text{C}$. A produção de hidrogênio foi associada com a produção dos ácidos acético e láctico para temperaturas menores que $49,6^{\circ}\text{C}$ e para temperaturas maiores a rota metabólica preferível foi aceto-alcoólica. Observou-se que a produção de lactato pelas bactérias lácticas obteve perfil inverso a produção de hidrogênio, com os valores menores de rendimento associados a grandes quantidades de biomassa contendo dominância de bactérias lácticas. A produção de etanol aumentou com a temperatura. Assim, apesar da produção de

hidrogênio via acetato, o acúmulo de lactato ou etanol indicou o consumo de equivalentes redutores (NADH), reduzindo a produção de hidrogênio para estas condições de temperatura. Ao avaliar o efeito da concentração na temperatura de 52°C, observou-se que a produção cumulativa de hidrogênio foi aprimorada com concentrações maiores de glicose. Entretanto, o rendimento de hidrogênio máximo de 1,7 mol H₂. mol glicose⁻¹ foi observado na concentração de glicose 4,5g.L⁻¹, reduzindo para 1,16 mol H₂. mol glicose⁻¹ com valores elevados de concentração (18g.L⁻¹). Na concentração de 4,5g.L⁻¹, houve prevalência de ácido acético e etanol e, com o aumento da concentração de glicose, a produção de etanol foi reprimida em favor da produção de ácidos acético, butírico e láctico, indicando que as concentrações elevadas de ácido láctico causaram efeitos inibitórios nas concentrações de glicose mais elevadas.

Considerando a utilização de efluentes gerados em altas temperaturas, Luo *et al* (2010b) investigaram a influência da temperatura (37°C, 60°C e 70°C) e pH (4-10) na produção fermentativa de hidrogênio a partir de vinhaça de mandioca em testes em batelada. O rendimento máximo de hidrogênio de 53,3 mL H₂.g SV⁻¹ foi obtido na temperatura de 60°C. Este resultado foi 53,5% maior que a condição mesofílica e 198% maior que a condição termofílica extrema. Os principais metabólitos foram butirato e etanol na temperatura de 60°C, acetato, propionato e butirato em 37°C e em 70°C acetato e etanol foram predominantes, mas em concentrações menores e com inibição da produção de butirato de acordo com o rendimento de hidrogênio reduzido. A produção termofílica de hidrogênio correspondeu com a maior concentração de ácido butírico e inibição da produção de propionato. Apesar de ser um inóculo mesofílico, os resultados mostraram que o inóculo misto continha várias comunidades microbianas que poder ser seletivamente cultivadas em diferentes temperaturas. Os resultados experimentais mostraram que o pH inicial 6 foi ótimo para produção de hidrogênio. Valores maiores de pH resultaram em maiores concentrações de etanol e acetato, este atribuído a maior atividade de homoacetogênicos e na degradação de proteínas, não gerando hidrogênio.

Culturas celulolíticas foram cultivadas em batelada a partir de material de compostagem termofílico por Nissila *et al* (2011) com o objetivo de estudar o efeito da temperatura (52 a 70°C) e do tratamento térmico (80°C por 20 minutos e 100°C por 10 minutos) na produção de hidrogênio e na comunidade microbiana usando 5g celulose.L⁻¹. Os maiores valores de rendimento de hidrogênio (1,4 mol H₂. mol hexose⁻¹) e de degradação de celulose (57%) foram observados na temperatura de 52°C com tratamento térmico de 80°C. Os metabólitos prevalentes foram o ácido acético e etanol, seguidos por butirato, indicando a

rota aceto-alcoólica de produção de hidrogênio. Em temperaturas maiores de cultivo, o rendimento de hidrogênio foi inferior, com a cultura cultivada a 70°C produzindo quantidades desprezíveis de hidrogênio independente do pré-tratamento. Temperaturas maiores de pré-tratamento e cultivos sucessivos reduziram a diversidade microbiana das comunidades, dominadas por bactérias das famílias *Thermoanaerobacteriaceae* e *Clostridiaceae*.

Em busca de condições operacionais que possibilitassem elevadas produtividades e rendimentos de forma simultânea, Obazu, Ngoma e Gray (2012) estudaram a influência combinada de fatores que restringem a transferência de massa do hidrogênio. Foram testadas diferentes condições de operação e dimensões de um reator anaeróbio de leito fluidizado realizando variações conjuntas na temperatura (45 a 70°C), pH (5,4 a 7,8), vazão de reciclo efluente desgaseificado (3,2 a 3,5 L.min⁻¹) e volume total do reator (5,74 a 19,1 L) utilizando 17,8g sacarose.L⁻¹ como fonte de carbono. Nos casos em que o aumento do pH ocorreu associado a elevação da temperatura, a porcentagem de hidrogênio produzido no biogás aumentou de 43,4% (pH 5,67 e temperatura < 60°C) para 64,4 % (pH 7,09 e temperatura entre 60 e 70°C). O valor máximo de produtividade de 420,1 mmol H₂.L⁻¹.h⁻¹ foi obtido na temperatura de 70°C, pH 5,5, vazão de reciclo de 3,5 L.min⁻¹ e volume total de 12,6L. Entretanto, nestes casos não foram observados valores de rendimento de hidrogênio superiores a 3,0 mol H₂. mol glicose⁻¹. Com a redução dos valores da razão de volume total do reator por vazão de reciclo de efluente (V/F), o rendimento de hidrogênio foi aprimorado em todas as temperaturas, prevalecendo superior a 3,0 mol H₂. mol glicose⁻¹ apenas para as temperaturas termofílicas. A melhor condição de operação observada com simultaneamente elevados valores de produtividade (231,3 mmol H₂.L⁻¹.h⁻¹) e de rendimento de hidrogênio (3,55 mol H₂. mol glicose⁻¹) foi obtida aumentando a temperatura para 70°C, reduzindo o volume total do reator para 5,74L e diminuindo o valor da vazão de reciclo de efluente para 3,2 L.min⁻¹, com consecutivo valor de V/F de 1,8 min. A remoção de forma eficiente do hidrogênio presente na fase líquida do reator foi realizada recirculando o efluente desgaseificado em elevada vazão através do leito fluidizado. Estas vazões de recirculação elevadas removeram restrições termodinâmicas que evitavam a obtenção simultânea de elevados valores de produtividade e rendimento.

De forma a comparar condições mesofílicas e termofílicas de produção de hidrogênio, Kargi, Eren e Ozmihci (2012b) realizaram experimentos em batelada utilizando soro de queijo (10,77 g açúcares totais.L⁻¹) cultivados nas temperaturas de 35 °C e 55 °C. Entre os resultados principais, observou-se que a fermentação termofílica obteve melhor rendimento de hidrogênio de 0,81 mol H₂. mol glicose⁻¹ em comparação com a temperatura mesofílica, que

obteve 0,47 mol H₂. mol glicose⁻¹. Além disso as concentrações finais de ácidos na condição termofílica (4,67g.L⁻¹) foram inferiores as obtidas na temperatura mesofílica (5,87g.L⁻¹). Apesar de a produção de hidrogênio ser proporcional a formação de ácidos, o rendimento obtido está relacionado a rota metabólica. Dependendo da bactéria dominante em cada temperatura e da rota utilizada, mais hidrogênio pode ser produzido com menor geração de ácidos como subprodutos. Assim, apesar de adaptações mais longas serem necessárias, a fermentação termofílica obteve melhores resultados devido a eliminação de bactérias consumidoras de hidrogênio e seleção de produtores de hidrogênio mais eficientes na elevada temperatura.

Utilizando 5g celulose.L⁻¹, Gadow, Li e Liu (2012) avaliaram o efeito da temperatura na produção fermentativa de hidrogênio em três reatores de mistura diferentes operando nas temperaturas de 37 °C, 55°C e 80°C, todos no TDH de 10 dias. O inóculo utilizado foi o lodo de esgoto municipal sem a realização de pré-tratamento térmico. Na condição mesofílica, operando o reator a 37 °C, o inóculo não tratado possibilitou a geração de metano (26%) concomitante com a produção de hidrogênio (2%), observando valor máximo de rendimento de 0,6 mmol H₂.g celulose⁻¹. Nas temperaturas mais elevadas não foi observado metano, obtendo maiores rendimentos máximos de hidrogênio de 15,2 e 19,02 mmol H₂.g celulose⁻¹ em 55 e 80°C, respectivamente. Em todas as temperaturas o acetato e o butirato foram os principais metabólitos, com crescente predominância de ácido acético em temperaturas mais elevadas. Os resultados indicaram que o lodo não tratado não é recomendado para a produção mesofílica de hidrogênio utilizando celulose, pois o hidrogênio produzido foi convertido em metano por arqueias metanogênicas presentes no inóculo. Por outro lado, ao avaliarem o ganho de energia, a condição termofílica mostrou melhor performance econômica para produção de hidrogênio em concentrações mais altas de celulose.

Desta forma Gadow *et al* (2013) avaliaram o efeito da temperatura e do choque da temperatura operando três reatores CSTR em condições mesofílicas (37°C), termofílicas (55°C) e hipertermofílicas (80°C) utilizando o lodo de esgoto municipal sem pré-tratamento no TDH de 10h com concentração de 10g celulose.L⁻¹. As condições termofílicas e hipertermofílicas apresentaram produção estável de hidrogênio com rendimentos médios de 12,28 e 9,72 mmol H₂.g celulose⁻¹, respectivamente. Por outro lado, a condição mesofílica obteve baixo rendimento de hidrogênio (3,56 mmol H₂.g celulose⁻¹) com produção de metano com rendimento de 5,4 mmol H₂.g celulose⁻¹. Após a redução súbita para temperaturas de 23 e 44°C respectivamente, as condições termofílicas e hipertermofílicas apresentaram maior resiliência para produção de hidrogênio, enquanto que a condição mesofílica, reduzida a 11°C,

obteve produção instável de hidrogênio sem mudança considerável na produção de metano. Os principais metabólitos observados nas temperaturas maiores foram os ácidos acético e butírico junto com etanol, enquanto que na temperatura de 37°C, ácido propiônico também foi observado. Entretanto em todos os casos, as performances antes e depois do choque de temperatura não foram similares, indicando mudanças nas funções da comunidade microbiana associado a mudança de produção de ácidos para produção majoritária de alcoóis.

O efeito da temperatura também foi avaliado para substratos mais complexos. Shi *et al* (2013), com lodo de digestor anaeróbico mesofílico com pré-tratamento térmico, avaliaram o efeito da temperatura na produção fermentativa de hidrogênio em três reatores de batelada sequencial operados nas temperaturas de 35, 50 e 65°C usando a macroalga *Laminaria japonica* como fonte de carbono. O rendimento máximo de hidrogênio de 61,3 mL H₂. g ST⁻¹ foi obtido na taxa de carregamento orgânico de 3,4g DQO.L⁻¹.dia⁻¹ em condições mesofílicas (35 °C) na ausência de metano, com acetato e butirato como principais metabólitos. Os rendimentos obtidos nas temperaturas de 50 e 65°C foram de 49,7 e 48,1 mL H₂. g ST⁻¹, respectivamente. Com o aumento da temperatura, a fração de acetato foi reduzida e a de butirato foi elevada, com 93,1% na condição de 65°C. Avaliando a comunidade microbiana, os autores observaram que com o aumento da temperatura de 35 para 65°C a diversidade da comunidade foi reduzida. As principais populações bacterianas identificadas faixa mesofílica foram *Clostridium* sp., *Ruminococcus* sp., *Eubacterim* sp. e *Bacteroides* sp. Nas temperaturas maiores foram encontradas *Clostridium thermoamylolyticum*, *Clostridium thermosaccharolyticum* e *Clostridium thermocellum*. Ao avaliar o efeito da temperatura no processo hidrólise, observou-se maior atividade de enzima celulase no reator mesofílico, coincidindo com o rendimento máximo.

Utilizando diferentes concentrações de vinhaça, Lazaro *et al* (2014) estudaram a produção de hidrogênio nas temperaturas de 37 e 55 °C utilizando lodo mesofílico de tratamento de água residuária de abatedouro de aves. O lodo foi pré-tratado termicamente e os testes foram realizados em batelada nas concentrações de vinhaça entre 2 a 12g DQO.L⁻¹. Nos testes mesofílicos a concentração de vinhaça não impactou o rendimento de hidrogênio que variou de 1,72 a 2,23 mmol H₂.g DQO⁻¹, com valor máximo na concentração de 7g DQO.L⁻¹. Entretanto, na condição termofílica o aumento da concentração causou a redução do rendimento de hidrogênio de 2,31 para 0,44 mmol H₂.g DQO⁻¹. Mesmo assim, o maior rendimento obtido neste estudo foi na condição termofílica na concentração de 2g DQO.L⁻¹. Os ácidos butírico, acético e o etanol foram produzidos em todos os experimentos, com acetato predominando em condições mesofílicas. Além disso, ácido propiônico foi

identificado apenas em condições mesofílicas quando a concentração de vinhaça foi inferior a 7g DQO.L⁻¹. Os resultados obtidos refletem as diferentes composições das comunidades microbianas mesofílicas e termofílicas que apresentam diferentes potenciais para conversão de vinhaça a hidrogênio. Os microrganismos predominantes em 37°C foram relacionados ao gênero *Clostridium*, enquanto que em 55°C foram identificadas bactérias relacionadas ao gênero *Thermoanaerobacter*.

Zhang, Ren e Wang (2015) avaliaram o efeito da temperatura na produção fermentativa de hidrogênio de palha de milho hidrolisada nas condições mesofílicas (30 e 37°C), termofílicas (55°C) e termofílicas extremas (70°C) utilizando lodo ativado e lodo anaeróbio granular sem pré-tratamento. Os rendimentos máximos de hidrogênio foram obtidos na temperatura de 55°C tanto para o lodo ativado (6,08 mmol H₂.g açúcar consumido⁻¹) e para lodo anaeróbio (7,74 mmol H₂.g açúcar consumido⁻¹). Em ambos os inóculos utilizados a eficiência da temperatura de fermentação seguiu a ordem de 55°C > 70°C > 37°C ~ 30°C. Foi observado que com o aumento da temperatura, maior foi o tempo de fase de adaptação para ambos os inóculos, indicando que os microrganismos tem maior dificuldade de adaptação aos componentes complexos do hidrolisado em temperaturas maiores. Os metabólitos foram similares entre inóculos para as mesmas temperaturas, indicando similaridades nas composições microbianas. As fermentações a 55°C corresponderam as maiores concentrações de acetato e butirato, com produção mínima de etanol, indicando a utilização mais eficiente de NADH para produção de hidrogênio. Nas outras condições, grandes quantidades de NADH foram utilizadas para metabólitos não relacionados a produção de hidrogênio ou intermediários, como propionato e ácido fórmico. As comunidades microbianas apresentaram menor diversidade com o aumento da temperatura, caracterizando o cultivo seletivo de algumas espécies. As performances superiores das condições termofílicas podem ser atribuídas ao cultivo seletivo de produtores de hidrogênio termofílicos mais eficientes capazes de produzir mais hidrogênio usando substratos complexos. A performance insatisfatória da produção de hidrogênio em condições termofílicas extremas é resultado da não formação de uma comunidade termofílica extrema de eficiente devido a sua baixa eficiência de consumo de substratos complexos e por serem afetados negativamente pelos subprodutos associados ao hidrolisado de palha de milho. Em condições mesofílicas, os rendimentos inferiores indicam a não viabilidade desta condição para produção de hidrogênio a partir de hidrolisado lignocelulósico. Na condição mesofílica, anaeróbios facultativos com maiores conversões de substrato e crescimento como *Enterobacter* sp., *Klebsiella* sp. e *Citrobacter* sp. foram dominantes na comunidade em ambos inóculos devido a falta de pré-

tratamento para eliminá-los. Na fermentação termofílica, *Bacillus* sp. e *Thermoanaerobacterium* foram os principais produtores de hidrogênio.

Entre os experimentos termofílicos, observa-se que a faixa termofílica apresenta as condições ideais para o crescimento e atividade de bactérias dos gêneros *Caldicellulosiruptor* e *Thermotoga* (van Niel *et al.*, 2002). A Tabela 3.7 mostra alguns dos resultados principais da produção termofílica de hidrogênio.

Collet *et. al* (2004) realizaram o cultivo contínuo de *C. thermolacticum* em um biorreator anaeróbio termofílico (58°C) com concentração de 10g.L⁻¹ de lactose testando diferentes condições taxas de diluição (0,012 a 0,19h⁻¹) e pH. O valor máximo de produtividade volumétrica de hidrogênio foi 2,58mmol.L⁻¹.h⁻¹ (63mL.L⁻¹.h⁻¹) na taxa de diluição de 0,058h⁻¹. Por outro lado, o rendimento de hidrogênio foi aproximadamente constante em todos os experimentos, com valor máximo de 3 mol H₂.mol lactose⁻¹. em 0,028h⁻¹. Os principais metabólitos produzidos foram acetato, etanol e lactato. Desta forma, O rendimento inferior ao valor teórico foi justificado pela presença de grandes quantidades de hidrogênio na fase gasosa, mudando a rota metabólica para a produção de etanol.

Em busca da caracterização do metabolismo da bactéria *Clostridium thermolacticum* crescendo em lactose, Collet *et. al* (2006) realizaram experimentos em CSTR com concentração de 10g.L⁻¹, variando a taxa de diluição de 0,013 a 0,19h⁻¹, com respectivos valores de TDH entre 77h e 5,26h. A produtividade máxima de hidrogênio foi de 2,55 mmol.L⁻¹.h⁻¹ observada na faixa de TDH entre 10 e 25h. O principal produto da fase líquida foi o etanol seguido do acetato em todos os TDH. Entretanto, com o aumento dos valores de TDH acima de 16,7h a concentração de ácido lático aumentou, apresentando 32% do carbono recuperado como lactato no TDH de 77h. O piruvato produzido pela glicólise é o ponto de bifurcação para formação de ácido lático e acetil-CoA, com o acetil-CoA originando etanol e ácido acético. Dois ATP são gerado durante a metabolização das hexoses pela glicólise gerando 2 piruvatos e mais um ATP é gerado por cada acetato produzido. Na geração de piruvato, um NADH é gerado, sendo necessário a oxidação de um NADH para formar lactato e dois NADH para cada etanol gerado.

Tabela 3.7 - Principais resultados de estudos na produção termofílica de H₂

| Referências | Reator | T (°C) | Substrato | HY | HPR | Metabólitos |
|--|------------|--------|---------------------------------|--|---|--------------------------------|
| Collet <i>et al.</i> (2004) | CSTR | 58 | Lactose | 3,0mol H ₂ .mol lactose ⁻¹ | 63mL H ₂ .L ⁻¹ .h ⁻¹ | Hac; Hla; EtOH |
| Prasertsan, O-Thong e Birkeland (2009) | ASBR | 60 | Efluente de usina óleo de palma | 0,27L H ₂ .g DQO ⁻¹ | 9,1L H ₂ .L ⁻¹ .dia ⁻¹ | Hac; Hbu |
| Azbar <i>et al.</i> (2009) | CSTR | 55 | Soro de leite | 22mmol H ₂ .g DQO ⁻¹ | 13,2L H ₂ .L ⁻¹ .dia ⁻¹ | Hac; Hbu; Hla; Hpr; Hfor |
| Kongjan <i>et al.</i> (2010c) | CSTR | 70 | Hidrolisado de palha de trigo | 7,9mmol H ₂ .g açúcar ⁻¹ | 184mL H ₂ .L ⁻¹ .dia ⁻¹ | Hac; Hbu; EtOH; HPr |
| Abreu <i>et al.</i> (2010) | EGSB | 70 | Glicose e arabinose | 177mL H ₂ .g substrato ⁻¹ | 2,7L H ₂ .L ⁻¹ .dia ⁻¹ | Hla; Hbu; Hac |
| Luo <i>et al.</i> (2010a) | CSTR | 60 | Vinhaça de mandioca | 85mL H ₂ . g SV ⁻¹ | 3600mL H ₂ .L ⁻¹ .dia ⁻¹ | HBu ;Hac; EtOH |
| Keskin, Aksöyek e Azbar (2011) | Leito fixo | 55 | Sacarose | 5mol H ₂ .mol sacarose ⁻¹ | 2,98L H ₂ .L ⁻¹ .dia ⁻¹ | Hac; Hbu |
| Kongjan, O-Thong e Angelidaki (2011) | UASB | 55 | Melaço | 269,5mL H ₂ .g açúcar ⁻¹ | 4500mL H ₂ .L ⁻¹ .dia ⁻¹ | HBu ;Hac |
| Zhang <i>et al.</i> (2012) | CSTR | 55 | Glicose | 1,9mol H ₂ .mol glicose ⁻¹ | - | Hac; EtOH; Hbu |
| Kargi, Eren e Ozmihci (2012a) | Batelada | 55 | Soro de leite | 1,03mol H ₂ .mol glicose ⁻¹ | - | Hac; Hbu; Hla |
| Willquist e van Niel (2012) | CSTR | 70 | Glicose | 3,5mol H ₂ .mol glicose ⁻¹ | - | Hac |
| Zhang <i>et al.</i> (2013) | CSTR | 70 | Glicose | 1,11mol H ₂ .mol hexose ⁻¹ | - | EtOH; Hac; Hla |
| Roy, Vishnuvardhan e Das (2015) | Leito fixo | 60 | Melaço | 16,8mmol H ₂ .g DQO ⁻¹ | 1,56L H ₂ .L ⁻¹ .h ⁻¹ | HBu ;Hac; EtOH |
| Braga, Ferraz Júnior e Zaiat (2015) | UASB | 55 | Sacarose | 1,73mol H ₂ .mol sacarose ⁻¹ | 75,33mL H ₂ .L ⁻¹ .h ⁻¹ | Hac; Hbu; EtOH; MeOH; Hpr; Hla |
| Han <i>et al.</i> (2015) | CSTR | 55 | Resíduos de alimentos | 85,6mL H ₂ .g substrato ⁻¹ | 353mL H ₂ .L ⁻¹ .h ⁻¹ | EtOH; Hac; Hbu |
| Jiang <i>et al.</i> (2015) | CSTR | 55 | Celulose | 2,77mol H ₂ .mol hexose ⁻¹ | 0,243L H ₂ .L ⁻¹ .dia ⁻¹ | Hac; Hbu; EtOH |
| Zhang, F. <i>et al.</i> (2015) | CSTR | 55 | Glicose | 2,2mol H ₂ .mol glicose ⁻¹ | 7,9L H ₂ .L ⁻¹ .dia ⁻¹ | Hac; Hbu; EtOH; Hla; Hpr |

ASBR – Reator anaeróbico operado em batelada sequencial; EGSB – Reator anaeróbico de leito granular expandido; HAC – Ácido acético; HBu – Ácido butírico; Hfo – Ácido fórmico; HLa – Ácido láctico; HPr – Ácido propiônico; RALF – Reator anaeróbico de leito fluidizado; UASB – Reator anaeróbico de manta de lodo

A produção fermentativa de hidrogênio em condições termofílicas (55°C) utilizando lactose como substrato com um inóculo de cultura mista foi investigada por Calli *et al.* (2008) analisando o efeito do pH no rendimento de hidrogênio, taxas de produção e tipos de fermentação. Experimentos em batelada alimentada foram realizados com lactose controlando o pH nos valores de 5,0, 5,3, 5,5, 5,7 e 6,0. O valor máximo de rendimento de 3,43 mol H₂.mol lactose⁻¹ foi observado no pH 5,3, com prevalência de acetato e butirato. A maior taxa de produção de hidrogênio de 57,5 mL.L⁻¹.hr⁻¹ foi encontrada no pH 5,7 no seu segundo experimento. Os principais motivos para os baixos rendimentos de hidrogênio foram o efeito repressor da elevada pressão parcial de hidrogênio resultando na mudança da rota metabólica de produção de acetato para produção de butirato; a inibição dos produtores de hidrogênio por bactérias produtoras de ácido láctico e o consumo do hidrogênio produzido para produção de acetato.

Azbar *et al* (2009) investigaram o processo de fermentação anaeróbia contínua para a produção de hidrogênio a partir do soro de leite em condições termofílicas. O lodo utilizado foi obtido de um digestor anaeróbio tratado termicamente para eliminar a atividade metanogênica. Os experimentos foram realizados em CSTR a 55°C utilizando duas estratégias diferentes de carregamento orgânico: variar o TDH de 3 a 1 dia mantendo constante a DQO; variar a DQO mantendo constante o TDH constante em 1 dia. Em todos os experimentos as seguintes taxas de carregamento orgânico foram utilizadas: 21, 35 e 47g DQO.L⁻¹.dia⁻¹. Em ambos os experimentos, metano foi observado periodicamente na taxa de carregamento de 21g DQO.L⁻¹.dia⁻¹. Foi especulado que apesar de as bactérias metanogênicas serem lavadas pelo baixo tempo de retenção hidráulico, parte delas podem ter aderido as paredes do reator, resultando nesta produção de metano. No estudo do efeito da concentração do substrato na produção de hidrogênio, o rendimento máximo de hidrogênio observado foi de 9 mmol H₂.g DQO⁻¹ na taxa de carregamento de 35g DQO.L⁻¹.dia⁻¹, com produtividade média de 1,5L H₂.L⁻¹.dia⁻¹. Avaliando efeito do TDH entre 1e 3,5 dias mantendo constante a concentração do afluente em 47 g DQO.L⁻¹, o rendimento máximo de hidrogênio de 22 mmol H₂.g DQO⁻¹ foi obtido no TDH de 3,5 dias, com produtividade média de 1,5 L H₂.L⁻¹.dia⁻¹. A taxa de produção de hidrogênio e o rendimento diminuíram significativamente quando o TDH foi reduzido a 1 dia, com valores médios de 4,7 mmol H₂.g DOQ⁻¹ e 1,0 L H₂.L⁻¹.dia⁻¹, respectivamente. Os ácidos acético, isobutírico, butírico, propiônico, láctico e fórmico foram os principais ácidos orgânicos produzidos em todos os experimentos. A principal bactéria identificada durante todas condições de operação foi a *Thermoanaerobacteriaceae* bacterium,

indicando que a população produtora de hidrogênio foi viável durante o tempo de cultura, mas esteve em tensão devido a mudança dos parâmetros físico-químicos.

Luo *et al.* (2010a) estudaram diferentes inóculos para a produção termofílica de hidrogênio a partir de vinhaça de mandioca. Os resultados de testes em batelada indicaram que o lodo mesofílico anaeróbico de UASB tratando vinhaça de mandioca obteve maior rendimento de hidrogênio (85,2 mL H₂.g SV⁻¹). Entretanto, ao avaliar a produção contínua de hidrogênio operando um CSTR, observou-se que os valores de rendimentos foram próximos entre todos os inóculos, com valor máximo de 92,3 mL H₂.g SV⁻¹ foi obtido com lodo ativado, indicando a seleção e o acúmulo de microrganismos produtores de hidrogênio nestas condições. Em todos os casos a rota butírica foi identificada como responsável pela produção de hidrogênio e *Thermoanaerobacteriaceae* foram identificadas como as comunidades microbianas dominantes. Ao avaliarem diferentes valores de TDH (72-16h), o rendimento de hidrogênio foi reduzido de 83 mL H₂.g SV⁻¹ (72h) para 56,7 mL H₂.g SV⁻¹ (16h). Entretanto, a produtividade de hidrogênio aumentou de 1170 mL H₂.L⁻¹.d⁻¹ para 3600 mL H₂.L⁻¹.d⁻¹ com a redução do TDH de 72h para 16h. O maior rendimento de hidrogênio resulta em maior recuperação de energia no resíduo, devido ao maior consumo de substrato complexo em TDH mais elevado. Por outro lado, a maior produtividade indica maior eficiência de produção em um volume menor do reator resultante de uma carga aplicada mais elevada.

Procurando obter o melhor sistema para produção termofílica de hidrogênio, Peintner *et al.* (2010) avaliaram o uso de reator de leito percolado e de reator de leito fixo utilizando *Caldicellulosiruptor owensensis* como inóculo e glicose (5g.L⁻¹) como substrato. Vantagens foram observadas em ambas as configurações tornando ambas capazes de produzir hidrogênio, tendo o leito percolado obtido maior rendimento (3 mol H₂.mol glicose⁻¹) com produtividade de 0,2L H₂.L⁻¹.d⁻¹. No caso do leito fixo, produtividades maiores foram observadas (0,25L H₂.L⁻¹.d⁻¹) com rendimentos inferiores.

Devido as baixas densidade celulares de crescimento e a energia necessária para o aquecimento, reatores de sistema de imobilização de microrganismos e efluentes industriais em elevadas temperaturas tornam-se opções viáveis para processos termofílicos. Assim, investigando a produção de hidrogênio a partir de melaço de beterraba, Kongjan, O-Thong e Angelidaki (2011) realizaram experimentos em reatores em batelada e contínuos usando culturas mistas termofílicas de esterco digerido a 55°C. Foram avaliadas concentrações entre 1,5 até 50,1g açúcar total.L⁻¹. Nos experimentos em batelada a produção cumulativa de hidrogênio aumentou com a elevação da concentração de 1,5 para 16,7g.L⁻¹, sem apresentar melhora para concentrações maiores. Entretanto, o rendimento máximo de 237 mL H₂.g

açúcares⁻¹ foi obtido com concentração de açúcares de 2,1g.L⁻¹, com concentrações maiores resultando na redução do valor de rendimento. Nestes experimentos os principais metabólitos obtidos foram o butirato e o acetato. O inóculo cultivado na concentração de 16,7g.L⁻¹ foi imobilizado em grânulos de um UASB para operação contínua no TDH de 24h com alimentação de 1,67g.L⁻¹.dia⁻¹. Com a adaptação e adesão dos produtores de hidrogênio aos grânulos foi observado rendimento médio de 269,5 mL H₂.g açúcares⁻¹ e produtividade de 4500 mL.L⁻¹.dia⁻¹ de formas estáveis, provando a eficiência da imobilização em UASB. A rota metabólica preferencial para a produção de hidrogênio foi a acetobutírica e foi observada a degradação do ácido láctico presente no melaço, gerando NADH adicional para a produção de hidrogênio. A população microbiana foi dominada por *Thermoanaerobacterium* spp.

Experimentos em batelada com soro de queijo foram realizados por Kargi, Eren e Ozmihci (2012a) nas concentrações de 5,2 a 28,5g açúcares totais.L⁻¹ para avaliar a produção termofílica de hidrogênio a 55°C. A maior produção cumulativa de hidrogênio de 257 mL foi observada com 20g açúcares totais.L⁻¹. Observou-se que este aumento foi devido a limitações de substrato em baixas concentrações. Entretanto o aumento da concentração de açúcares resultou no aumento da concentração de ácidos, principalmente acético, butírico e láctico, causando inibição por substrato e por produtos. Assim, os maiores rendimentos de hidrogênio foram obtidos em baixas concentrações, com valor máximo de 1,03 mol H₂.mol glicose⁻¹ na concentração de 9,5g açúcares totais.L⁻¹.

Roy, Vishnuvardhan e Das (2014) detalharam a performance da produção contínua de hidrogênio em reator de leito fixo avaliando os efeitos da razão de recirculação (entre 0,4 e 1) e do TDH (1 a 10h) na temperatura de 60°C utilizando melaço (TCO entre 33,6 e 168kg DQO.m⁻³.d⁻¹). A produtividade obteve perfil crescente com a redução do TDH até 1,25h e aumento da razão de recirculação para 0,6, com valor máximo de 1,7L H₂.L⁻¹.h⁻¹ com rendimento máximo de 16,82mmol.g DQO_{removida}⁻¹. Em valores menores de TDH, a produtividade de hidrogênio foi reduzida devido a inibição por substrato em cargas maiores. Com o aumento da razão de reciclo até 0,6 a velocidade superficial dentro do reator foi elevada, aprimorando as propriedades de transferência de massa entre líquido e sólido. Valores maiores de razão de reciclo elevaram a concentração de ácidos no reator, reduzindo o pH para 4,5 resultando na redução da produtividade de hidrogênio para 1,52L H₂.L⁻¹.h⁻¹. Os principais metabólitos produzidos foram butirato, acetato e etanol. Avaliando a razão NADH/NAD⁺, observou-se que na condição de melhor produtividade o menor valor de NADH/NAD⁺ foi obtido. Desta forma concluiu-se os equivalentes redutores (NADH) gerados devido a oxidação do substrato são utilizados para produção de hidrogênio de etanol,

reduzindo os valores da razão NADH/NAD^+ para valores ótimos. Ao analisar a degradação de substrato e a transferência de massa externa na produção de hidrogênio foi inferido que a contribuição do coeficiente de transferência de massa foi muito maior que a degradação de substrato mesmo em valores maiores de TDH. Isso indica a vantagem de sistemas termofílicos em comparação com sistemas mesofílicos devido a temperaturas maiores resultarem em maior mobilidade cinética das moléculas, contribuindo para a elevação da transferência de massa.

Jiang *et al.* (2015) avaliaram a produção de hidrogênio usando uma microflora mista originária de lodo de digestor de esgoto municipal na conversão de $10\text{g celulóse}\cdot\text{L}^{-1}$ e um reator de mistura em TDH de 10 dias. Além disso o efeito da temperatura na estrutura e atividade da comunidade microbiana foi avaliado em testes em batelada entre as temperaturas de 25 e 85°C. No CSTR, a produtividade média foi de $0,24\text{L H}_2\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$ e rendimento de $2,77\text{ mol H}_2\cdot\text{mol hexose}^{-1}$. Os principais metabólitos obtidos foram o acetato, butirato e etanol e a estrutura da comunidade microbiana foi dominada por microrganismos responsáveis pela hidrólise da celulose, como *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* e *Clostridium* sp. O efeito das variações de temperatura na atividade da comunidade termofílica produtora de hidrogênio foi avaliada e comparada com glicose. O inóculo, originalmente termofílico (55°C) converteu a glicose e celulose entre as temperatura de 35 a 65°C, com atividade máxima em 55°C. Entretanto, a performance do meio foi afetada negativamente com o aumento da temperatura além dos 55°C, inibindo completamente o sistema em 70°C. As concentrações e distribuições metabólitos líquidos foram dependentes da temperatura, aumentando a composição e a concentração de acetato e butirato até 55°C. Entretanto, a concentração destes metabólitos relacionados a produção de hidrogênio foi reduzida em consequência do aumento da temperatura além deste ponto crítico.

Procurando caracterizar a distribuição metabólica da glicose na fermentação termofílica de hidrogênio com cultura mista, Zhang *et al* (2015) utilizaram um quimiostato para avaliar o efeito do pH, pressão parcial de hidrogênio e concentração afluyente de glicose nos metabólitos produzidos. Foi utilizado como inóculo o lodo de um reator de mistura termofílico para produção de metano sem pré-tratamento. Os experimentos foram realizados no TDH de 0,7 dias variando o pH (4,0 a 7,0), pressão parcial de H_2 (0,05 a 0,62atm) e concentrações de glicose de $5,0$ a $19,5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, equivalendo a 27,5 e 108,5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. Os resultados obtidos indicaram a mudança da composição dos metabólitos de acetato, butirato e hidrogênio para acetato, etanol, propionato e formiato com o aumento do pH de 4,0 para 7,0, sendo a produção de hidrogênio a partir do ácido fórmico termodinamicamente controlada. A

redução da pressão parcial de hidrogênio não alterou o rendimento ou a distribuição dos metabólitos. O rendimento máximo de hidrogênio de 2,2 mol H₂. mol glicose⁻¹ foi obtido com 27,5 mmol glicose.L⁻¹, enquanto que a maior produtividade de 7,9L H₂.L⁻¹.dia⁻¹ foi observada na concentração de 76,3 mmol glicose.L⁻¹. Entretanto, com o aumento da concentração de glicose maior acúmulo de ácido lático foi observado.

3.4 Configurações de Reatores para Produção Fermentativa de Hidrogênio

O projeto de reatores deve basear-se nos fundamentos dos efeitos de parâmetros físico-químicos na produção de hidrogênio. A seleção da configuração do reator a ser utilizado deve levar em consideração a otimização do rendimento ou da produtividade. Geralmente, quanto menor o custo da matéria prima, maior a importância da produtividade em relação ao rendimento. Ao considerar a viabilidade econômica, a produtividade de hidrogênio precisa ser máxima, tornando crucial a seleção da configuração do reator. Por via de regra, o reator deve se permitir operar em TDH reduzido, com alta retenção de biomassa e rápida transferência de massa e remoção do hidrogênio para evitar altas pressões parciais. Concentrações baixas de substrato produzem maiores rendimentos de hidrogênio. Entretanto, neste caso a etapa de projeto necessitará de reatores muito maiores devido ao grande volume de água (Pawar e van Niel, 2013).

Processos de produção de hidrogênio operando em reatores contínuos podem ser divididos em duas categorias: sistemas de células suspensas ou sistemas de células imobilizadas. Os sistemas de crescimento celular suspenso permitem melhor transferência de massa entre os microrganismos e os substratos, mas apresentam dificuldades na manutenção da comunidade produtora de hidrogênio no reator em valores reduzidos de TDH (Lin, Wu e Chang, 2006).

De forma a dissociar o tempo de retenção da biomassa do TDH, um material suporte pode ser utilizado para que as bactérias fermentativas cresçam. O material suporte é o local utilizado pela cultura microbiana para desenvolver suas atividades metabólicas, portanto deve ser constituído de material inerte, que resista a abrasão e possua um tamanho ótimo para utilização nas condições de operação dentro do reator. Assim, um biofilme é formado no material suporte, possibilitando o aumento da concentração de biomassa no reator (Lin, Wu e Chang, 2006).

Dentre as diferentes configurações de reatores contínuos para crescimento superficial da biomassa no material suporte destacam-se aqui o leito fixo e o leito fluidizado, diferenciando-se pelo regime hidráulico do leito. No leito fixo o material suporte está estagnado e o líquido passa pelos espaços vazios do leito na direção vertical ou horizontal. No caso do leito fluidizado a direção é sempre vertical e a velocidade superficial deve ser maior que a velocidade de mínima fluidização (Barca *et al.*, 2015). Devido a condições de operação em menor grau de turbulência hidráulica, o leito fixo apresenta taxas menores de conversão de substrato e de produção de hidrogênio que as encontradas no leito fluidizado (Show *et al.*, 2012)

3.4.1 Reator Anaeróbio de Leito Fluidizado

Segundo Kunii e Levenspiel (1969), fluidização é a operação pela qual partículas sólidas são levadas a um estado fluido através da suspensão por um gás ou líquido escoando na direção axial. A transferência de momento da velocidade superficial do fluido através da força de arrasto entre as partículas e o fluido é igual a força gravitacional do peso das partículas do leito, garantindo a suspensão das partículas e uma diferença de pressão constante em qualquer região do leito.

Este fenômeno possibilita características únicas ao reator anaeróbio de leito fluidizado (RALF), como o máximo contato entre o biofilme e o substrato, baixa resistência difusional entre o líquido e o biofilme, baixa ocorrência de empacotamento do leito, pequena área de operação, estabilidade frente a grandes taxas de carregamento orgânico, elevada transferência de massa e energia e a homogenização do meio líquido do reator devido ao regime turbulento (Barca *et al.*, 2015)

Os sistemas de reatores contínuos de células imobilizadas como o RALF apresentam a vantagem do aumento do tempo de retenção celular. Assim, Wu, Lin e Chang (2003) estudaram o uso de reatores anaeróbios de leito fluidizado para produção de hidrogênio a partir de sacarose (20g DQO.L⁻¹) com lodo imobilizado, avaliando os perfis hidrodinâmicos e o comportamento da produção de hidrogênio. A velocidade superficial do líquido foi variada de 0,2 a 1,1cm.s⁻¹ e o TDH de 6 a 1h durante a produção fermentativa de hidrogênio. Quando a velocidade superficial atingiu valores maiores que 1,06cm.s⁻¹, a velocidade de mínima fluidização foi superada, as bolhas de biogás produzidas preencheram os espaços vazios de forma homogênea e o regime de borbulhamento livre no leito fluidizado homogêneo foi

observado. As três fases do reator (sólido, líquido e gás) foram afetadas pela formação das bolhas de biogás e de sua subida através do leito combinada a coalescência das bolhas, sendo a interação entre estas características o fator principal para o regime de fluidização do leito. A produtividade de hidrogênio aumentou de 0,15 para 0,51 L.h⁻¹.L⁻¹ quando o TDH foi reduzido de 6 para 2h, mostrando que a cinética da produção de hidrogênio em leito fluidizado foi controlada predominantemente pela taxa de carregamento de substrato. Com a redução subsequente do TDH para 1h a produtividade foi reduzida devido a sobrecarga do meio causando efeito de inibição por substrato. Tratamento térmico foi realizado no reator para selecionar a comunidade microbiana para produtores de hidrogênio no TDH de 2h. Após este tratamento foram observados valores máximos de produtividade e de rendimento de hidrogênio de 0,93 L.h⁻¹.L⁻¹ e 2,67 mol H₂.mol sacarose⁻¹, respectivamente. Desta forma o tratamento térmico e o TDH de 2h foram identificados com condições ótimas para produção estável e eficiente de hidrogênio. Os metabólitos solúveis identificados no processo fermentativo foram os ácidos butírico, acético e propiônico (Wu, Lin e Chang, 2003).

Wu, Huang e Hou (2006) desenvolveram modelos preditivos para descrever o comportamento hidrodinâmico de um reator anaeróbio de leito fluidizado. Leitos fluidizados mantêm alta concentração de biomassa em baixas espessuras de biofilme. Entretanto a produção de biogás pode causar a contração do leito, resultando na redução do tempo de contato entre o líquido e as partículas. No estágio inicial da produção de gás, as suas partículas podem ser vistas como uniformes em tamanho. Entretanto, conforme as bolhas ascendem, seu tamanho e velocidade superficial aumentam devido a redução da pressão de coluna de água. Assim, o efeito da produção de gás torna-se mais relevante com o aumento das dimensões do reator. Com o aumento da espessura do biofilme, da velocidade superficial do líquido e do gás, a expansão do leito foi aprimorada, com redução da perda de carga através do leito. Sugere-se que se um reator anaeróbio de leito fluidizado em escala industrial for construído com pequena área transversal e para elevadas cargas, atenção deve ser redobrada para a lavagem de biopartículas do reator devido a elevados valores velocidade superficial do líquido e do sólido.

Lin, Wu e Chang (2006) avaliaram a produção de hidrogênio em um reator anaeróbio de leito fluidizado utilizando sacarose (5 - 40g DQO.L⁻¹) variando o TDH entre 8,9 a 2,2h em condições mesofílicas. O aumento da concentração de sacarose foi benéfico para a produção de hidrogênio, com valor máximo de rendimento de hidrogênio observado de 4,98 mol H₂.mol sacarose⁻¹ no TDH de 8,9h com 40g DQO.L⁻¹. Em todas as concentrações, com a redução do TDH para o valor de 2,2h o rendimento de hidrogênio foi reduzido, com valor

mínimo de 1,9 mol H₂.mol sacarose⁻¹. Entretanto, a produtividade de hidrogênio apresentou perfil crescente com a redução do TDH, obtendo o valor máximo de 2,27L.h⁻¹.L⁻¹ no TDH de 2,2h com 40g DQO.L⁻¹. Isso indica que a cinética de produção de hidrogênio no reator anaeróbio de leito fluidizado é influenciada pelo efeito combinado da concentração de substrato e do TDH, representado pela taxa de carregamento orgânico. Segundo os autores, o aumento da taxa de carregamento orgânico favoreceu a produtividade de hidrogênio de forma similar a cinética de monod, indicando a existência de uma taxa de carregamento orgânico ótima para se obter a produtividade máxima de hidrogênio. Os principais metabólitos solúveis foram os ácidos butírico e acético, indicando a presença de eficientes produtores de hidrogênio.

De forma a investigar a mistura da biomassa durante a produção de hidrogênio em reator de leito fluidizado, Shen et al. (2007) desenvolveram uma técnica de processamento de imagem digital usando traçadores em duas dimensões do leito. Neste sistema é comum que as partículas formadas pela autoimobilização da biomassa migrem para a região superior do leito, enquanto que das partículas de meio suporte permanecem nas seções mais baixas, correspondendo a segregação destas diferentes partículas. A mistura das partículas de biomassa é causada não apenas pelo movimento, interação e coalescência das bolhas, mas também pelo seu estouro, induzindo dispersão lateral de parte das partículas de biomassa, distribuindo-as em grande parte da superfície do leito. Assim, a velocidade superficial ótima deve ser obtida para homogeneizar o leito, pois apesar do aumento da velocidade superficial aprimora a homogeneização lateral do leito, aumenta-se a dispersão da concentração vertical da biomassa, causando a sua segregação.

Estudos no contexto da produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidizado foram realizados anteriormente no laboratório de controle ambiental II (LCA-II) do Departamento de Engenharia Química da UFSCar utilizando glicose como substrato no estudo do efeito do material suporte (Barros *et al.*, 2010; Barros *et al.*, 2012), velocidade ascensional (Reis *et al.*, 2011), TDH (Shida *et al.*, 2009) e concentração do substrato e alcalinidade (Amorim *et al.*, 2009). Além disso também foram realizadas pesquisas com substratos mais complexos como vinhaça (Santos *et al.*, 2014a; Santos *et al.*, 2014b; Santos *et al.*, 2014c), soro de queijo (Rosa, Santos e Silva, 2014; Rosa *et al.*, 2014a; Gomes *et al.*, 2015) e manipuera (Rosa *et al.*, 2014b).

Com o objetivo de utilizar a glicose como fonte de substrato simples para facilitar a adaptação da comunidade microbiana à vinhaça em 55°C, Santos *et al* (2014a) avaliaram a co-digestão de diferentes razões destes substratos em reator anaeróbio de leito fluidizado na

DQO afluente de 5000 mg DQO.L⁻¹. Como fonte de inóculo foi utilizado lodo pré-tratado termicamente de reator UASB termofílico (55°C) para o tratamento de vinhaça de cana de açúcar. A estratégia de operação consistiu na estabilização da produção de hidrogênio com redução do TDH de 8 a 1h, com subsequente aumento da taxa de carregamento orgânico de 26,6 para 225,3Kg DQO.m⁻³.dia⁻¹, aplicando frações decrescentes de glicose na vinhaça. Depois, para avaliar a capacidade de produção de hidrogênio a partir da vinhaça diluída pura, glicose foi removida da alimentação. O valor máximo de rendimento de hidrogênio de 5,73 mmol H₂. g DQO_{ap}⁻¹ foi observado no TDH de 4h. Com a redução do TDH, foi observada a redução dos valores de rendimento. Entretanto, a produtividade de hidrogênio obteve perfil crescente com a redução do TDH, com valor máximo de 0,78L H₂.L⁻¹.h⁻¹ no TDH de 1h. Os principais metabólitos encontrados foram os ácidos succínico, láctico e butírico. Apenas a rota butírica é responsável pela produção de hidrogênio, mas a presença destes outros ácidos em grandes concentrações não alterou a produção de hidrogênio. O uso da vinhaça bruta favoreceu a produção de butirato, acetato e isobutirato e a redução do ácido succínico, sugerindo uma mudança de rota metabólica favorável a produção de hidrogênio. A comunidade microbiana foi dominada por *Thermoanaerobacterium* sp. e *Clostridium* sp.

Estudando o impacto da taxa de carregamento orgânico na produção de hidrogênio e na comunidade microbiana, Santos *et al* (2014b) utilizaram dois reatores de leito fluidizado termofílico (55°C) reduzindo o TDH de 6 a 1h, com conseqüente aumento da taxa de carregamento orgânico de 60 para 360kg DQO.m⁻³.dia⁻¹ (15gDQO.L⁻¹) e de 80 para 480kg DQO.m⁻³.dia⁻¹ (20gDQO.L⁻¹). Com este aumento, a produtividade de hidrogênio manteve perfil crescente em ambos os reatores, com valores máximos de 1,49L H₂.L⁻¹.h⁻¹ (15gDQO.L⁻¹) e 1,2L H₂.L⁻¹.h⁻¹ (20gDQO.L⁻¹) no TDH de 1h. Entretanto, o rendimento de hidrogênio foi reduzido com o aumento da TCO, com valores máximos de 2,23mmol H₂. g DQO_{ap}⁻¹ (15gDQO.L⁻¹) e de 1,85mmol H₂. g DQO_{ap}⁻¹ (20gDQO.L⁻¹) observados no TDH de 6h. Estes resultados indicaram que a produção de hidrogênio foi realizada sobre condições de sobrecarga orgânica no reator. Os principais metabólitos produzidos foram os ácidos láctico, butírico, isobutírico e propiônico, com a redução do TDH favorecendo a rota butírica de produção de hidrogênio. A população microbiana caracterizou-se pela presença de produtores de hidrogênio (*Megasphaera* sp.) e outros organismos (*Lactobacillus* sp.)

Com o intuito de verificar o efeito da concentração da alimentação na estabilidade e rendimento da produção de hidrogênio, Santos *et al.* (2014c) estudaram dois reatores RALF termofílicos (55°C) na produção contínua de hidrogênio, com concentrações afluentes de vinhaça de 10.000mgDQO.L⁻¹ e de 30.000mgDQO.L⁻¹, reduzindo o TDH de operação de 6

para 1h. A concentração de $10.000\text{mgDQO.L}^{-1}$ foi considerada ótima ao obter os maiores valores de rendimento ($2,86\text{mmol H}_2.\text{ g DQO}_{\text{ap}}^{-1}$, no TDH de 6h) e produtividade de hidrogênio ($1,96\text{L H}_2.\text{L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, no TDH de 1h). No caso da concentração de $30.000\text{mgDQO.L}^{-1}$, o rendimento máximo de hidrogênio de $0,79\text{mmol H}_2.\text{g DQO}_{\text{ap}}^{-1}$, no TDH de 6h, e a produtividade máxima de $0,8\text{L H}_2.\text{L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, no TDH de 1h, foram frutos da inibição da produção de hidrogênio pela maior concentração de ácidos na alimentação, como butírico ($3,7\text{g.L}^{-1}$) e acético ($3,0\text{g.L}^{-1}$), resultando em sobrecarga do reator. Pelas análises microbiológicas, observou-se que o efeito inibitório da maior concentração de ácidos graxos no afluente modificou a estrutura da comunidade microbiana, motivo diretamente responsável pelos diferentes resultados entre os dois reatores.

Observando as modificações de subprodutos e suas distribuições, Rosa, Santos e Silva (2014) avaliaram o uso de soro de queijo na ausência e na presença de glicose como substrato (5g DQO.L^{-1}) para produção mesofílica de hidrogênio usando diferentes fontes de inóculo, o lodo suíno e o lodo de abatedouro de aves. A estratégia de operação consistiu no uso decrescente de glicose até o uso exclusivo de soro de queijo, variando a composição de soro no afluente de 33% a 100% no TDH de 6h. O aumento da composição de soro no afluente de ambos os reatores favoreceu o rendimento e a produtividade de hidrogênio, com valores máximos de $1,9\text{mmol H}_2.\text{g DQO}^{-1}$ e $2,88\text{L H}_2.\text{d}^{-1}.\text{L}^{-1}$, para o inóculo de lodo suíno, e de $1,6\text{mmol H}_2.\text{g DQO}^{-1}$ e $2,88\text{L H}_2.\text{d}^{-1}.\text{L}^{-1}$ para o inóculo de abatedouro de aves. Os principais metabólitos observados foram o etanol e ácido butírico, sendo que as suas produções foram favorecidas com o aumento da composição de soro. A co-fermentação de soro de queijo e glicose possibilitou rendimento máximo de etanol de $3,45\text{mmol EtOH. g DQO}^{-1}$ com inóculo de lodo de abatedouro de aves.

Rosa *et al.* (2014a) avaliaram o efeito do TDH e de diferentes fontes de inóculo na produção de hidrogênio e etanol usando soro de queijo como substrato em reatores anaeróbios de leite fluidificado na temperatura de 30°C . Os valores máximos de rendimento de hidrogênio de $1,33\text{mol H}_2.\text{mol}^{-1}$ lactose e de rendimento de etanol de $1,22\text{ mol etanol.mol}^{-1}$ lactose foram observados no reator inoculado com lodo suíno operando no TDH de 4 horas. Sendo o rendimento teórico de hidrogênio na fermentação de lactose de $8\text{ mol H}_2.\text{mol lactose}^{-1}$, o rendimento máximo obtido representa 16,625 % do valor máximo teórico. Este mesmo reator obteve o valor máximo produtividade de hidrogênio ($0,51\text{L H}_2.\text{h}^{-1}.\text{L}^{-1}$) no TDH de 1 hora. Metano foi produzido de forma concomitante ao hidrogênio, com produtividade máxima de $0,68\text{L CH}_4.\text{h}^{-1}.\text{L}^{-1}$ no TDH de 1h.

Gomes *et al.* (2015) isolaram e identificaram bactérias produtoras de ácido lático que podem retardar a produção de hidrogênio em reatores anaeróbios de leite fluidizado. Os efeitos e prevalência destas comunidades foram correlacionados com os rendimentos de hidrogênio no RALF1 e no RALF2. No primeiro caso, o reator foi operado na concentração de 5g DQO.L⁻¹ decrescendo o TDH de 14 para 8h, com respectivos valores de TCO de 8,5 a 15kg DQO.m⁻³.d⁻¹. O RALF2 foi alimentado com concentrações de 3 a 10g DQO.L⁻¹ no TDH de 6h, com respectivos valores de TCO de 12 a 40kgDQO.m⁻³.d⁻¹. O valor máximo de rendimento de hidrogênio encontrado para o RALF1 foi de 1,9mol H₂.mol lactose⁻¹, observado no TDH de 14h e consequente TCO de 8,5kgDQO.m⁻³.d⁻¹. Por outro lado, o rendimento máximo encontrado no AFBR2 foi de 2,3mol H₂.mol lactose⁻¹ na TCO de 12kgDQO.m⁻³.d⁻¹. Em ambos os reatores principais metabólitos foram acetato e etanol, indicando a rota aceto-alcoólica, seguidos de butirato e etanol. De forma similar nos dois reatores, foram identificadas bactérias lácticas e clostridium tanto no biofilme quanto no efluente, indicando a persistência destes microrganismos nos reatores. Dentre as bactérias lácticas a mais recorrente foi a *Lactococcus Lactis*. Dessa forma, sugeriu-se que o ácido lático produzido pelas bactérias lácticas foi assimilado por outros microrganismos produtores de ácidos e alcoóis. O aumento da prevalência de bactérias lácticas reduziu o rendimento de hidrogênio mesmo com a redução do TDH, indicando a maior produção de peptídeos antimicrobianos. A produção de metano foi beneficiada com o aumento da TCO em ambos os reatores devido ao consumo do metanol produzido, com valor máximos de 0,5mol CH₄.mol lactose⁻¹ (AFBR1) e 0,2mol CH₄.mol lactose⁻¹ (AFBR2).

3.4.2 Reator Anaeróbio de Leite Granular Expandido

Outras configurações importantes de reatores contínuos de células imobilizadas utilizam a autofloculação como forma de retenção da comunidade microbiana, como o reator anaeróbio de manta de lodo (UASB) e o reator anaeróbio de leite granular expandido (EGSB). Segundo Schmidt *et al.* (1996), a vantagem destas configurações em comparação com os sistemas de crescimento suspenso é a sua habilidade em manter altas concentrações de biomassa apesar da velocidade ascensional. Nas configurações UASB e EGSB, a biomassa é retida nos agregados, chamados de grânulos, formados pela auto-imobilização natural das bactérias. Assim, estas configurações podem ser operados em baixos valores de TDH, pois o tempo de detenção do lodo é praticamente independente do TDH. Grânulos com boa

sedimentação mantem-se no leito, enquanto bactérias floculadas e dispersas são lavadas do reator. O diâmetro destes grânulos varia entre 0,14 a 5 milímetros, dependendo da água residuária utilizada e das condições de operação. Os grânulos cultivados em substratos acidogênicos, como carboidratos, tendem a ser maiores que os cultivados em ácidos. No reator, grânulos de diferentes tamanhos e densidades podem estar presentes. As densidades dos grânulos tendem a variar entre 1,03 a 1,08 g.mL⁻¹.

A composição dos grânulos depende das características da água residuária e das condições de operação. A composição dos grânulos envolve componentes inorgânicos, células microbianas e polímeros extracelulares. As principais variáveis que afetam a composição dos grânulos são as características do substrato, fonte de lodo para inoculação, condições operacionais do reator, ocorrência de interações químicas e fatores extrínsecos. Os compostos inorgânicos são geralmente minerais e cinzas, variando de 10 a 90% do grânulo dependendo da composição da água residuária alimentada. Com o aumento da fração de cinzas nos grânulos pode-se observar o aumento da densidade dos grânulos. Estas cinzas são compostas principalmente por cálcio, potássio e ferro. Caso os grânulos com alto conteúdo de cinzas aumentem em tamanho, a difusão no grânulo será a etapa limitante (Schmidt *et al.*, 1996)

Segundo Seghezzeo *et al.* (1998) a iniciação dos grânulos começa pela adesão dos microrganismos em agregações de células bacterianas que circundam o polímero extracelular. Dentre as várias teorias para a formação de grânulos, observa-se que os filamentos das espécies de *Metanosaeta sp* são responsáveis pelo fenômeno de granulação, servindo como um centro de nucleação para avanço do agregado. Outros estudos indicam que apesar de auxiliarem na iniciação dos grânulos, as espécies de *Metanosaeta sp* habitam as cavidades dos aglomerados de *Metanosarcina*. No caso do polímero extracelular (PEC), sua formação ocorre como resultado da excreção das células e dos detritos celulares. PEC bacteriano é definido como estruturas contendo polissacarídeos de origem bacteriana que permanecem do lado de fora dos elementos integrais da membrana de células gram negativas e do peptidoglicano de células gram positivas. O PEC é composto por detritos orgânicos, células lisadas e outros materiais excretados pelas células microbianas. PEC pode ter diferentes funções dependendo do microrganismo, podendo prender nutrientes solúveis, aumentar patogenicidade, diminuir a susceptibilidade de fagocitose e também pode mediar a adesão das bactérias em ecossistemas naturais. Essa função de adesão é muito importante, pois bactérias dispersas estão carregadas negativamente e existe repulsão eletrostática entre as células. A produção de PEC pode mudar a carga da superfície das bactérias, possibilitando a agregação. Existem dois tipos de PEC, os capsulares e o limo. Os capsulares estão sempre conectados a

célula microbiana, enquanto que o limo permanece sem ligação a célula microbiana. No caso do PEC nos grânulos, a sua composição é representada na sua maior parte por proteínas e polissacarídeos, normalmente em uma razão de 2:1 até 6:1.

O tamanho do poro e a porosidade do PEC afeta a atividade celular pela regulação do transporte de substrato e de biogás. Quando o gel de PEC é denso, o tamanho do poro e a porosidade são baixas, resultado em resistência a transferência de massa. Limitações no transporte de substrato podem resultar na autólise da parte central do grânulo, produzindo grânulos ocos (Seghezzi *et al.*, 1998).

A organização interna da estrutura microbiana observada em grânulos crescidos em águas residuárias complexas ilustra o benefício para a degradação ótima dos substratos e dos intermediários. Um agregado estruturado é um arranjo metabólico estável que cria condições ótimas para todos os seus membros. Na parte exterior do grânulo, bactérias hidrolíticas ou acidogênicas são predominantes, enquanto que as bactérias de metanosaeta consumidoras de acetato dominam a parte interna dos grânulos. As bactérias consumidoras de hidrogênio no meio dos grânulos consomem o hidrogênio que é produzido por bactérias acidogênicas nas partes mais superficiais do grânulo. Similarmente, a oxidação de acetato ocorre no meio dos grânulos, enquanto que as produções de acetato ocorrem na superfície (Schmidt *et al.*, 1996).

No projeto da configuração do reator, a única diferença entre o EGSB e o UASB é a recirculação do seu efluente, resultando em uma velocidade superficial muito maior com o mesmo TDH. Enquanto no UASB a velocidade ascensional não supera os $2,5\text{m.h}^{-1}$, no EGSB seus valores podem atingir 10m.h^{-1} (Kato *et al.*, 1994). Este é um parâmetro de grande importância, pois em um reator de produção de hidrogênio o perfil de escoamento do líquido, atividade do lodo e conversão de biomassa são características fundamentais interdependentes. Um lodo altamente reativo e valores elevados de TDH são necessários para eficientes conversões de biomassa. Estas eficientes conversões resultam em elevados rendimentos de matéria orgânica transformada em biogás. Um bom regime de escoamento é necessário para permitir o contato eficiente entre os microrganismos e a água residuária, garantindo o ambiente apropriado para o crescimento da cultura. De forma a aperfeiçoar a associação de todos estes parâmetros, o afluente do reator de leito granular expandido percorre o leito com velocidade ascensional constante, expandindo o leito devido à baixa densidade do lodo granular (Wang *et al.*, 2009).

Entretanto, com o crescimento desordenado da biomassa, o regime de escoamento pode tornar-se não homogêneo até mesmo na direção do escoamento devido às variações na tortuosidade dos caminhos preferenciais, na porosidade das partículas de leito e na geometria

aleatória dos grânulos e impurezas. Além disso, o movimento ascensional das bolhas de biogás produzidas pelo leito eleva velocidade total do leito acima da velocidade do líquido, tornando não homogêneo o escoamento transversal (Wang *et al.*, 2009).

Brito e Melo (1996) avaliaram as resistências de transferência de massa interna e externa e os perfis de escoamento em reator UASB e EGSB. Os perfis de escoamento entre observados foram diferentes. As propriedades de mistura do EGSB aproximaram-se de um reator de mistura perfeita devido a recirculação de efluente. No caso da configuração UASB, baixa velocidade superficial e pequena produção de biogás foram insuficientes para produzir a turbulência necessária para a mistura do fluido, observando um perfil de escoamento pistonado. Com base nestes resultados, a cinética aparente de degradação foi observada em ambas as configurações, não havendo diferenças significativas nos resultados. Quando analisada a transferência de massa externa, a resistência a transferência de massa do filme líquido não foi significativa para a configuração do EGSB, devido a sua alta velocidade superficial do líquido. No caso do UASB, foi observado a resistência de transferência de massa externa relacionada a baixa turbulência do líquido devido a baixos valores de velocidade superficial e a baixa produção de biogás. Com relação a transferência de massa interna, em ambas configurações quanto menor o diâmetro, menor a influência da resistência interna do grânulo.

Com o intuito de explorar a vantagem da manutenção de elevada concentração de biomassa em altas taxas de carregamento orgânico, Guo *et al.* (2008a) avaliaram a performance do EGSB em converter água residuária de melão em hidrogênio. O reator foi inicialmente operado na TCO de $8\text{kg DQO}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ elevando até $192\text{kg DQO}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$, mediante a variação do TDH (6 a 1h) e da concentração de afluente (2.000 a $10.000\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$). A produtividade máxima de $0,71\text{L H}_2\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$ e rendimento máximo de $3,47\text{mol H}_2\cdot\text{mol sacarose}^{-1}$ foram observados na TCO de $120\text{kg DQO}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$, com respectivos TDH e concentração afluente de 2h e $10000\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. A produção de metabólitos variou conforme o aumento da TCO, favorecendo a rota aceto-alcoólica. Os principais metabólitos produzidos foram o etanol em conjunto com os ácidos acético e butírico. A produção do etanol rebalanceou o equilíbrio metabólico entre NADH e NAD^+ . Entretanto, ao aumentar a TCO para $192\text{kg DQO}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$, tanto a produtividade quanto o rendimento de hidrogênio foram reduzidos. Este aumento causou a sobrecarga de substrato no reator, levando a inibição pelos produtos formados em excesso.

Buscando caracterizar a contribuição da retenção da biomassa na a produção de hidrogênio, Guo *et al.* (2008b) avaliaram a produção contínua de hidrogênio por cultura mista

em reator EGSB alimentado com água residuária de amido. O efeito da redução da TCO de 1 para 0,125g.L⁻¹.d⁻¹ foi avaliado variando o TDH entre 24 e 4h nas concentrações entre 4 e 18g DQO.L⁻¹. A fração volumétrica de hidrogênio variou entre 35 a 65% sem a presença de metano. De forma geral, o aumento do TDH desfavoreceu a produtividade de hidrogênio. A produtividade máxima de 1,64L.L⁻¹.d⁻¹ foi observada na TCO de 1g.L⁻¹.d⁻¹ (TDH de 4h e concentração afluenta de 4g DQO.L⁻¹). Por outro lado, o rendimento máximo de 0,11L.g DQO⁻¹ foi observado na TCO de 0,5g.L⁻¹.d⁻¹ (TDH de 8h e concentração afluenta de 4g DQO.L⁻¹). Nestas condições, os principais metabólitos observados foram o etanol e ácidos acético e butírico, caracterizando a prevalência da rota aceto-alcoólica.

Assumindo um modelo bidimensional, Wang et al. (2009) descreveram a produção de hidrogênio de um EGSB trifásico (gás-líquido-sólido) usando a dinâmica de fluidos computacional. O escoamento através do leito expandido do reator mesofílico operado por Guo *et al.* (2008a) foi avaliado nas variações de TDH (entre 6 e 1h) e concentração afluenta (2000 a 10000mg.L⁻¹), com conseqüente variação de TCO entre 8 a 192kg DQO.m⁻³.d⁻¹. Quando operado em elevados valores de TDH, o sistema trifásico apresentou um perfil de escoamento muito heterogêneo. O movimento lateral foi observado devido aos elementos de fluido que escoam através dos grânulos tomaram caminhos preferenciais de menor resistência. Assim, a recirculação interna ocorre e, por conseqüência, a água residuária não é distribuída de forma igual pelo leito e o perfil de velocidade do fluido é prejudicado. Em valores moderados e reduzidos de TDH, as pulsações axiais do líquido e as perturbações entre grânulos são reduzidos em conseqüência da crescente distância entre grânulos ocasionada pelo aumento da velocidade ascensional. Em conjunto com a ação do biogás, o regime de escoamento torna-se mais turbulento a medida que os valores de TDH são reduzidos. Comparando os resultados experimentais com as observações das simulações, os autores inferiram que o TDH afeta a produção de hidrogênio por meio da velocidade ascensional do fluido. Com a redução do TDH o comportamento hidrodinâmico favoreceu a interação entre fases. Entretanto, a escolha do TDH em faixa apropriada mostrou ser fundamental para a produção de hidrogênio, pois o rendimento de hidrogênio pode ser reduzido em valores de TDH excessivamente baixos. Isso ocorreu devido a alta turbulência que causa danos aos microrganismos e aos flocos de lodo, reduzindo o rendimento de hidrogênio.

Em sistemas de lodo granular a imobilização celular é obtida pela auto-agregação de microrganismos anaeróbios em grânulos na ausência de material suporte. Mas a principal desvantagem é o longo período necessário para inoculação e formação destes grânulos. Assim, Abreu *et al.* (2010) utilizaram a otimização de comunidades mistas para produção de

hidrogênio para adesão e adaptação em grânulos metanogênicos tratados termicamente. Neste estudos um reator EGSB foi inoculado apenas com grânulos tratados termicamente e outro reator foi inoculado com os mesmo grânulos, mas na presença de uma cultura otimizada para a produção de hidrogênio. O meio sintético utilizado continha glicose e arabinose (1:1), que são componentes de vários biopolímeros vegetais, na DQO de 5g.L⁻¹. A temperatura foi mantida a 70°C, variando o TDH entre 27 e 6h. O reator inoculado com cultura produtora de hidrogênio obteve produtividade máxima de 2,7L H₂.d⁻¹.L⁻¹ no TDH de 6h e rendimento máximo de 175mL H₂.g substrato⁻¹. Metano não foi observado no biogás e os principais metabólitos foram acetato, butirato e lactato, este último prevalecendo nos valores inferiores de TDH. Por outro lado o reator que contou apenas com o tratamento dos grânulos não obteve produção de hidrogênio. A principal diferença entre os reatores foi a presença de microrganismos produtores de hidrogênio dos gêneros *Clostridium* e *Klebsiella* no reator inoculado com cultura otimizada, garantindo o desenvolvimento estável e eficiente da produção de hidrogênio.

Avaliando o consumo preferencial de certos açúcares, Abreu *et al.*(2012) avaliaram a diversidade microbiana produtora de hidrogênio em reator EGSB termofílico extremo (70°C). Um reator foi operado com arabinose e outro com glicose no TDH em 9h, variando a TCO de 4,3 a 14,2kg DQO.m⁻³.d⁻¹. Em ambos os reatores gás metano não foi detectado e com o aumento da taxa de carregamento orgânico as produtividades e rendimentos foram aprimorados. O reator com arabinose obteve rendimento máximo de 1,1mol H₂.mol substrato⁻¹ com produtividade máxima de 3,2L H₂.d⁻¹.L⁻¹. No reator de glicose foi observado rendimento máximo de 0,75mol H₂.mol substrato⁻¹ e produtividade máxima de 2,0L H₂.d⁻¹.L⁻¹. Os principais metabólitos identificados foram butirato, acetato e lactato, sendo o último presente em maior quantidade no reator de glicose. A estrutura da comunidade microbiana foi a mesma apesar dos substratos diferentes, predominando *Thermoanaerobacterium* *Thermosaccharolyticum*. Assim, a produção de mais ácido lático esteve associada a mudança metabólica com o uso de glicose, não alterando a comunidade microbiana.

3.5 Considerações Preliminares

Após a revisão da literatura, observa-se que a aplicação da tecnologia anaeróbia para a produção de hidrogênio é uma alternativa promissora a atual matriz energética cronicamente dependente fontes não renováveis e poluidoras. As suas principais vantagens estão na não utilização de combustíveis fósseis, temperaturas e pressões de processo são similares a ambiente, baixo custo de materiais e a possibilidade da sinergia entre produção de energia e de tratamento de resíduos.

Entretanto, o atual desafio na aplicação industrial deste processo é a viabilidade econômica, que depende principalmente da fonte de substrato utilizada. A seleção da matéria prima baseia-se na disponibilidade, o custo, a pureza do substrato e a sua biodegradabilidade. Assim, recursos em potencial são os subprodutos de processos agroindustriais. Os países de grandes economias agrícolas, como o Brasil, têm potencial inexplorado de desenvolvimento econômico incorporando esta forma de produção de biohidrogênio na bioindústria.

Assim matérias primas interessantes são o soro de queijo, que é o subproduto gerado na etapa de precipitação/remoção da caseína do leite na produção de queijo, e a vinhaca, subproduto da produção de etanol na etapa de destilação do vinho. Ambos os subprodutos apresentam elevada biodegradabilidade, altas concentrações de açúcares e grande volume gerado em seus processos. Além disso, suas destinações incorretas podem gerar impactos severos no meio ambiente.

Diversos estudos foram realizados utilizando soro de queijo e vinhaça em condições mesofílicas. Entretanto, estudos na faixa termofílica e hipertermofílica ainda estão em menor quantidade. Processos termofílicos e hipertermofílicos geralmente apresentam maiores produtividades e rendimentos de hidrogênio e são interessantes na aplicação industrial, principalmente nos casos em que os subprodutos são lançados sob altas temperaturas, como a vinhaça. Entretanto, deve-se avaliar a condição ótima de operação, pois quanto maior a complexidade do substrato e/ou a carga aplicada, menor será a temperatura ótima para produção de hidrogênio devido a diminuição da diversidade microbiana que reduz a capacidade sinérgica de degradação do substrato pela comunidade.

O desenvolvimento, adaptação e operação dos reatores para produção fermentativa de hidrogênio ainda representam desafios e requerem pesquisas futuras nas diferentes configurações de reatores, como RALF e EGSB. Devido às vantagens operacionais destas

configurações como melhor contato entre o substrato e a comunidade microbiana, alta eficiência mesmo em elevadas taxas de carregamento orgânico e transferência de massa aprimorada, optou-se pelo estudo destas duas configurações.

Estudos anteriores constataram a eficiência da produção de hidrogênio em RALF e EGSB utilizando substratos simples e águas residuárias reais. De forma geral, vale ressaltar a convergência de resultados para a predominância dos ácidos acético e butírico como principais metabólitos formados e o aumento das produtividades com a operação do reator em tempos de detenção hidráulica reduzidos. Mas deve-se avaliar a faixa ótima de operação, pois o rendimento de hidrogênio obtém um valor máximo que após aumentar da taxa de carregamento orgânico aplicada, reduz o rendimento obtido devido a sobrecarga de substrato.

Frente às pesquisas previamente realizadas na área de tratamento de águas residuárias e de produção de hidrogênio, observa-se que a consolidação do desenvolvimento do processo fermentativo de produção de hidrogênio depende de diversos parâmetros de operação. Assim, para a futura realização do projeto de reatores anaeróbios mais eficientes que permitam a sinergia do tratamento de efluentes industriais e a produção de bioenergia se faz necessário a fundamentação dos efeitos de parâmetros de temperatura, TCO, TDH, concentração e composição de substrato em reatores de alta taxa com biomassa imobilizada.

Visto isso, com base nos bons resultados obtidos em pesquisas anteriores, a contribuição deste estudo para a literatura será a avaliação de condições termofílicas e hipertermofílicas para a produção de hidrogênio com soro de queijo e vinhaça como fontes de carbono em reator RALF; o estudo do efeito da concentração de soro de queijo e do TDH na produção de hidrogênio mesofílica em reator EGSB; e por fim a avaliação a estratégia de co-fermentação de vinhaça com soro de queijo.

4. Materiais e Métodos

Os conteúdos abordados neste capítulo apresentam a configuração dos reatores, as fontes de inóculo utilizadas para a produção biológica de hidrogênio, o método de pré-tratamento adotado, os procedimentos de partida e as diferentes estratégias de operação. Além disso, serão apresentados as caracterizações da vinhaça de cana de açúcar e do soro de queijo realizados ao longo do experimento, o detalhamento e a frequência das análises físico-químicas e os cálculos dos principais parâmetros para avaliar a produção biológica de hidrogênio.

Neste estudo duas configurações de reatores foram utilizadas: RALF e EGSB. Estas diferentes configurações estão embasadas por trabalhos anteriores realizados no grupo de pesquisa do Laboratório de Controle Ambiental II do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos (LCA-II, DEQ/UFSCar). O RALF é uma configuração baseada em diversos trabalhos de pesquisa científica publicados ao longo dos últimos sete anos com diferentes substratos (Amorim *et al.*, 2009; Barros *et al.*, 2010; Reis e Silva, 2011; Shida *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2014a). Por outro lado, o EGSB é uma configuração que tem apresentado de forma promissora resultados recentes na dissertação de Lopes (2015), utilizando como substratos glicerol e soro de queijo.

Por praticidade, os reatores utilizados neste estudo foram identificados por siglas conforme as condições de operação. A Tabela 4.1 apresenta o significado destas siglas.

Tabela 4.1 - Identificação dos reatores utilizados em todos os experimentos

| Sigla | Descrição |
|-------|---|
| RM5 | Reator EGSB mesofílico com 5g carboidrato.L ⁻¹ |
| RM15 | Reator EGSB mesofílico com 15g carboidrato.L ⁻¹ |
| RM25 | Reator EGSB mesofílico com 25g carboidrato.L ⁻¹ |
| RTS | Reator de efeito da temperatura alimentado com soro |
| RTV | Reator de efeito da temperatura alimentado com vinhaça |
| RTCV | Reator termofílico de co-fermentação alimentado com vinhaça |
| RTCVS | Reator termofílico de co-fermentação com vinhaça e soro |

4.1 Água Residuária

Neste estudo foram utilizadas as águas residuárias da produção de açúcar e etanol (vinhaça) e da produção de queijo (soro de queijo) em diferentes configurações de reatores. Durante a operação dos reatores foram adicionados nos seus afluentes as respectivas fontes de

carbono em conjunto com os nutrientes necessários ao crescimento celular de acordo com Del Nery (1987). A composição do meio nutricional está indicada na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Composição do meio nutricional no afluente

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

Fonte: Del Nery (1987)

4.1.1 Soro de Queijo

A água residuária de soro de queijo foi composta por este substrato em pó fornecido pela indústria Elegê Laticínios S.A., Teotônia, Brasil, produzido pela concentração do soro de queijo por evaporação e secagem por atomização. De acordo com Gabardo *et al.* (2014), uma solução de 70g.L⁻¹ de soro de leite em pó da marca Elegê apresenta concentrações de 60g lactose.L⁻¹, 9g proteínas.L⁻¹ e 1g minerais.L⁻¹. A caracterização do soro de queijo em pó identificou a concentração de nitrogênio Kjeldalh de 18 ± 1mg.g de soro⁻¹, equivalendo a 116 ± 10mg proteína.g de soro⁻¹. Os valores médios de diferentes soluções com 10000 mg.L⁻¹ de soro de leite em pó foram de 7822 ± 697mg.L⁻¹ de açúcares totais (lactose), 11009 ± 1030mg.L⁻¹ de DQO total e pH de 6,3 ± 0,1. Na Tabela 4.3 estão apresentadas as informações nutricionais cedidas pela empresa.

Tabela 4.3 - Informação nutricional soro de queijo Elegê

| Composição em porção de 26 gramas | |
|-----------------------------------|---------|
| 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: Indústria Elegê de Laticínios

4.1.2 Vinhaça de Cana de Açúcar

O substrato orgânico (vinhaça de cana-de-açúcar), utilizado para a alimentação dos reatores RALF termofílicos para a produção de hidrogênio, foi coletado na Usina São Martinho (Pradópolis, SP), produtora de etanol e açúcar, a partir de cana de açúcar como matéria-prima. Ao longo do experimento, as características da vinhaça coletada foram avaliadas, considerando aspectos físico-químicos, como carboidratos totais, DQO total, nitrogênio Kjeldahl, fósforo total (como PO_4^{3-}), enxofre total (como SO_4^{2-}), zinco, manganês, cobre, cálcio, magnésio, potássio, e a composição e distribuição de ácidos orgânicos (Tabela 4.4).

Tabela 4.4 - Caracterização média da vinhaça de cana de açúcar

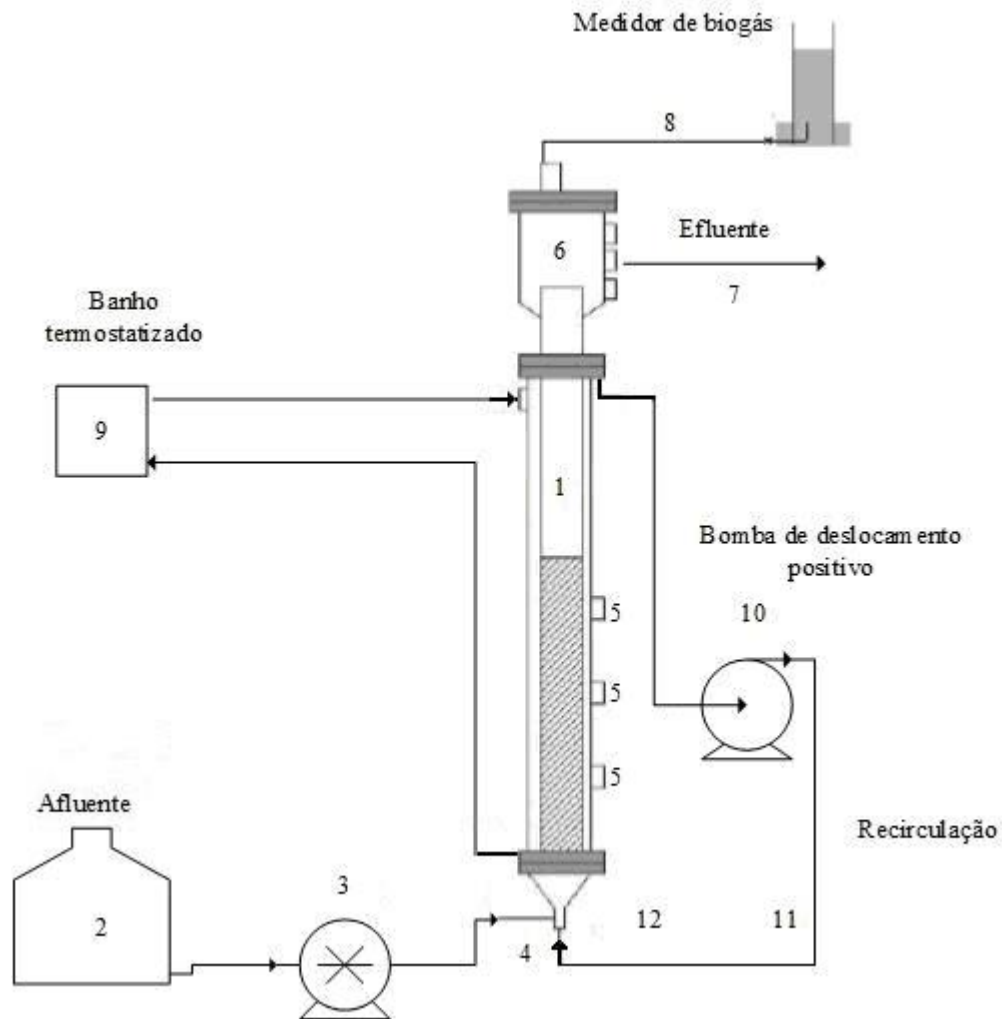
| Componente | Concentração (mg.L ⁻¹) | Componente | Concentração (mg.L ⁻¹) |
|-----------------------------|------------------------------------|-------------------|------------------------------------|
| Carboidrato total (glicose) | 6292 ± 1523 | Ácido Málico | 6191 ± 1215 |
| DQO | 28636 ± 5204 | Ácido Succínico | 2806 ± 660 |
| SO_4^{2-} | 2256 ± 362 | Ácido Lático | 7516 ± 170 |
| Sólidos Suspensos | 3184 ± 526 | Ácido Fórmico | 2463 ± 691 |
| Sólidos Suspensos Voláteis | 2689 ± 387 | Ácido Acético | 9928 ± 1114 |
| Sólidos Suspensos Fixos | 495 ± 169 | Ácido Propiônico | 3557 ± 1014 |
| Nitrogênio Kjeldahl Total | 744 ± 77 | Ácido Isobutírico | 3755 ± 847 |
| Metanol | 2315 ± 707 | Ácido Capróico | 809 ± 178 |
| Ácido Cítrico | 7482 ± 451 | | |

Devido à necessidade de uso de grandes quantidades de vinhaça durante a operação dos reatores e a dificuldade em sua obtenção no período de entressafra, foi realizado o armazenamento da vinhaça em freezer (-5°C).

4.2 Descrição dos Reatores

O diagrama da instalação geral dos RALF termofílicos e dos EGBS utilizados neste estudo é ilustrado na Figura 4.1. O substrato foi alimentado ao reator por meio de bomba dosadora de afluente para tornar a operação flexível e possibilitar a variação do tempo de detenção hidráulica. A recirculação foi realizada por uma bomba de deslocamento positivo para homogeneizar o meio fermentativo e fluidizar ou expandir o leito dos reatores RALF e EGSB, respectivamente. O armazenamento foi feito em um barrilete, renovando o seu volume diariamente.

Figura 4.1 – Esquema da instalação dos reatores



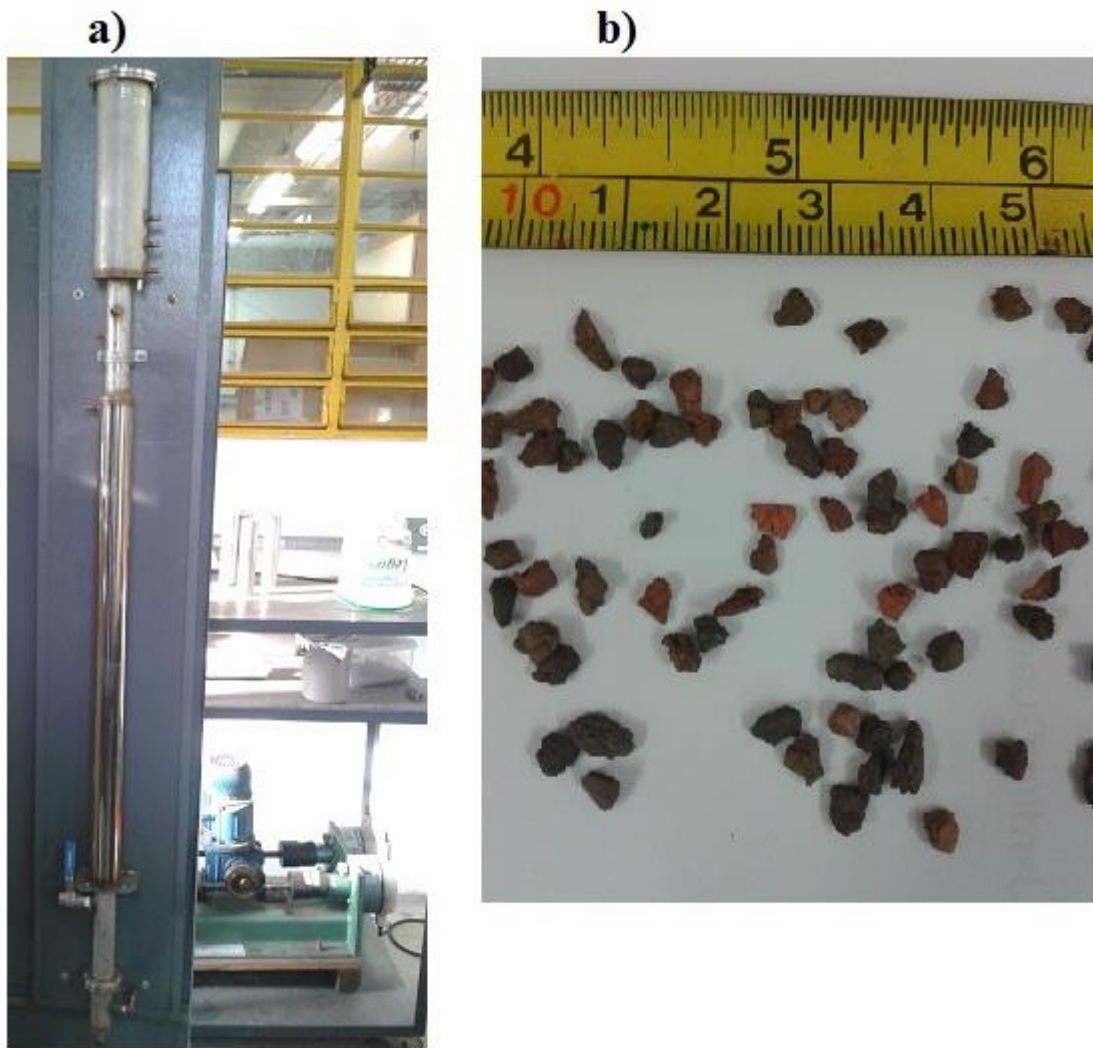
- (1) Reator, (2) reservatório de alimentação, (3) bomba de alimentação, (4) entrada do afluente, (5) amostradores, (6) câmara de captura de gás, (7) saída de efluente, (8) medidor de biogás de deslocamento de fluido, (9) banho termostático, (10) bomba de recirculação, (11) recirculação, (12) distribuidor da alimentação.

4.2.1 Reator Anaeróbio de Leito Fluidizado Termofílico

Os reatores RTS, RTV, RTCV e RTCVS utilizados foram construídos em aço inox 304, cada um com 4,1cm de diâmetro interno, 150cm de altura e volume total de 1980cm³. O controle de temperatura era realizado por um banho ultratermostático que circulava água pela câmara externa e serpentina interna do reator. Na Figura 4.2 são ilustradas fotografias do RALF termofílico e do material suporte utilizado.

O material suporte usado para imobilização e adesão da biomassa foi a argila expandida, com diâmetro entre 2,8 e 3,35mm, densidade aparente de 1,06g.cm⁻³ e 23% de porosidade. As características físicas da argila expandida são apresentadas na Tabela 4.5 e estão de acordo com Ortega *et al.* (2001).

Figura 4.2 – Fotos do RALF e do material suporte



(a) RALF termofílico; (b) partículas de argila expandida

Tabela 4.5 - Características físicas da argila expandida

| Característica | Valor |
|---|-------|
| Densidade real (g.cm^{-3}) | 1,5 |
| Densidade aparente (g.cm^{-3}) | 1,06 |
| Diâmetro médio do poro (mm) | 0,19 |

Fonte: Ortega *et al.* (2001)

As condições fluidodinâmicas do reator foram determinadas a partir dos dados experimentais de velocidade superficial e perda de carga descritos por Amorim (2009). As propriedades necessárias para determinar o ponto de operação que garantisse a fluidização do leito são apresentadas na Tabela 4.6. A taxa de recirculação dos biorreatores termofílicos foi

mantida a 78L.h^{-1} (expansão de 30%) e velocidade superficial de 1,30 vezes maior que a velocidade de mínima fluidização.

Tabela 4.6 - Diâmetro, densidade, porosidade e velocidade de mínima fluidização das partículas de argila expandida

| Diâmetro (mm) | Densidade (g.cm^{-3}) | Porosidade (%) | V_{mf} (cm.s^{-1}) |
|---------------|----------------------------------|----------------|---------------------------------|
| 2,8 - 3,35 | 1,06 | 23 | 1,24 |

V_{mf} – Velocidade de mínima fluidização

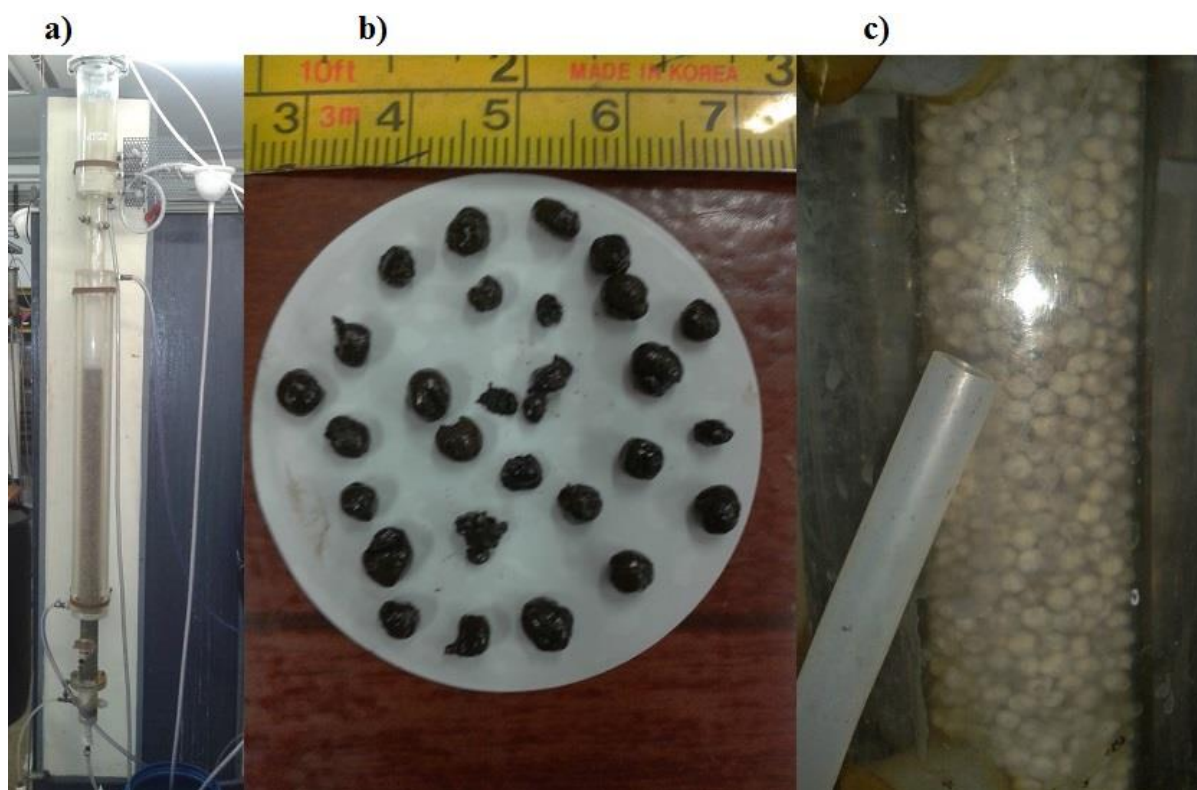
4.2.2 Reator Anaeróbico de Leito Granular Expandido Mesofílico

Os reatores RM5, RM15 e RM25 foram construídos em acrílico com controle de temperatura a 30°C realizado por um banho ultratermostatizado que circulava água pela câmara externa do reator. O reator RM5 apresentava 3,5cm de diâmetro interno, 81cm de altura e volume total de 778cm^3 . Os reatores RM15 e RM25 apresentavam 4,3cm de diâmetro interno, 150cm de altura e volume total de 2177cm^3 .

O material suporte usado para imobilização e adesão da biomassa foi o lodo granular proveniente de reator UASB usado no tratamento de água residuária de abatedouro de aves (Avícola Dakar S/A, Tietê/SP). Os grânulos foram submetidos ao método de pré-tratamento térmico (Kim *et al.*, 2006) promovendo a inibição da metanogênese, por meio da eliminação de células vegetativas metanogênicas e consumidoras de hidrogênio. Durante a operação do reator, a velocidade superficial foi mantida em $5,5\text{m.h}^{-1}$ pela recirculação de efluente de forma a garantir a expansão de 30% do leito granular.

Na Figura 4.3 estão ilustradas fotografias do reator anaeróbico de leito granular expandido mesofílico e das partículas de lodo granular usadas como material suporte.

Figura 4.3 – Fotos do EGSB e dos grânulos antes e depois da adaptação



(a) reator anaeróbio leito granular expandido; (b) grânulos pré-tratados termicamente; (c) grânulos após adaptação e adesão ao substrato

4.3 Obtenção de Inóculo Produtor de Hidrogênio: Pré-tratamento Térmico

As fontes de inóculo foram selecionadas para cada reator em virtude da condição de temperatura de operação: mesofílica (EGSB) ou termofílica (RALF). Em ambos os casos, a fim de se obter comunidades produtoras de hidrogênio o lodo foi submetido a um pré-tratamento térmico de acordo com a metodologia adaptada de Kim *et al.* (2006). O pré-tratamento consistiu de um aquecimento prévio do lodo por 10 minutos a 90°C com monitoramento de um termômetro e, em seguida, o lodo foi colocado em banho de gelo até que a temperatura atingisse 25°C. Este tratamento térmico possibilitou a eliminação de células vegetativas metanogênicas e acidogênicas não formadoras de endósporos e manteve as células acidogênicas com capacidade de formar endósporos, estruturas de resistência a condições desfavoráveis.

4.3.1 Inóculo do Reator Anaeróbio de Leito Fluidizado Termofílico

A fonte de inóculo utilizada para a partida operacional dos reatores RALF termofílicos foi proveniente de lodo granulado de reator anaeróbio termofílico de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB – lodo fermentativo-metanogênico) termofílico localizado na Usina São Martinho (Pradópolis, SP), para o tratamento de vinhaça. Este lodo apresenta pH de 7,06, concentração de sólidos voláteis totais de 41,3g.L⁻¹.

4.3.2 Inóculo do Reator Anaeróbio de Leito Granular Expandido Mesofílico

A fonte de inóculo utilizada para a partida operacional dos reatores EGSB mesofílicos foi proveniente de lodo granulado de reator UASB mesofílico localizado na Avícola Dakar S/A (Tietê, SP), para o tratamento de água residuária de abatedouro de aves. Este lodo apresenta concentrações de sólidos totais de 8,5g.L⁻¹, de sólidos totais fixos de 1,6g.L⁻¹ e de sólidos totais voláteis de 6,9g.L⁻¹.

4.4 Análises Físico-Químicas

Neste estudo foram realizadas análises físico-químicas durante a operação dos reatores para determinar os parâmetros de produção de hidrogênio e de metabólitos solúveis. Na Tabela 4.7 esta apresentada a frequência das análises físico-químicas realizadas.

A concentração de carboidratos totais de amostras provenientes das diferentes condições de operação dos reatores de produção biológica de hidrogênio foi realizada em triplicata por meio do método colorimétrico descrito por Dubois *et al.* (1956) utilizando glicose, para vinhaça, e lactose, para soro de queijo como padrões.

As concentrações de matéria orgânica das amostras de afluente e efluente deste estudo foram determinadas de acordo com o Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2012) em triplicata pelo método colorimétrico. As análises de nitrogênio foram realizadas segundo etapas de digestão, destilação e titulação (N Kjeldahl). As determinações de fósforo total (P_{total} como PO₄³⁻) foram feitas mediante digestão e avaliação por método colorimétrico, com metavanadato e molibdato de amônio.

Tabela 4.7 - Frequência das análises físico-químicas realizadas

| Análise | Frequência | Metodologia |
|--|-------------|------------------------------|
| Vazão | Diária | |
| pH | Diária | |
| DQO | 3x semana | Standard Methods (1998) |
| ST, SST, SSV | 3x semana | |
| Nitrogênio, sulfato e fosfato | Por amostra | |
| Açúcares totais (Lactose; Glicose) | 3x semana | Dubois <i>et al.</i> (1956) |
| Ácidos graxos e alcoóis individuais | 3x semana | HPLC Shimadzu |
| Conteúdo do biogás (H ₂ e CO ₂) | 3x semana | Shimadzu GC-2010 |
| Produção volumétrica de H ₂ | 3x semana | Walker <i>et al.</i> ,(2009) |

As concentrações de sulfato foram determinadas por meio da utilização de kits comerciais (HACH Dr 820 Field Test Kit®) e avaliadas por método colorimétrico. As concentrações de potássio, cálcio, magnésio, zinco, cobre foram feitas na caracterização da vinhaça de cana-de-açúcar, e realizadas por absorção atômica

e fotômetro de chama, em acordo com o Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2012). Para avaliar a concentração de sólidos suspensos totais, voláteis e fixos nas amostras de soro, vinhaça, afluentes e efluentes foi utilizada a filtração em membranas de microfibras de vidro (APHA, 2012). A análise de microscopia eletrônica teve como objetivo confirmar a presença e morfologia dos microrganismos aderidos aos respectivos suportes. A metodologia utilizada foi a mesma de Gonzalez *et al.* (2011).

4.4.1 Metabólitos Solúveis

As concentrações dos ácidos orgânicos (cítrico, málico, succínico, lático, fórmico, acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico, e capróico) e álcoois (etanol e metanol) foram determinadas por cromatografia líquida de elevado desempenho HPLC, Shimadzu®, aparelho equipado com bomba (LC-10ADVP), amostrador automático (SIL-20A HT), coluna CTO-20A, a 43 °C, detector de arraste (SDP-M10 AVP) e coluna Aminex HPX-87H (300mm, 7,8 mm, BioRad). A fase móvel foi representada pelo H₂SO₄ (0.01 N) a 0.5 ml.min⁻¹.

4.4.2 Determinação de Hidrogênio e da Composição do Biogás

A determinação do gás hidrogênio foi feita por cromatografia gasosa (Shimadzu GC-2010), sendo o aparelho equipado com detector de condutividade térmica, utilizando a coluna Supelco Carboxen 1010 Plot (30 m de comprimento e diâmetro interno de 0,53 mm). A análise de composição do biogás produzido foi feita por cromatografia gasosa utilizando seringa *gas tight* para retirar 0,1mL do biogás gerado no headspace em triplicada. 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 $21,9\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$. As temperaturas do forno, da coluna e do detector foram 130°C , 220°C e 230°C .

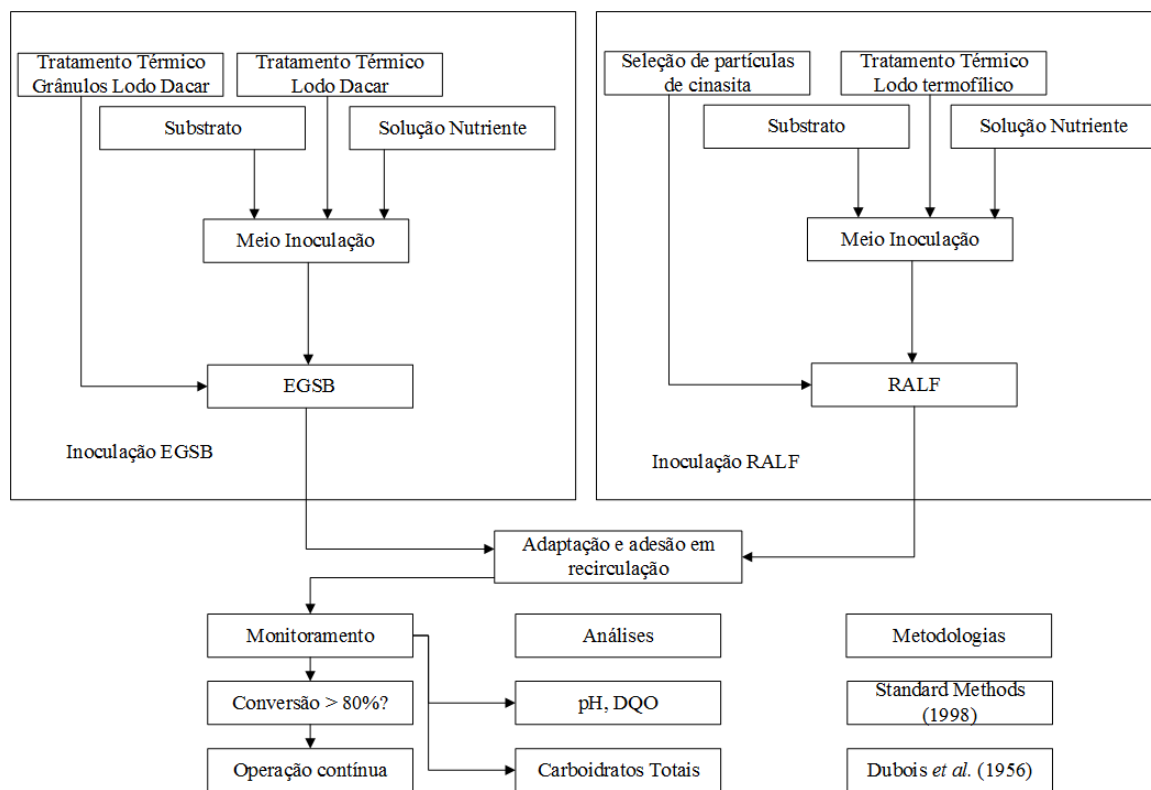
A produção volumétrica de todo o biogás formado no reator foi medida por meio do método de deslocamento de fluido adaptado de Walker *et al.* (2009). Nesta medida, o biogás gerado percorreu um tubo de comprimento maior que 20 cm acoplado ao reator que o conecta a um recipiente pulmão contendo solução salina (NaCl) saturada com pH corrigido abaixo de 2 por H_2SO_4 . Do recipiente pulmão, o biogás foi coletado em uma proveta graduada cheia da solução salina por determinado período de tempo. Cada procedimento de medição da vazão volumétrica de biogás consistiu em utilizar o volume de biogás quantificado pelo descolamento da solução salina na proveta ao longo do período definido. Desta forma, todo o biogás gerado foi quantificado e o vapor de água arrastado precipita no recipiente pulmão. O valor de vazão de biogás medido foi então multiplicado pela concentração de H_2 para se obter a produção volumétrica de H_2 .

4.5 Procedimento de Partida

O procedimento de partida dos reatores foi igual para todos os experimentos e o diagrama de blocos do procedimento geral é apresentado na Figura 4.4. Nos meios de alimentação foram adicionados as respectivas fontes de carbono na concentração desejada, meio nutritivo de acordo com Del Nery (1987) e o lodo tratado termicamente (10% do volume) específico para a respectiva condição de temperatura. O pH foi controlado entre 5 e 5,5 usando solução de HCl 30% (v/v) até a concentração máxima de $2\text{mL solução.L}^{-1}$. Caso

fosse necessário, ácido acético foi utilizado para finalizar a correção do pH. O meio foi borbulhado com nitrogênio por 10 minutos para garantir a anaerobiose.

Figura 4.4 – Diagrama de blocos do procedimento geral da inoculação dos reatores



Após a conexão dos meios de inoculação aos respectivos reatores, os RALF e os EGSB foram operados em modo batelada com a recirculação do seu efluente. Esta etapa garantiu a adaptação dos microrganismos a fonte de carbono e adesão do biofilme formado ao material suporte. Neste modo de operação o pH, a conversão de carboidrato e a concentração de matéria orgânica foram medidos diariamente, avaliando a adaptação ao substrato e mantendo o pH em faixa inibidora ao desenvolvimento de archaeas metanogênicas. Ao verificar a adaptação da biomassa pela elevada conversão de carboidrato, os reatores foram operados em modo contínuo, renovando diariamente a alimentação.

4.6 Condições Operacionais

No intuito de atingir os objetivos propostos, quatro experimentos foram planejados agrupando diferentes condições de operação dos reatores EGSB e RALF avaliando os

diferentes parâmetros físico-químicos de TDH, concentração afluenta, temperatura e co-fermentação de substratos utilizando soro de queijo e vinhaça de cana de açúcar.

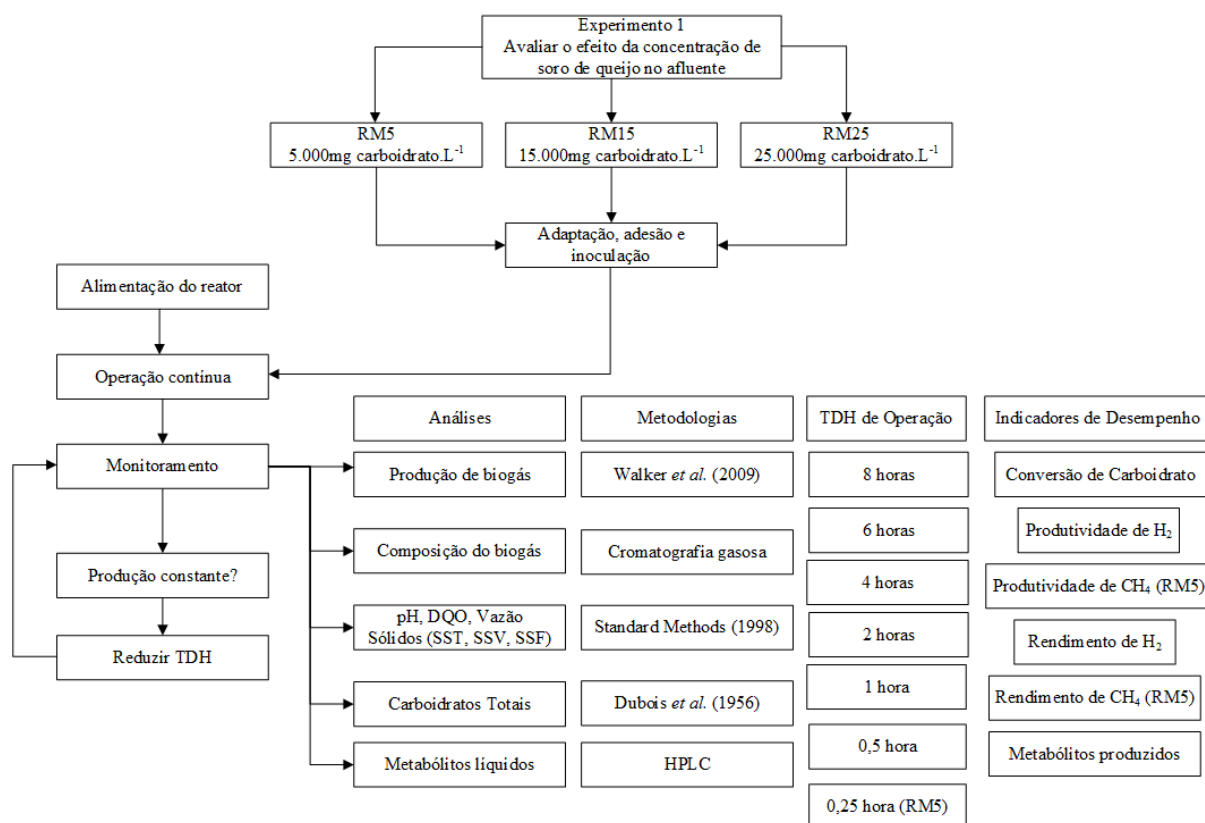
4.6.1 Análise do Efeito da Concentração de Substrato e do TDH em Reator EGSB Alimentado com Soro de Queijo

Os reatores RM5, RM15 e RM25 foram alimentados com solução de soro de leite em pó contendo 5.000, 15.000 e 25.000mg.L⁻¹ de açúcares totais (lactose), respectivamente. A produção de hidrogênio foi avaliada operando os reatores em modo contínuo na temperatura de 30°C. A operação contínua do RM5 foi realizada por 230 dias e por 260 dias para RM15 e RM25. Depois da inoculação os reatores foram inicialmente operados no TDH de 8h. Após a verificação do estado estacionário, mediante a estabilização dos resultados de produtividade e rendimento de hidrogênio, as condições de operação foram modificadas reduzindo os valores de TDH para 6h, 4h, 2h, 1h e finalmente 0,5h. Além disso, o reator RM5 foi operado no TDH de 0,25h. As condições e parâmetros de operação destes reatores são apresentadas na Tabela 4.8 e o diagrama de blocos da análise destes reatores é ilustrado na Figura 4.5.

Tabela 4.8 - Condições e parâmetros operacionais para avaliar o efeito da concentração de substrato e TDH em EGSB alimentado com soro de queijo

| Objetivo | | | | | | | |
|---|---|---|----------|---|----------|---|--|
| Avaliar o efeito da concentração de soro de queijo na produção de hidrogênio em EGSB mesofílico | | | | | | | |
| Reatores utilizados | | | | | | | |
| Informações | RM5 | | RM15 | | RM25 | | |
| Dimensões do reator | | | | | | | |
| Diâmetro interno (cm) | 3,5 | | 4,3 | | 4,3 | | |
| Altura (cm) | 81 | | 150 | | 150 | | |
| Volume total (cm ³) | 778 | | 2.177 | | 2.177 | | |
| Material de construção | Acrílico | | Acrílico | | Acrílico | | |
| Vazão de recirculação (L.h ⁻¹) | 5,3 | | 8 | | 8 | | |
| Material suporte | Grânulos do Lodo UASB tratamento água residuária de abatedouro de aves Dacar / Tiete, São Paulo | | | | | | |
| Temperatura (°C) | 30 | | | | | | |
| Biomassa inicial | | | | | | | |
| Fonte de inóculo | Lodo UASB mesofílico tratamento água residuária abatedouro de aves Dacar / Tiete, São Paulo | | | | | | |
| STV (g.L ⁻¹) | 6,9 | | | | | | |
| Operação contínua | | | | | | | |
| Carboidrato afluente (mg.L ⁻¹) | 5.000 | | 15.000 | | 25.000 | | |
| DQO afluente (mg.L ⁻¹) | 7.200 | | 22.200 | | 36.000 | | |
| Tempo de operação (d) | 230 | | 260 | | 260 | | |
| Condição de operação | TDH | TCO | TDH | TCO | TDH | TCO | |
| | (h) | (kgDQO.m ⁻³ .d ⁻¹) | (h) | (kgDQO.m ⁻³ .d ⁻¹) | (h) | (kgDQO.m ⁻³ .d ⁻¹) | |
| 1 | 8 | 22 | 8 | 67 | 8 | 108 | |
| 2 | 6 | 29 | 6 | 89 | 6 | 144 | |
| 3 | 4 | 43 | 4 | 133 | 4 | 216 | |
| 4 | 2 | 86 | 2 | 266 | 2 | 432 | |
| 5 | 1 | 173 | 1 | 533 | 1 | 864 | |
| 6 | 0,5 | 346 | 0,5 | 1066 | 0,5 | 1728 | |
| 7 | 0,25 | 691 | - | - | - | - | |

Figura 4.5 – Diagrama de blocos da análise para avaliar o efeito da concentração de soro de queijo e do TDH em reator EGSB mesofílico



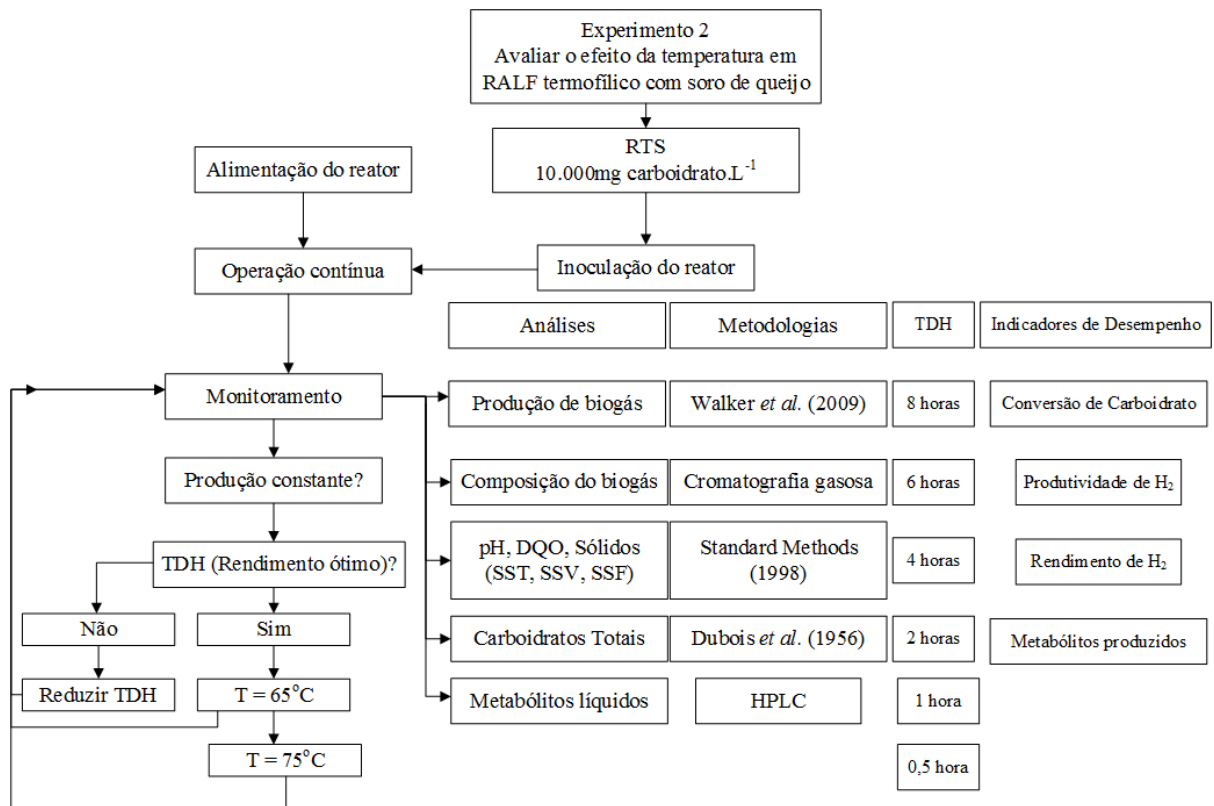
4.6.2 Análise do Efeito da Temperatura em RALF Alimentado com Soro de Queijo

O reator RTS foi alimentado com uma solução de soro de leite com pó contendo 10000mg.L⁻¹ de açúcares totais (lactose) em modo contínuo. A operação contínua do RTS foi realizada por 270 dias. Depois da inoculação a produção de hidrogênio foi avaliada operando o reator na temperatura de 55°C e no de TDH de 8h. Após a verificação do estado estacionário, mediante a estabilização dos resultados de produtividade e rendimento de hidrogênio, as condições de operação foram modificadas reduzindo os valores de TDH para 6h, 4h, 2h, 1h e finalmente 0,5h. Identificada a condição de melhor rendimento de hidrogênio, a temperatura foi aumentada para 65°C e 75°C. As condições e os parâmetros de operação são apresentadas na Tabela 4.9 e o diagrama de blocos das análises deste experimento é ilustrado na Figura 4.6.

Tabela 4.9 – Condições e parâmetros operacionais para avaliar o efeito da temperatura em RALF termofílico alimentado com soro de queijo

| Objetivo | | | |
|---|--|---|---|
| Avaliar o efeito da temperatura na faixa termofílica na produção de hidrogênio usando de soro de queijo em RALF | | | |
| Informações | | Reatores utilizados | |
| | | RTS | |
| Dimensões do reator | | | |
| Diâmetro interno (cm) | | 4,1 | |
| Altura (cm) | | 150 | |
| Volume total (cm ³) | | 1980 | |
| Material de construção | | Aço inóx 304 | |
| Vazão de recirculação (L.h ⁻¹) | | 78 | |
| Material suporte | | Argila expandida (cinasita) | |
| Biomassa inicial | | | |
| Fonte de inóculo | | Lodo UASB termofílico para tratamento de vinhaça Usina São Martinho Pradópolis, São Paulo | |
| STV (g.L ⁻¹) | | 41,3 | |
| Operação contínua | | | |
| Carboidrato afluente (mg.L ⁻¹) | | 10.000 | |
| DQO afluente (mg.L ⁻¹) | | 12.500 | |
| Tempo de operação (d) | | 270 | |
| Condição de operação | | T (°C) | TDH (h) TCO (kgDQO.m ⁻³ .d ⁻¹) |
| 1 | | 55 | 8 37,5 |
| 2 | | 55 | 6 50 |
| 3 | | 55 | 4 75 |
| 4 | | 55 | 2 150 |
| 5 | | 55 | 1 300 |
| 6 | | 55 | 0,5 600 |
| 7 | | 65 | 4 75 |
| 8 | | 75 | 4 75 |

Figura 4.6 – Diagrama de blocos da análise do efeito da temperatura em RALF termofílico alimentado com soro de queijo



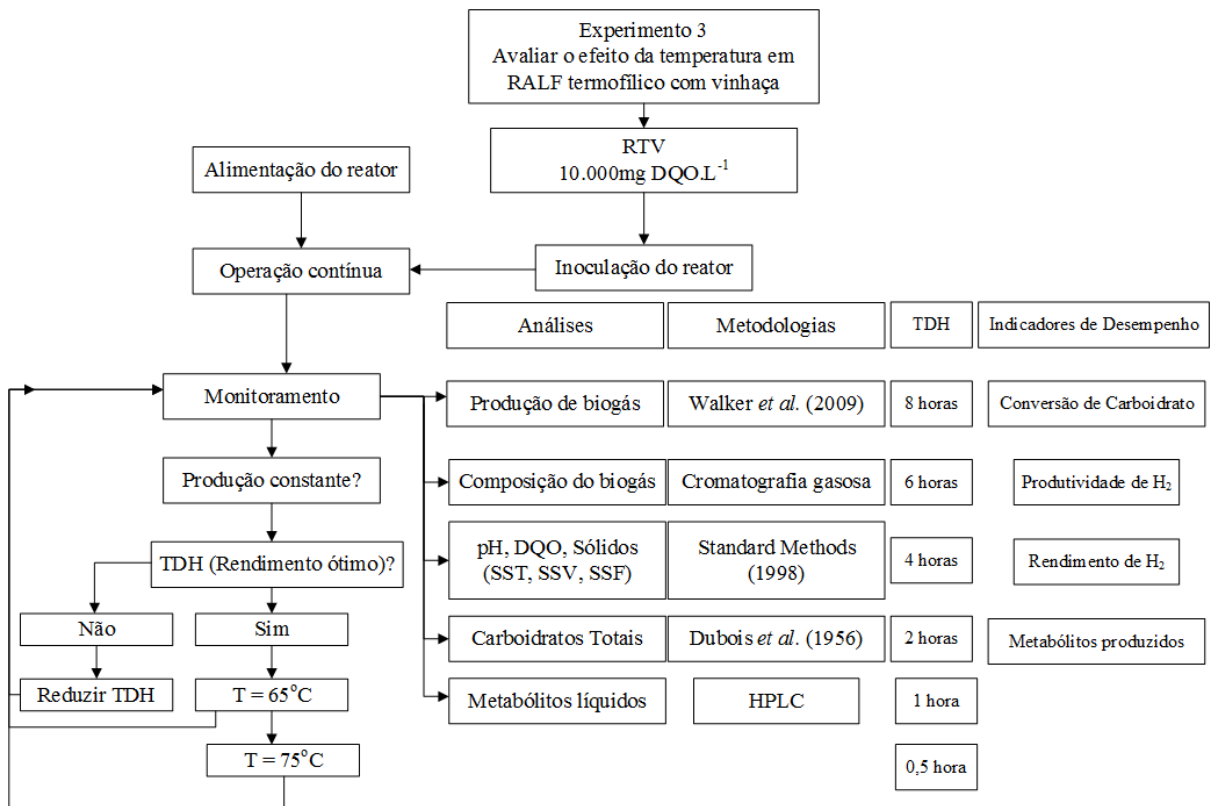
4.6.3 Análise do Efeito da Temperatura em RALF Alimentado com Vinhaça

O reator RTV foi alimentado de modo contínuo com vinhaça bruta na concentração de 10000mg DQO.L⁻¹. A operação contínua do RTV foi realizada por 270 dias. Depois da inoculação a produção de hidrogênio foi avaliada operando o reator na temperatura de 55°C e no de TDH de 8h. Após a verificação do estado estacionário, mediante a estabilização dos resultados de produtividade e rendimento de hidrogênio, as condições de operação foram modificadas reduzindo os valores de TDH para 6h, 4h, 2h, 1h e finalmente 0,5h. Identificada a condição de melhor rendimento de hidrogênio, a temperatura foi aumentada para 65°C e 75°C. As condições e os parâmetros de operação são apresentadas na Tabela 4.10 e o diagrama de blocos das análises deste experimento é ilustrado na Figura 4.7.

Tabela 4.10 – Condições e parâmetros operacionais para avaliar o efeito da temperatura em RALF alimentado com vinhaça

| Objetivo | | | |
|--|--|---|---|
| Avaliar o efeito da temperatura na faixa termofílica na produção de hidrogênio usando de vinhaça em RALF | | | |
| Informações | | Reatores utilizados | |
| | | RTV | |
| Dimensões do reator | | | |
| Diâmetro interno (cm) | | 4,1 | |
| Altura (cm) | | 150 | |
| Volume total (cm ³) | | 1980 | |
| Material de construção | | Aço inóx 304 | |
| Vazão de recirculação (L.h ⁻¹) | | 78 | |
| Material suporte | | Argila expandida (cinasita) | |
| Biomassa inicial | | | |
| Fonte de inóculo | | Lodo UASB termofílico para tratamento de vinhaça Usina São Martinho Pradópolis, São Paulo | |
| STV (g.L ⁻¹) | | 41,3 | |
| Operação contínua | | | |
| Carboidrato afluyente (mg.L ⁻¹) | | 2.100 | |
| DQO afluyente (mg.L ⁻¹) | | 10.000 | |
| Tempo de operação (d) | | 270 | |
| Condição de operação | | T (°C) | TDH (h) TCO (kgDQO.m ⁻³ .d ⁻¹) |
| 1 | | 55 | 8 30 |
| 2 | | 55 | 6 40 |
| 3 | | 55 | 4 60 |
| 4 | | 55 | 2 120 |
| 5 | | 55 | 1 240 |
| 6 | | 55 | 0,5 480 |
| 7 | | 65 | 4 60 |
| 8 | | 75 | 4 60 |

Figura 4.7 – Diagrama de blocos da análise do efeito da temperatura em RALF alimentado com vinhaça



4.6.4 Análise do Efeito da Co-digestão de Vinhaça e Soro de Queijo em RALF Termofílico

O reator RTCVS foi alimentado em modo contínuo com vinhaça bruta na concentração de 10000mg DQO.L⁻¹ e com soro de queijo em diferentes relações de vinhaça:soro (V:S). A produção de hidrogênio foi avaliada operando o reator na temperatura de 55°C e nos valores da relação V:S de 10:02, 10:04, 10:06, 10:08 e finalmente 10:10g DQO.L⁻¹.

De forma a comparar a produção de hidrogênio sem a adição de soro, o reator RTCV foi alimentado apenas com vinhaça bruta na concentração de 10000mg DQO.L⁻¹ em modo contínuo. A produção de hidrogênio foi avaliada operando o reator na temperatura de 55°C e nos valores de TDH de 8h, 6h, 4h, 2h e finalmente 1h.

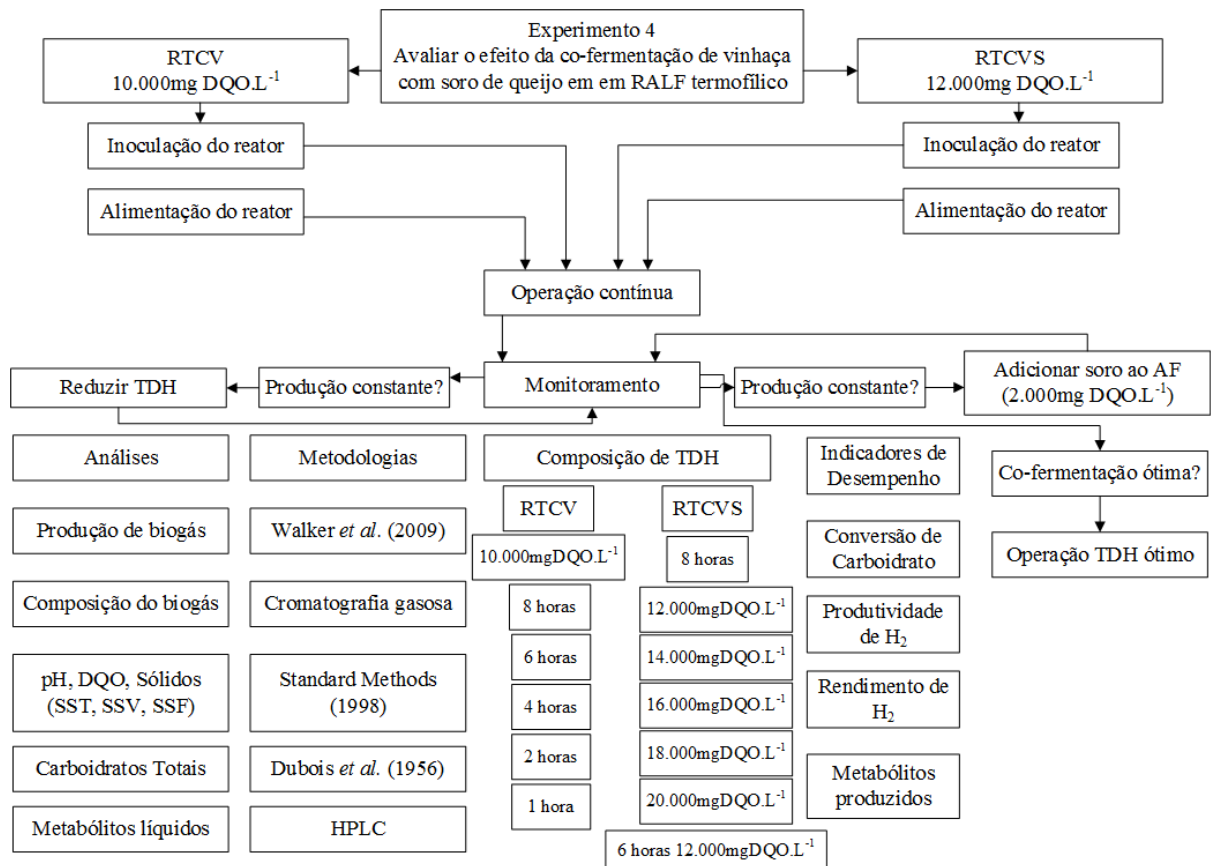
Determinado o TDH e a co-fermentação de máximo rendimento, o reator RTCVS foi operado nestas condições. O reator RTCVS foi operado por 270 dias e o reator RTCV foi

operado por 250 dias. As condições e os parâmetros de operação são apresentadas na Tabela 4.11 e o diagrama de blocos das análises deste experimento é ilustrado na Figura 4.8.

Tabela 4.11 - Condições e parâmetros operacionais para avaliar o efeito co-digestão de vinhaça e soro de queijo em RALF termofílico

| Objetivo | | | | | | | |
|--|---|---------|---|---------------------------|---------|---|--|
| Avaliar o efeito da co-fermentação de vinhaça com soro de queijo em RALF termofílico | | | | | | | |
| Reatores utilizados | | | | | | | |
| Informações | RTC | | | RTCVS | | | |
| Dimensões do reator | | | | | | | |
| Diâmetro interno (cm) | 4,1 | | | | | | |
| Altura (cm) | 150 | | | | | | |
| Volume total (cm ³) | 1980 | | | | | | |
| Material de construção | Aço inóx 304 | | | | | | |
| Vazão de recirculação (L.h ⁻¹) | 78 | | | | | | |
| Material suporte | Argila expandida (cinasita) | | | | | | |
| Temperatura (°C) | 55 | | | | | | |
| Biomassa inicial | | | | | | | |
| Fonte de inóculo | Lodo UASB termofílico tratamento vinhaça - Usina São Martinho / Pradópolis, São Paulo | | | | | | |
| STV (g.L ⁻¹) | 41,3 | | | | | | |
| Operação contínua | | | | | | | |
| Carboidrato afluyente (mg.L ⁻¹) | 2.100 | | | 2.800 - 7.200 | | | |
| Tempo de operação (d) | 250 | | | 270 | | | |
| Condição de operação | DQO (mg.L ⁻¹) | TDH (h) | TCO (kgDQO.m ⁻³ .d ⁻¹) | DQO (mg.L ⁻¹) | TDH (h) | TCO (kgDQO.m ⁻³ .d ⁻¹) | |
| 1 | 10.000 | 8 | 30 | 12.000 | 8 | 36 | |
| 2 | 10.000 | 6 | 40 | 14.000 | 8 | 42 | |
| 3 | 10.000 | 4 | 60 | 16.000 | 8 | 48 | |
| 4 | 10.000 | 2 | 120 | 18.000 | 8 | 54 | |
| 5 | 10.000 | 1 | 240 | 20.000 | 8 | 60 | |
| 6 | - | - | - | 12.000 | 6 | 48 | |

Figura 4.8 - Diagrama de blocos da análise do efeito co-digestão de vinhaça e soro de queijo em RALF termofílico



4.7 Parâmetros Operacionais

O contexto deste estudo é a avaliação e desenvolvimento de diferentes biorreatores. Assim, é de grande importância o detalhamento dos principais parâmetros utilizados e seus respectivos cálculos, os quais abrangem a taxa de carregamento orgânico aplicada, a produtividade volumétrica e o rendimento de hidrogênio. A taxa de carregamento orgânico aplicada representa a quantidade de matéria orgânica aplicada ao reator por unidades de tempo e volume de meio do reator, podendo ser calculada na forma teórica e na forma real:

$$TCO_{Aplicada,Teórica} = \frac{DQO_A}{TDH_{Teórico}} \quad (4.1)$$

$$TCO_{Aplicada,Real} = \frac{DQO_A}{TDH_{Real}} \quad (4.2)$$

sendo $TCO_{Aplicada,Teórica}$ a taxa de carregamento orgânico aplicada teórica (kg DQO.m⁻³.dia⁻¹), $TCO_{Aplicada,Real}$ a taxa de carregamento orgânico aplicada real (kg DQO.m⁻³.dia⁻¹), $TDH_{Teórico}$ o

tempo de detenção hidráulica teórico (dia), TDH_{Real} o tempo de detenção hidráulica real (dia) e DQO_A a demanda química de oxigênio do afluente ($kg.m^{-3}$).

A produtividade de hidrogênio relaciona a produção de hidrogênio por unidade de tempo com o volume do reator, sendo um parâmetro útil para o dimensionamento de equipamentos, pois permite avaliar a capacidade de produção de um reator a partir do seu volume ou estimar estes mesmos valores para alcançar uma produção desejada (Manssouri, 2012). A produtividade volumétrica (PVH) é calculada da seguinte forma:

$$PVH = \frac{V_{H_2}}{V_R} \quad (4.3)$$

sendo V_{H_2} a taxa de produção volumétrica de hidrogênio ($L H_2.h^{-1}$), V_R é o volume real do reator (L) e PVH é a produtividade volumétrica de hidrogênio ($L H_2.h^{-1}.L^{-1}$).

Os rendimentos por carga aplicada ou por carga removida podem ser expressos segundo duas unidades para as cargas aplicadas: a DQO ou o substrato. A DQO é mais utilizada no caso de um efluente com composição desconhecida e o substrato é de interesse para avaliar conversões realizadas pelas biotransformações. Nas duas formas, podem-se avaliar as cargas orgânicas em mol ou em massa, tendo a segunda maior transparência entre os diferentes substratos. O rendimento por carga aplicada é de interesse para determinar a capacidade de produção em função de quanto for alimentado. O rendimento por carga removida é de maior interesse para avaliar a forma pela qual o consumo por biotransformação leva à produção de hidrogênio (Manssouri, 2012). O rendimento de hidrogênio por carga aplicada pode ser calculado da seguinte forma:

$$HY = \frac{n_{H_2}}{TCO_{Aplicada,real}} \quad (4.4)$$

onde HY é o rendimento molar de hidrogênio produzido por carga aplicada ($mmol H_2.g DQO_{aplicada}^{-1}$) e n_{H_2} é a taxa de produção molar de hidrogênio ($mmol H_2.dia^{-1}$).

O rendimento molar de hidrogênio produzido por mol de carboidrato removido, pode ser calculado da seguinte forma:

$$HY_{mol} = \frac{n_{H_2} * 10^{-3}}{Q_A \cdot (C_{ST,A} - C_{ST,E})} \quad (4.5)$$

onde HY_{mol} é o rendimento molar de hidrogênio produzido por mol de carboidrato consumido ($mol H_2.mol_{carboidrato\ consumido}^{-1}$), Q_A é a vazão afluente ($L.dia^{-1}$), $C_{ST,A}$ é a concentração de carboidrato total no afluente ($mol\ carboidrato.L^{-1}$) e $C_{ST,E}$ é a concentração de carboidrato total no efluente ($mol\ carboidrato.L^{-1}$).

De forma análoga os mesmo parâmetros podem ser calculados para a produção de metano. A produtividade volumétrica ($PVCH_4$) é calculada da seguinte forma:

$$PVCH_4 = \frac{V_{CH_4}}{V_R} \quad (4.6)$$

sendo V_{CH_4} a taxa de produção volumétrica de metano ($L\ CH_4 \cdot h^{-1}$) e $PVCH_4$ é a produtividade volumétrica de metano ($L\ CH_4 \cdot h^{-1} \cdot L^{-1}$).

O rendimento de metano por carga aplicada pode ser calculado da seguinte forma:

$$CH_4Y = \frac{n_{CH_4}}{TCO_{Aplicada,real}} \quad (4.7)$$

onde CH_4Y é o rendimento molar de metano produzido por carga aplicada ($mmol\ CH_4 \cdot g\ DQO_{aplicada}^{-1}$) e n_{CH_4} é a taxa de produção molar de metano ($mmol\ CH_4 \cdot dia^{-1}$).

O rendimento molar de metano produzido por mol de carboidrato removido, pode ser calculado da seguinte forma:

$$CH_4Y_{MOL} = \frac{n_{CH_4} * 10^{-3}}{Q_A \cdot (C_{ST,A} - C_{ST,E})} \quad (4.8)$$

onde CH_4Y_{mol} é o rendimento molar de metano produzido por mol de carboidrato consumido ($mol\ CH_4 \cdot mol\ carboidrato\ consumido^{-1}$).

5. Resultados e Discussões

5.1 Efeito da Concentração de Substrato e do TDH na Produção de Hidrogênio a partir de Soro de Queijo em Reator EGSB Mesofílico

Os valores médios das conversões de açúcares totais (em lactose) e de matéria orgânica nas diferentes concentrações de substrato impostas aos reatores obtidos para cada TDH estão apresentados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 – Valores médios e desvios das conversões de carboidrato total e de matéria orgânica nas diferentes concentrações de soro de queijo

| TDH (h) | Conversão de Carboidrato (%) | | | Remoção de DQO (%) | | |
|------------|------------------------------|------------|------------|--------------------|-----------|-----------|
| | RM5 | RM15 | RM25 | RM5 | RM15 | RM25 |
| 8 | 94,0 ± 1,8 | 36,0 ± 2,6 | 33,7 ± 3,6 | 17,0 ± 2,6 | 4,6 ± 1,5 | 6,3 ± 1,8 |
| 6 | 94,5 ± 1,2 | 45,6 ± 3,9 | 35,8 ± 3,2 | 14,4 ± 2,8 | 9,8 ± 1,8 | 6,5 ± 1,5 |
| 4 | 95,7 ± 1,5 | 60,2 ± 3,3 | 38,5 ± 3,9 | 14,0 ± 2,8 | 9,9 ± 1,6 | 7,1 ± 0,9 |
| 2 | 95,6 ± 2,5 | 59,1 ± 4,5 | 37,9 ± 3,1 | 12,6 ± 2,5 | 9,6 ± 1,8 | 7,0 ± 2,1 |
| 1 | 91,2 ± 2,4 | 55,8 ± 3,0 | 11,9 ± 2,5 | 11,7 ± 2,7 | 7,5 ± 2,9 | 5,2 ± 3,7 |
| 0,5 | 59,5 ± 3,5 | 32,9 ± 4,5 | 8,7 ± 3,2 | 11,2 ± 3,5 | 6,1 ± 2,7 | 5,2 ± 2,0 |
| 0,25 | 44,4 ± 9,5 | - | - | 8,3 ± 2,3 | - | - |

No reator RM5, os valores de conversão de carboidrato observados nos valores de TDH de 8h a 1h permaneceram estáveis entre 91,2 ± 2,4 % e 95,6 ± 2,5 %, com valor máximo observado no TDH de 4h. Com a redução do TDH para valores abaixo de 1h os valores de conversão de carboidrato foram reduzidos ao valor mínimo de 44,4 ± 9,5 %, observado no TDH de 0,25h.

Os valores de conversão de carboidrato observados nos reatores RM15 e RM25 foram crescentes com a redução dos valores de TDH de 8h para 4h, com os valores máximos de 60,2 ± 3,3 % (RM15) e 38,5 ± 3,94 % (RM25). Com a redução do TDH para valores abaixo de 2h os valores de conversão de carboidrato foram reduzidos aos valores mínimos de 32,9 ± 4,5 % no RM15 e de 8,7 ± 3,2 % no RM25.

Observa-se que o TDH de 4h obteve os valores máximos de conversão de carboidrato em todas as concentrações, com valor máximo na concentração de 5000mg carboidrato.L⁻¹ (RM5). Além disso, a progressiva redução dos valores de TDH diminuiu os valores de conversão de carboidrato. Resultados similares foram observados em outros estudos presentes na literatura. Utilizando RALF em condições mesofílicas, Rosa *et al.* (2014) avaliaram diferentes TDH (4, 2 e 1h) na produção de hidrogênio a partir de soro de queijo, com concentração matéria orgânica de 5000mg DQO.L⁻¹. Com a redução do TDH, a conversão de lactose foi reduzida de 95% para 85%

Em relação as conversões de matéria orgânica observadas no reator RM5, os valores decresceram com a redução dos valores de TDH de 8h para 0,25h, com valor máximo de $17,0 \pm 2,6$ % obtido no TDH de 8h e valor mínimo de $8,3 \pm 2,3$ %, no TDH de 0,25h. Nos reatores RM15 e RM25 os valores de conversão de matéria orgânica foram próximos de $4,6 \pm 1,5$ % e $9,9 \pm 1,6$ %. Os valores máximos obtidos no TDH de 4h foram $9,9 \pm 1,6$ %, para RM15, e $7,1 \pm 0,9$ % para RM25.

Como observado pelos baixos valores de conversão de matéria orgânica, os reatores RM5, RM15 e RM25 converteram os carboidratos a biogás e ácidos orgânicos. Por serem reatores acidogênicos, estes são incapazes de realizar a conversão completa da matéria orgânica a metano. Utilizando soro de queijo em reator de leito fixo para produção de hidrogênio, Perna *et al.* (2013) observaram conversões de matéria orgânica entre 16,5% e 31,7%.

A estratégia escolhida para RM5, com aplicação de concentração afluyente de $5000\text{mg carboidrato.L}^{-1}$ no TDH de 8h, provocou conversão máxima de matéria orgânica. Por outro lado, a operação dos reatores em concentrações maiores ou valores reduzidos de TDH diminuíram a conversão da matéria orgânica. Assim, a alimentação em concentrações reduzidas de soro de queijo com valores elevados de TDH favorecem a conversão deste substrato. Similarmente Yu e Fang (2001), utilizando água residuária do processamento de queijo em reator UASB observaram a redução dos valores de conversão de substrato de 57,1% para 28,8 % com o aumento da concentração de 2g.L^{-1} para 30g.L^{-1} . Utilizando a metodologia de superfície de resposta, Yang, Yu e Hwang (2003) maximizaram a produção de ácido acético a partir de água residuária de soro de queijo no TDH de 9,6h.

Os valores de pH medidos para o afluyente e o efluente nas condições operacionais são mostrados na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 – Valores médios e desvios do pH afluyente e efluente nas diferentes concentrações de soro de queijo

| TDH (h) | RM5 | | RM15 | | RM25 | |
|------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | pH _{AF} | pH _{EF} | pH _{AF} | pH _{EF} | pH _{AF} | pH _{EF} |
| 8 | $7,4 \pm 0,8$ | $4,1 \pm 0,2$ | $7,4 \pm 0,3$ | $4,0 \pm 0,2$ | $7,2 \pm 0,4$ | $4,0 \pm 0,3$ |
| 6 | $6,8 \pm 0,3$ | $4,1 \pm 0,1$ | $7,8 \pm 0,2$ | $4,1 \pm 0,2$ | $7,6 \pm 0,2$ | $4,0 \pm 0,1$ |
| 4 | $6,8 \pm 0,3$ | $4,1 \pm 0,1$ | $7,8 \pm 0,2$ | $4,2 \pm 0,2$ | $7,7 \pm 0,2$ | $4,1 \pm 0,2$ |
| 2 | $6,7 \pm 0,1$ | $4,0 \pm 0,1$ | $7,8 \pm 0,3$ | $4,2 \pm 0,1$ | $7,6 \pm 0,2$ | $4,3 \pm 0,1$ |
| 1 | $6,8 \pm 0,2$ | $4,0 \pm 0,1$ | $7,9 \pm 0,5$ | $4,3 \pm 0,3$ | $7,7 \pm 0,6$ | $4,2 \pm 0,2$ |
| 0,5 | $6,8 \pm 0,2$ | $4,0 \pm 0,2$ | $7,8 \pm 0,5$ | $4,2 \pm 0,1$ | $7,5 \pm 0,5$ | $4,2 \pm 0,2$ |
| 0,25 | $6,6 \pm 0,1$ | $4,3 \pm 0,1$ | - | - | - | - |

Observa-se que os valores de pH efluente foram menores que os valores de pH

afluente, verificando a acidificação do soro de queijo em todas as condições de operação. O pH do meio fermentativo, equivalente ao pH efluente, manteve-se dentro da faixa estabelecida entre 4,0 e 4,3 para favorecer a produção de hidrogênio e inibir os microrganismos produtores de metano. Essa manutenção foi controlada pela adição de NaHCO₃ e de solução NaOH 6,0M no afluente em função do pH efluente observado. Segundo Ferchichi *et al.* (2005) os melhores valores de taxa de produção e rendimento de hidrogênio utilizando soro de leite são obtidos no valor de pH inicial próximo a 6.

Os valores médios de sólidos suspensos totais (SST), voláteis (SSV) e fixos (SSF) medidos ao longo dos diferentes valores de TDH aplicados são apresentados na Tabela 5.3. A maior parte dos sólidos suspensos contidos no efluente dos reatores foi representada por sólidos suspensos voláteis com porcentagens entre 90,2% e 96,7% para todos os reatores ao longo da variação do TDH. O reator RM25 apresentou o valor de sólidos suspensos máximo de 2316mg.L⁻¹ no TDH de 2h. Quanto maior a concentração de soro de queijo no substrato, maior a concentração de sólidos suspensos observados no efluente do reator.

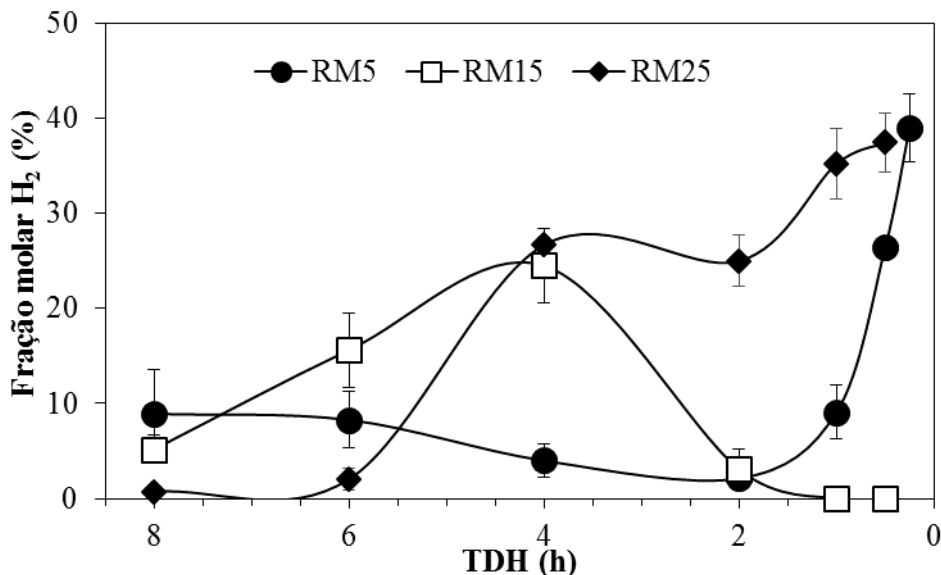
Tabela 5.3 – Valores médios de SST, SSV e SSF para RM5, RM15 e RM25

| Reator | TDH (h) | SST (mg.L ⁻¹) | SSV (mg.L ⁻¹) | SSF (mg.L ⁻¹) | SSV (%) | SSF (%) |
|--------|---------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------|---------|
| RM5 | 8 | 556 | 511 | 45 | 91,9 | 8,1 |
| | 6 | 614 | 576 | 38 | 93,8 | 6,2 |
| | 4 | 696 | 646 | 50 | 92,8 | 7,2 |
| | 2 | 789 | 756 | 33 | 95,8 | 4,2 |
| | 1 | 717 | 658 | 59 | 91,8 | 8,2 |
| | 0,5 | 683 | 616 | 67 | 90,2 | 9,8 |
| | 0,25 | 669 | 627 | 43 | 93,6 | 6,4 |
| | RM15 | 8 | 757 | 721 | 36 | 95,2 |
| 6 | | 856 | 799 | 57 | 93,4 | 6,6 |
| 4 | | 1856 | 1799 | 57 | 96,9 | 3,1 |
| 2 | | 1724 | 1634 | 90 | 94,8 | 5,2 |
| 1 | | 1113 | 1068 | 45 | 96,0 | 4,0 |
| 0,5 | | 619 | 594 | 25 | 96,0 | 4,0 |
| RM25 | 8 | 981 | 937 | 44 | 95,5 | 4,5 |
| | 6 | 1079 | 1027 | 52 | 95,2 | 4,8 |
| | 4 | 1698 | 1603 | 94 | 94,4 | 5,6 |
| | 2 | 2316 | 2196 | 120 | 94,8 | 5,2 |
| | 1 | 2176 | 2104 | 72 | 96,7 | 3,3 |
| | 0,5 | 2164 | 2082 | 82 | 96,2 | 3,8 |

Durante a operação dos reatores EGSB mesofílicos, a composição do biogás produzido foi analisada para avaliar a produção de hidrogênio. As variações de composição do hidrogênio presente no biogás produzido e do metano observado no reator RM5 em função das condições de operação são ilustradas nas Figura 5.1 e 5.2, respectivamente. Os valores médios da fração molar de hidrogênio e de metano no biogás com os respectivos desvios são

mostrados na Tabela 5.4.

Figura 5.1 – Variações dos valores fração molar de H₂ em função do TDH para diferentes concentrações de soro de queijo



Os valores de fração molar hidrogênio obtidas no biogás produzido pelo reator RM5 mantiveram-se estáveis entre $2,1 \pm 0,8$ % e $9,1 \pm 2,8$ % nos valores de TDH de 8h a 1h. Com a aplicação de valores de TDH inferiores a 1h, os valores de fração molar de hidrogênio aumentaram para $26,5 \pm 0,9$ %, no TDH de 0,5h, e para $39,6 \pm 3,0$ % no TDH de 0,25h, no qual seu valor foi máximo. Apesar do tratamento térmico e valores de pH no reator abaixo de 5, a produção de metano foi observada a partir do TDH de 4 horas. Isso indica que as archaea metanogênicas estavam presentes no meio fermentativo e necessitaram de um maior tempo de adaptação, produzindo metano após 103 dias de operação contínua. A diminuição dos valores de TDH reduziram os valores de fração molar de metano, com valor mínimo de $11,7 \pm 1,0$ % observado no TDH de 0,25h. O valor máximo de composição de metano no biogás foi de $28,9 \pm 4,9$ %, observado no TDH de 4h.

Ao reduzir os valores de TDH de 8h para 4h o reator RM15 obteve perfil crescente de fração molar de hidrogênio com valor máximo de $23,6 \pm 4,9$ %. A redução dos valores de TDH abaixo de 4h depreciou a fração molar de hidrogênio, não observando produção de hidrogênio nos valores de TDH de 1h e 0,5h. No reator RM25 a diminuição do TDH de 8h para 0,5h elevou os valores fração molar de hidrogênio de $0,7 \pm 0,1$ % para $37,5 \pm 3,1$ %, observado no TDH de 0,25h.

Figura 5.2 – Variações dos valores de fração molar de CH₄ em função do TDH para RM5

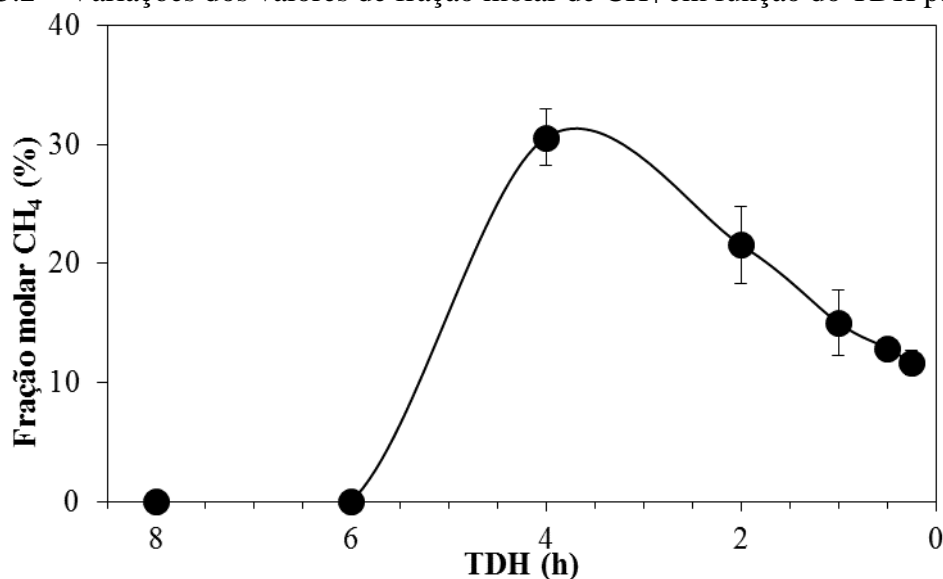


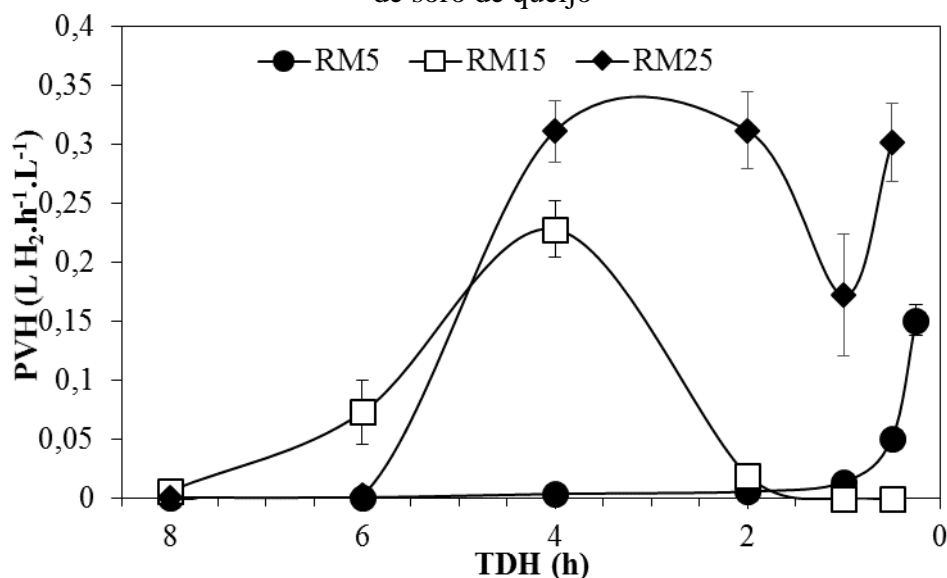
Tabela 5.4 – Valores médios e desvios das frações molar de H₂ e CH₄ no biogás produzido nas diferentes concentrações de soro de queijo

| TDH (h) | CH ₄ (%) | | H ₂ (%) | |
|---------|---------------------|------------|--------------------|------------|
| | RM5 | RM5 | RM15 | RM25 |
| 8 | 0 | 8,9 ± 4,6 | 5,2 ± 1,5 | 0,7 ± 0,1 |
| 6 | 0 | 8,3 ± 3,0 | 15,6 ± 3,9 | 2,0 ± 1,1 |
| 4 | 30,6 ± 2,4 | 4,0 ± 1,7 | 24,5 ± 3,9 | 26,7 ± 0,8 |
| 2 | 21,6 ± 3,2 | 2,1 ± 0,8 | 3,1 ± 2,1 | 25,0 ± 2,7 |
| 1 | 15,0 ± 2,8 | 9,1 ± 2,8 | 0 | 35,2 ± 3,7 |
| 0,5 | 12,9 ± 0,2 | 26,5 ± 0,9 | 0 | 37,5 ± 3,1 |
| 0,25 | 11,7 ± 1,0 | 39,6 ± 3,5 | - | - |

As maiores frações molares de hidrogênio, próximas a 40%, foram obtidas nos reatores RM5 e RM25, durante a aplicação dos TDH de 0,25h e de 0,5h, respectivamente. Metano foi verificado apenas no reator RM5, com valor máximo de 30% observado no TDH de 4h. Em comparação com a literatura, estes valores foram similares aos valores observados em Rosa *et al.* (2014), que obteve o valor máximo de fração molar de H₂ de 40% operando um RALF em condições mesofílicas em TDH de 1h. Metano foi observado com fração molar máxima de 17%. Castelló *et al.* (2009) utilizando reator UASB com soro de leite não esterilizado também observaram composições de metano no biogás produzido de até 20% na TCO de 10 kg DQO.m⁻³.d⁻¹..

Na Tabela 5.5 estão apresentados os valores médios e os desvios da PVH e da PVCH₄. Na Figura 5.3 é ilustrado o comportamento da variação dos valores de PVH em função do TDH e na Figura 5.4 a variação dos valores de PVCH₄ para RM5.

Figura 5.3 – Variação dos valores de PVH em função do TDH para diferentes concentrações de soro de queijo



Observa-se que os valores de PVH foram crescentes com a diminuição do TDH no reator RM15, com valor máximo de $0,151 \pm 0,013 \text{ L H}_2\text{.h}^{-1}\text{.L}^{-1}$. A PVH do reator RM15 elevou-se com a redução do valor de TDH de 8h para 4h, com valor máximo de $0,228 \pm 0,024 \text{ L H}_2\text{.h}^{-1}\text{.L}^{-1}$. Entretanto, a aplicação de valores menores de TDH reprimiu a PVH, não observando produção em valores de TDH inferiores a 2h. No reator RM25 a redução do TDH de 8h para 2h favoreceu a PVH, obtendo seu valor máximo de $0,312 \pm 0,032 \text{ L H}_2\text{.h}^{-1}\text{.L}^{-1}$ no TDH de 4h. No TDH de 1h a PVH foi reduzida para $0,173 \pm 0,051 \text{ L H}_2\text{.h}^{-1}\text{.L}^{-1}$ e no TDH 0,5h apresentou PVH de $0,302 \pm 0,033 \text{ L H}_2\text{.h}^{-1}\text{.L}^{-1}$. De forma similar, Fernandez, Cuetos e Gómez (2015) operando um reator mesófilico de batelada sequencial para produção de hidrogênio a partir de soro de queijo, observaram que com a redução do TDH de 3 dias para 1,5 dia a PVH foi elevada de $0,15 \text{ L H}_2\text{.L}^{-1}\text{.d}^{-1}$ para $0,19 \text{ L H}_2\text{.L}^{-1}\text{.d}^{-1}$.

A alimentação de concentrações maiores de soro de queijo favoreceu a PVH, com reator RM25 obtendo o maior valor de PVH de $0,312 \pm 0,032 \text{ L H}_2\text{.h}^{-1}\text{.L}^{-1}$ na concentração de soro de queijo de $25.000 \text{ mg carboidrato.L}^{-1}$. Resultados similares são apresentados na literatura por Yu e Fang (2001) investigando a influência da concentração do substrato na acidificação da água residuária da indústria de laticínios. Os autores observaram aumento da taxa de produção de biogás com o aumento da DQO da água residuária, reduzindo a produção de metano para níveis não detectáveis a partir de 8 g DQO.L^{-1} em favorecimento da produção de hidrogênio. Kargi, Eren e Ozmihci (2012a) avaliando a produção de hidrogênio a partir de soro de queijo nas concentrações de 5,2 a $28,5 \text{ g açúcares totais.L}^{-1}$ observaram produção cumulativa máxima de hidrogênio de 257 mL com $20 \text{ g açúcares totais.L}^{-1}$. Avaliando a cinética de produção de hidrogênio a partir de soro de queijo nas concentrações entre 5 a

25g.L⁻¹, Davila-Vazquez et al. (2008). Observaram que os valores de produção volumétrica de hidrogênio com soro de leite aumentaram com o aumento da concentração inicial com valor máximo de produção volumétrica de 8,1 mmol H₂.L⁻¹.h⁻¹ na concentração inicial de 25 g.L⁻¹.

Figura 5.4 – Variação dos valores de PVCH₄ em função do TDH para RM5

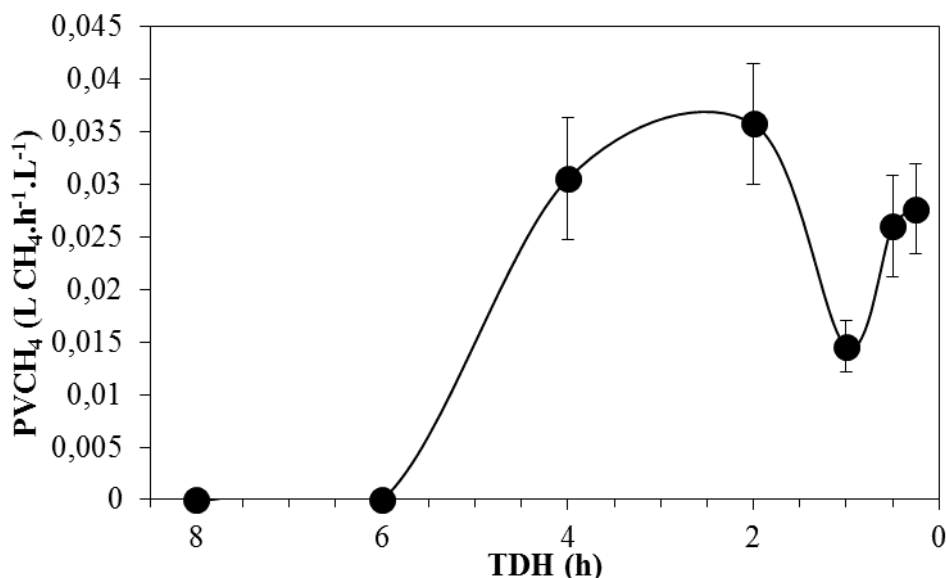


Tabela 5.5 – Valores médios e desvios de PVH e PVCH₄ em função do TDH nas diferentes concentrações de soro de queijo

| TDH (h) | PVCH ₄ (L.h ⁻¹ .L ⁻¹) | | PVH ₂ (L.h ⁻¹ .L ⁻¹) | |
|---------|---|-----------------|--|-----------------|
| | RM5 | RM5 | RM15 | RM25 |
| 8 | 0 | 0,0012 ± 0,0005 | 0,007 ± 0,002 | 0,0007 ± 0,0005 |
| 6 | 0 | 0,0012 ± 0,0003 | 0,073 ± 0,027 | 0,0028 ± 0,0013 |
| 4 | 0,031 ± 0,006 | 0,004 ± 0,001 | 0,228 ± 0,024 | 0,312 ± 0,026 |
| 2 | 0,036 ± 0,006 | 0,006 ± 0,002 | 0,020 ± 0,010 | 0,312 ± 0,032 |
| 1 | 0,015 ± 0,002 | 0,014 ± 0,003 | 0 | 0,173 ± 0,051 |
| 0,5 | 0,026 ± 0,005 | 0,051 ± 0,007 | 0 | 0,302 ± 0,033 |
| 0,25 | 0,028 ± 0,004 | 0,151 ± 0,013 | - | - |

Por outro lado, a PVCH₄ do reator RM5 foi favorecida com a redução do TDH de 8h a 2h, obtendo valor máximo de 0,036 ± 0,006L CH₄.h⁻¹.L⁻¹. Em comparação com a literatura, Rosa *et al.* (2014) avaliando o efeito do TDH na produção de hidrogênio a partir de soro de queijo em RALF mesofílico observaram valores máximos produtividade de hidrogênio (0,51L H₂.h⁻¹.L⁻¹) e de metano (0,68L CH₄.h⁻¹.L⁻¹) no TDH de 1 hora.

Outro parâmetro importante para avaliar a produção de hidrogênio, o HY relaciona a produção de hidrogênio por unidade de tempo com carga orgânica aplicada no reator, possibilitando a observação de efeitos de inibição por sobrecarga de substrato. As variações do rendimento de hidrogênio nas diferentes condições de operação são ilustradas na Figura

5.5. Na figura 5.6 é ilustrado a variação do rendimento de metano no RM5. Na Tabela 5.6 encontram-se os valores médios de HY e CH₄Y em função das diferentes condições operacionais de TDH e as respectivas TCO aplicadas.

Figura 5.5 – Variação dos valores de HY em função do TDH para as diferentes concentrações

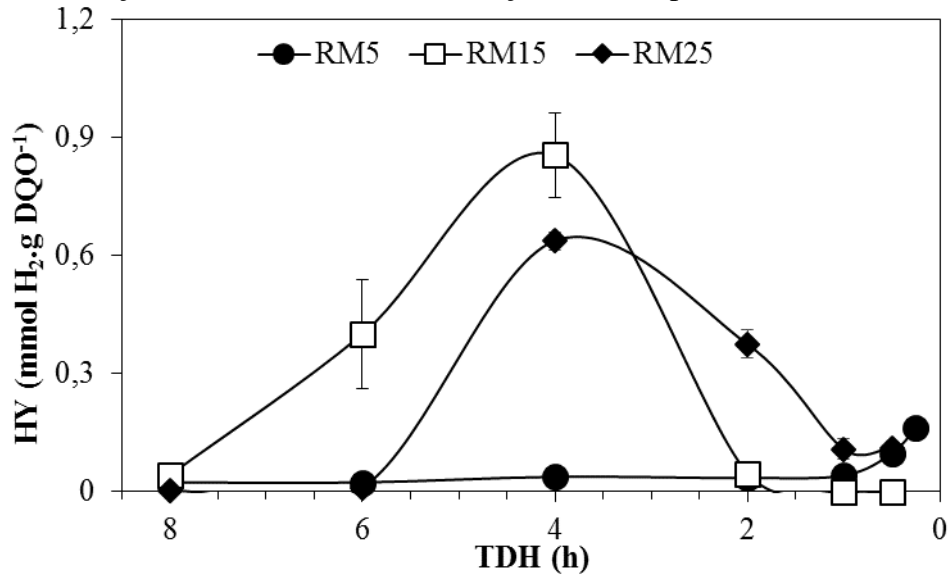


Figura 5.6 – Variação dos valores de CH₄Y em função do TDH para reator RM5

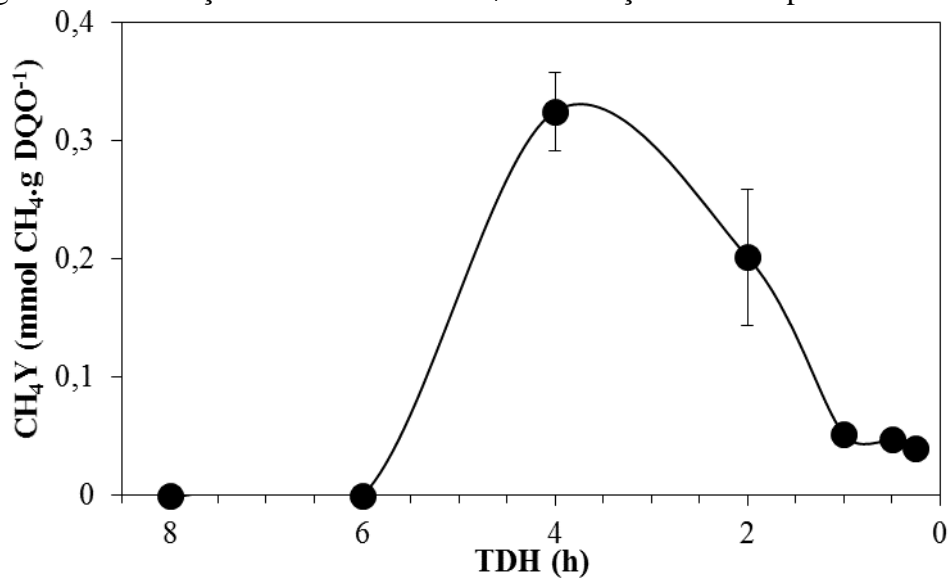


Tabela 5.6 – Valores médios e desvios de HY e CH₄Y em função do TDH e respectivas TCO nas diferentes concentrações

| TDH (h) | TCO (kgDQO.m ⁻³ .d ⁻¹) | | | CH ₄ Y (mmol CH ₄ . gDQO _{ap} ⁻¹) | HY (mmol H ₂ . gDQO _{ap} ⁻¹) | | |
|------------|---|------|------|---|--|---------------|---------------|
| | RM5 | RM15 | RM25 | RM5 | RM5 | RM15 | RM25 |
| 8 | 22 | 67 | 108 | 0 | 0,024 ± 0,012 | 0,043 ± 0,017 | 0,003 ± 0,002 |
| 6 | 29 | 89 | 144 | 0 | 0,024 ± 0,005 | 0,401 ± 0,138 | 0,011 ± 0,006 |
| 4 | 43 | 133 | 216 | 0,325 ± 0,033 | 0,038 ± 0,004 | 0,856 ± 0,106 | 0,638 ± 0,023 |
| 2 | 86 | 266 | 432 | 0,202 ± 0,058 | 0,035 ± 0,012 | 0,047 ± 0,024 | 0,375 ± 0,036 |
| 1 | 173 | 533 | 864 | 0,052 ± 0,008 | 0,042 ± 0,010 | 0 | 0,101 ± 0,026 |
| 0,5 | 346 | 1066 | 1728 | 0,047 ± 0,009 | 0,098 ± 0,010 | 0 | 0,112 ± 0,016 |
| 0,25 | 691 | - | - | 0,040 ± 0,009 | 0,163 ± 0,017 | - | - |

Observa-se no reator RM5 que com a diminuição dos valores de TDH de 8h para 0,25h, o rendimento de hidrogênio foi crescente, com valor máximo de $0,163 \pm 0,017$ mmol H₂.g DQO⁻¹ no TDH de 0,25h. O CH₄Y apresentou valor máximo de $0,202 \pm 0,058$ mmol CH₄.g DQO⁻¹ no TDH de 4h e com a aplicação de valores de TDH inferiores a 4h o rendimento de metano foi reduzido a $0,040 \pm 0,09$ mmol CH₄.g DQO⁻¹ no TDH de 0,25h. Nos reatores RM15 e RM25 a redução do TDH de 8h para 4h favoreceu o HY, observando valores máximos de $0,856 \pm 0,106$ mmol H₂.g DQO⁻¹ (RM15) e $0,638 \pm 0,023$ mmol H₂.g DQO⁻¹ (RM25).

O aumento da concentração de substrato favoreceu o HY, com a estratégia utilizada para o reator RM15 obtendo o maior valor de HY de $0,856 \pm 0,106$ mmol H₂.g DQO⁻¹ em comparação com RM5 e RM15. De forma similar, estudando a cinética de produção de hidrogênio usando soro de queijo Davila-Vazquez et al. (2008) observaram o valor máximo de rendimento de hidrogênio de $3,1$ mol H₂.mol lactose⁻¹ na concentração de 15 g lactose.L⁻¹, com aplicação de concentrações maiores reduzindo os valores de rendimento.

Com base nos resultados apresentados na tabela 5.5, observa-se que com o aumento da TCO aplicada, associada a diminuição do TDH, os valores de produção volumétrica de hidrogênio e de rendimento foram beneficiados até atingirem seus valores máximos de $0,151 \pm 0,013$ L H₂.h⁻¹.L⁻¹ e $0,163 \pm 0,017$ mmol H₂.g DQO⁻¹ na TCO de 691 kgDQO.m⁻³.d⁻¹ para RM5, $0,228 \pm 0,024$ L H₂.h⁻¹.L⁻¹ e $0,856 \pm 0,106$ mmol H₂.g DQO⁻¹ na TCO de 133 kg DQO.m⁻³.d⁻¹ para RM15 e $0,312 \pm 0,032$ L H₂.h⁻¹.L⁻¹ e $0,638 \pm 0,023$ mmol H₂.g DQO⁻¹ na TCO de 216 kg DQO.m⁻³.d⁻¹ para RM25. Kargi, Eren e Ozmihci (2012a) realizaram experimentos em batelada com soro de queijo nas concentrações de $5,2$ a $28,5$ g açúcares totais.L⁻¹ para avaliar a produção de hidrogênio. O aumento da concentração de substrato favoreceu a produção de hidrogênio. Observou-se que este aumento foi devido a limitações de substrato em baixas concentrações. Segundo Mohan, Babu e Sarma (2007), o aumento da taxa de carregamento

orgânico garante uma maior disponibilidade de substrato, acelerando a atividade do metabolismo. Entretanto, quando os valores de TCO foram superiores a 133kg DQO.m⁻³.d⁻¹ no RM15 e 216kg DQO.m⁻³.d⁻¹ no RM25, observa-se redução nos valores de rendimento de hidrogênio.

Na Tabela 5.7 os valores de rendimento e produtividade de hidrogênio observados neste estudos e em outros autores são apresentados para efeito comparativo na avaliação do efeito da TCO. Observa-se que os resultados obtidos estão de acordo com a literatura e que o decréscimo do rendimento de hidrogênio produzido está associado ao aumento da TCO alimentada ao reator. Avaliando a produção mesofílica de hidrogênio a partir de soro de queijo em reator de mistura, Venetsaneas *et al.* (2009) observaram valores máximos de rendimento (1,56mol H₂.mol lactose⁻¹) de produtividade de hidrogênio (120mL H₂.h⁻¹.L⁻¹) na TCO de 30kg DQO.m⁻³.dia⁻¹. Perna *et al.* (2013) utilizando um reator mesofílico de leito fixo no TDH de 24h obtiveram valor máximo de HY ao elevar a TCO 37kg DQO.m⁻³.dia⁻¹ mediante ao aumento da concentração de afluente de 22 para 37g DQO.L⁻¹. Utilizando reator de batelada sequencial (AnSBBR), Lima *et al.* (2016) observaram aumento da produtividade (45mL H₂.h⁻¹.L⁻¹) e no rendimento de hidrogênio (1,12mol H₂.mol lactose⁻¹) mediante ao aumento TCO aplicada associada ao aumento da concentração afluente de 4250mg DQO.L⁻¹ para 5400mg DQO.L⁻¹, equivalente a 4823mg carboidrato. L⁻¹.

Tabela 5.7 – Valores de HY, PVH, TDH e TCO ótimos observados em estudos com soro de queijo

| Referências | Reator | TDH _{ótimo} (h) | TCO _{ótima} (kg DQO.m ⁻³ .d ⁻¹) | PVH (mL H ₂ .h ⁻¹ .L ⁻¹) | HY (mol H ₂ .mol lactose ⁻¹) |
|-------------------------------------|------------|--------------------------|--|---|--|
| Venetsaneas <i>et al.</i> (2009) | CSTR | 24 | 30 | 120 | 1,56 |
| Perna <i>et al.</i> (2013) | Leito Fixo | 24 | 37 | 1000 | 1,1 |
| Rosa <i>et al.</i> (2014) | RALF | 4 | 30 | 23 | 1,33 |
| Lima <i>et al.</i> (2016) | AnSBBR | 3 | 18,5 | 45 | 1,12 |
| Este estudo | EGSB | 4 | 133 | 228 | 0,856 |

Deve-se observar que o aumento excessivo da TCO pode sobrecarregar o reator. Rosa *et al.* (2014) observaram a redução do rendimento de hidrogênio de 1,33mol H₂.mol lactose⁻¹ para 0,44mol H₂.mol lactose⁻¹ mediante ao aumento da TCO de 30kg DQO.m⁻³.dia⁻¹ para 120kg DQO.m⁻³.dia⁻¹ Segundo os autores, o aumento do rendimento de hidrogênio esta

relacionado a seleção da TCO dentro de uma faixa apropriada, cuja dificuldade de seleção esta associada a complexidade da comunidade microbiana e a dependência dos diferentes metabolismos nas condições ambientais aplicadas.

Por outro lado, no reator RM5 os valores de composição, rendimento e produtividade de metano foram máximos no valor de TCO de 43kg DQO.m⁻³.d⁻¹. Com o aumento da TCO aplicada, a produção de metano foi reprimida, obtendo os menores valores de produtividade, composição e rendimento. Resultado similar foi observado por Castelló *et al.* (2009) utilizando soro de leite não esterilizado para produção de hidrogênio em UASB, que obtiveram produtividade máxima de hidrogênio de 0,12 L H₂.h⁻¹.L⁻¹ na TCO de 20 kg DQO.m⁻³.d⁻¹.

É possível que os organismos metanogênicos persistiram nos grânulos e biofilmes que os garantiram proteção do valor baixo de pH, assim como indicado por Yang *et al.* (2007). Além disso, a TCO aplicada ao reator RM5 pode não ser suficiente para inibir os microrganismos metagônênicos no sistema operado. Castelló *et al.* (2009) utilizando reator UASB com soro de leite não esterilizado observaram composições de metano no biogás produzido de até 20% na TCO de 10kg DQO.m⁻³.d⁻¹. Com o aumento da TCO para 20 kg DQO.m⁻³.d⁻¹, o metano foi detectado em composições menores que 5% do biogás. Desta forma, a sinergia entre o tratamento térmico, o valor reduzido de pH de operação dos reatores, as concentrações afluentes mais elevadas e valores elevados de TCO favoreceram a produção de hidrogênio e a inibição da produção de metano.

A quantificação dos metabólitos líquidos produzidos no reator, como os ácidos orgânicos voláteis e alcoóis, é necessária devido a atuação destes metabólitos como reguladores de possíveis rotas no metabolismo da comunidade microbiana, compreendendo os produtores e consumidores de hidrogênio e os competidores por substrato. Além disso, parte destes metabólitos podem ter papel tóxico ou inibitório para as populações de microrganismos produtores de hidrogênio. As distribuições dos principais metabólitos observados em função do TDH são ilustradas nas Figuras 5.7, 5.8 e 5.9 para os reatores RM5, RM15 e RM25, respectivamente. Na Tabela 5.8 estão apresentadas as concentrações e distribuições dos principais metabólitos produzidos associados valores aos HY e PVH encontrados.

Os principais metabólitos encontrados no efluente do reator RM5 em todas as fases de operação foram os ácidos acético (HAc), butírico (HBu) e propiônico (HPr). Foram observadas ainda a presença de ácido láctico (HLA) e valérico, com porcentagens entre 1,3 e 10,4% e 1,9 e 4,6%, respectivamente. A partir da redução do TDH de 8h para 0,25h observa-se o aumento da produção de ácido acético de 14,1% para 51,8%, valor máximo observado no

TDH de 1h. A produção dos ácidos acético e butírico representou frações maiores que 60% dos metabólitos produzidos em todos os valores de TDH. A produção de HPr permaneceu constante entre 13,6% e 26,7%. Lactato foi observado apenas em valores de TDH inferiores a 1h, com valores entre 1,3% e 10,4%.

Figura 5.7 – Distribuição principais dos metabólitos observados nos efluentes do reator RM5 em função do TDH

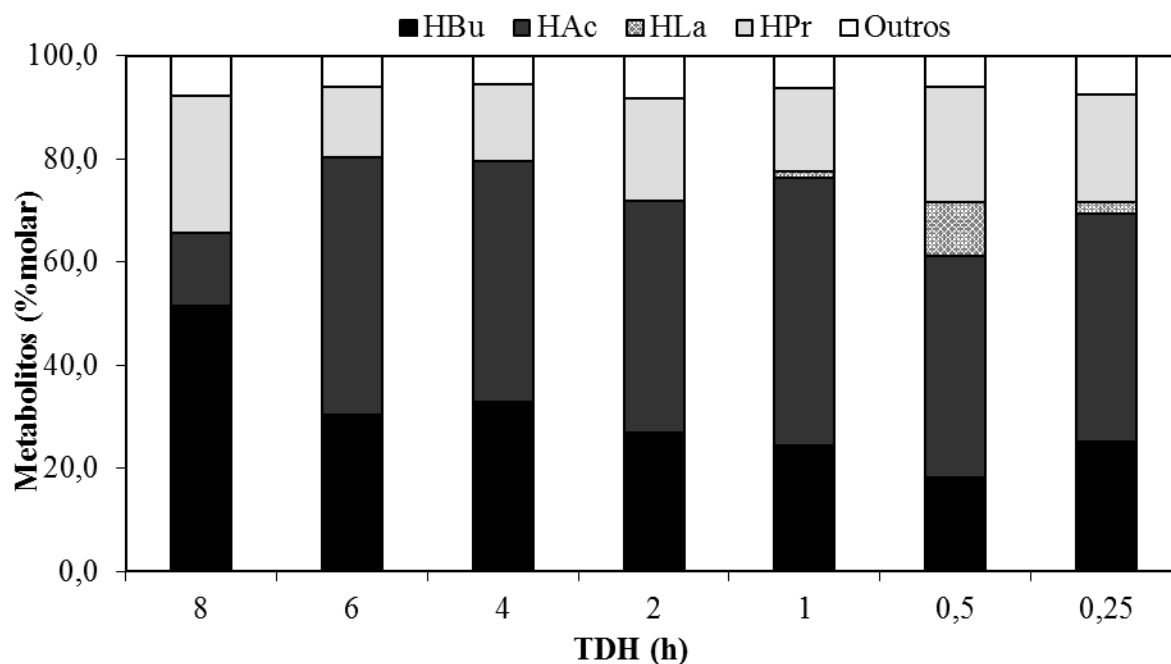
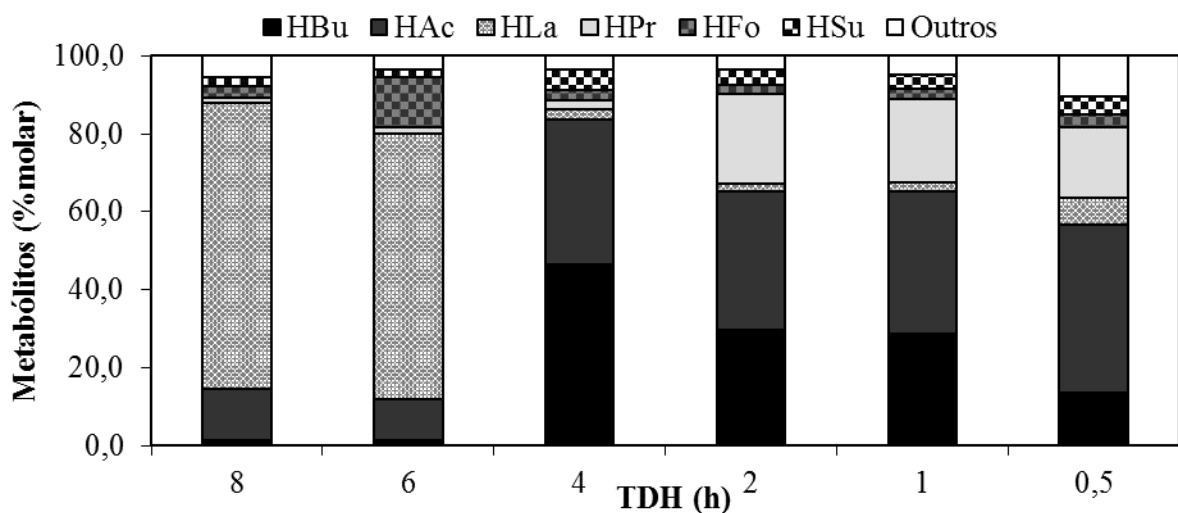


Figura 5.8 – Distribuição principais dos metabólitos observados nos efluentes do reator RM15 em função do TDH

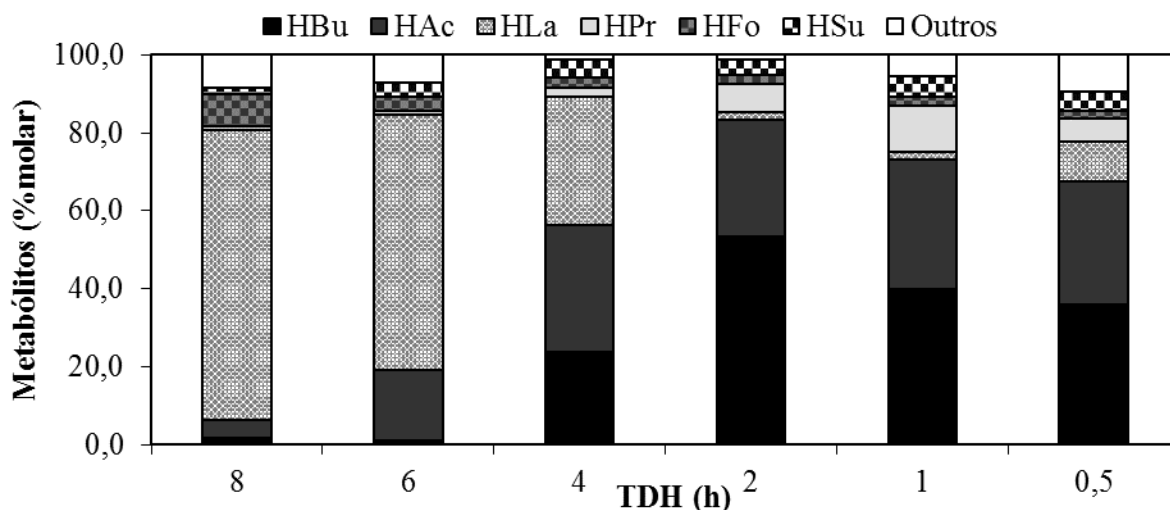


Os metabólitos observados no reator RM15 estão ilustrados na Figura 5.8. Os ácidos láctico, butírico e acético foram identificados em maiores frações molares. Outros metabólitos encontrados foram os ácidos propiônico, fórmico (HFo) e succínico (HSu). A redução dos

valores de TDH de 8h para 0,5h reprimiu a produção de HLa, reduzindo a sua fração molar de 73,6%, no TDH de 8g, para 1,8%, no TDH de 2h. A redução do TDH foi acompanhada da predominância dos ácidos acético (10,4% para 43,1%), butírico (1,5% para 46,3%) e propiônico (1,1% para 23,2%). As frações molares de HFo e HSu permaneceram constantes entre 2,1% a 12,7% e 2,5% a 5,3%, respectivamente.

No reator RM25 os principais metabólitos detectados foram os ácidos láctico, butírico e acético. Outros metabólitos também observados foram os ácidos propiônio, fórmico e succínico. Observa-se que com a redução do TDH de 8h para 0,5 a produção de HLa foi reprimida (74,3% para 1,8%) em favor da produção dos ácidos acético (4,7% para 33,1%), butírico (1,1% para 53,3%) e propiônico (0,9% a 11,9%). As produções de ácido fórmico e succínico permaneceram constantes entre 1,9% a 8,4% e 1,7% a 5,3%.

Figura 5.9 – Distribuição principais dos metabólitos observados nos efluentes do reator RM25 em função do TDH



A distribuição dos metabólitos em todos os reatores indica uma maior produção dos ácidos acético e butírico com a redução do TDH. Estes são os principais metabólitos relacionados com a alta produtividade de hidrogênio. A produção de hidrogênio através das rotas acética e butírica podem obter rendimentos máximos de 8,0mol H₂.mol lactose⁻¹ e 4,0mol H₂.mol lactose⁻¹, respectivamente, como mostrado nas equações 5.1 e 5.2 (Davila-Vasquez *et al.*, 2009).



Tabela 5.8 – Distribuição dos metabólitos, HY e PVH nos reatores RM5, RM15 e RM25

| RM5 | | | | | | | | | | |
|------------|-----------------------|------|-----------------------|------|-----------------------|------|-----------------------|------|---|---|
| TDH (h) | HBu | | HAc | | HPr | | HLA | | HY (mmol H ₂ . gDQO _{ap} ⁻¹) | PVH ₂ (L.h ⁻¹ .L ⁻¹) |
| | (mg.L ⁻¹) | (%) | (mg.L ⁻¹) | (%) | (mg.L ⁻¹) | (%) | (mg.L ⁻¹) | (%) | | |
| 8 | 1299 ± 106 | 51,5 | 243 ± 41 | 14,1 | 566 ± 139 | 26,7 | 0 | 0 | 0,024 ± 0,012 | 0,0012 ± 0,0005 |
| 6 | 1057 ± 96 | 30,4 | 1185 ± 151 | 49,9 | 398 ± 13 | 13,6 | 0 | 0 | 0,024 ± 0,005 | 0,0012 ± 0,0003 |
| 4 | 896 ± 104 | 32,9 | 864 ± 38 | 46,6 | 345 ± 17 | 15,1 | 0 | 0 | 0,038 ± 0,004 | 0,004 ± 0,001 |
| 2 | 1044 ± 64 | 27,0 | 1178 ± 96 | 44,7 | 653 ± 28 | 20,1 | 0 | 0 | 0,035 ± 0,012 | 0,006 ± 0,002 |
| 1 | 603 ± 112 | 24,4 | 872 ± 55 | 51,8 | 334 ± 13 | 16,1 | 33 ± 1 | 1,3 | 0,042 ± 0,010 | 0,014 ± 0,003 |
| 0,5 | 627 ± 17 | 18,2 | 1009 ± 132 | 43,0 | 648 ± 9 | 22,4 | 365 ± 52 | 10,4 | 0,098 ± 0,010 | 0,051 ± 0,007 |
| 0,25 | 512 ± 14 | 25,1 | 615 ± 9 | 44,2 | 359 ± 22 | 20,9 | 49 ± 10 | 2,3 | 0,163 ± 0,017 | 0,151 ± 0,013 |
| RM15 | | | | | | | | | | |
| TDH (h) | HBu | | HAc | | HPr | | HLA | | HY (mmol H ₂ . gDQO _{ap} ⁻¹) | PVH ₂ (L.h ⁻¹ .L ⁻¹) |
| | (mg.L ⁻¹) | (%) | (mg.L ⁻¹) | (%) | (mg.L ⁻¹) | (%) | (mg.L ⁻¹) | (%) | | |
| 8 | 123 ± 30 | 1,5 | 738 ± 32 | 12,9 | 81 ± 4 | 1,1 | 6314 ± 233 | 73,6 | 0,043 ± 0,017 | 0,007 ± 0,002 |
| 6 | 144 ± 27 | 1,5 | 694 ± 28 | 10,4 | 129 ± 38 | 1,6 | 6830 ± 146 | 68,3 | 0,401 ± 0,138 | 0,073 ± 0,027 |
| 4 | 3116 ± 169 | 46,3 | 1710 ± 312 | 37,3 | 126 ± 67 | 2,2 | 186 ± 78 | 2,7 | 0,856 ± 0,106 | 0,228 ± 0,024 |
| 2 | 2187 ± 90 | 29,7 | 1783 ± 60 | 35,6 | 1435 ± 73 | 23,2 | 133 ± 16 | 1,8 | 0,047 ± 0,024 | 0,020 ± 0,010 |
| 1 | 1730 ± 81 | 28,8 | 1494 ± 108 | 36,5 | 1079 ± 96 | 21,3 | 147 ± 53 | 2,4 | 0 | 0 |
| 0,5 | 512 ± 103 | 13,7 | 1100 ± 57 | 43,1 | 570 ± 64 | 18,1 | 261 ± 65 | 6,8 | 0 | 0 |
| RM25 | | | | | | | | | | |
| TDH (h) | HBu | | HAc | | HPr | | HLA | | HY (mmol H ₂ . gDQO _{ap} ⁻¹) | PVH ₂ (L.h ⁻¹ .L ⁻¹) |
| | (mg.L ⁻¹) | (%) | (mg.L ⁻¹) | (%) | (mg.L ⁻¹) | (%) | (mg.L ⁻¹) | (%) | | |
| 8 | 131 ± 29 | 1,5 | 283 ± 74 | 4,7 | 74 ± 1,5 | 1,0 | 6669 ± 339 | 74,3 | 0,003 ± 0,002 | 0,0007 ± 0,0005 |
| 6 | 113 ± 18 | 1,1 | 1213 ± 41 | 18,0 | 76 ± 5 | 0,9 | 6640 ± 310 | 65,6 | 0,011 ± 0,006 | 0,0028 ± 0,0013 |
| 4 | 2091 ± 35 | 23,7 | 1962 ± 29 | 32,6 | 183 ± 16 | 2,5 | 2968 ± 425 | 32,9 | 0,638 ± 0,023 | 0,312 ± 0,026 |
| 2 | 3863 ± 464 | 53,3 | 1486 ± 127 | 30,1 | 446 ± 110 | 7,3 | 134 ± 20 | 1,8 | 0,375 ± 0,036 | 0,312 ± 0,032 |
| 1 | 2458 ± 132 | 40,0 | 1384 ± 159 | 33,1 | 614 ± 94 | 11,9 | 134 ± 25 | 2,1 | 0,101 ± 0,026 | 0,173 ± 0,051 |
| 0,5 | 1976 ± 253 | 36,0 | 1179 ± 115 | 31,5 | 270 ± 30 | 5,8 | 582 ± 99 | 10,4 | 0,112 ± 0,016 | 0,302 ± 0,033 |

As condições experimentais que produziram maiores HY e PVH resultaram também em maiores concentrações de ácidos acético e butírico e menores concentrações de ácido láctico, como evidenciado pelo TDH de 0,25h no reator RM5, e no TDH de 4h nos reatores RM15 e RM25. De forma similar, Perna *et al.* (2013) observaram aumento de HY associado a elevada produção de butirato e redução da produção de lactato. Rosa *et al.* (2014) observaram elevação da produção de acetato e butirato com a redução do TDH de 4h para 1h.

A presença do ácido acético em concentrações elevadas nas fases com maior produção de hidrogênio indica que o aumento dos valores de TCO pode ter direcionado a produção de hidrogênio pela rota acética. Perfil similar de evolução de ácido acético e produção de hidrogênio foi observado por Guo *et al.* (2008). Neste estudo, com o aumento da TCO até 120 kg DQO.m⁻³.d⁻¹, a concentrações de ácido acético e etanol obtiveram seus valores máximos, representando 89% dos ácidos graxos voláteis produzidos. Nesta condição foi observado o valor máximo de produtividade de hidrogênio de 0,71 L H₂.h⁻¹.L⁻¹.

A elevada produção de ácido propiônico no reator RM15 nos valores de TDH inferiores a 2h é responsável pelo consumo do hidrogênio produzido e está relacionada a

sobrecarga de substrato devido a inibição por produtos nos valores de TCO mais elevados. Guo *et al.* (2008) observaram o aumento da concentração de ácido propiônico associada a sobrecarga do reator EGSB com o aumento da TCO até 192kg DQO.m⁻³.d⁻¹. Utilizando soro de queijo em reator de mistura Davila-Vasquez *et al.* (2009) observaram a prevalência de ácido propiônico na TCO de 184,4kg lactose.m⁻³.d⁻¹ sem a produção de hidrogênio, identificando a sobrecarga de substrato.

Apesar de operar em valores maiores de TCO, o reator RM25 manteve elevada produção de hidrogênio pela prevalência da rota butírica em condições de sobrecarga. Segundo Hallenbeck *et al.* (2009), o NADH produzido pela glicólise deve ser reoxidado para que o consumo de carboidrato possa continuar. Caso não existam condições de oxidação de NADH pela produção de hidrogênio pela rota acética, rotas metabólicas com produtos mais reduzidos são favorecidas, como a produção de ácido butírico. Além disso, a inoculação a concentrações mais elevadas de soro de queijo favoreceu a produção de hidrogênio no reator RM25. Entretanto, observa-se no TDH de 1h que com o aumento da concentração de HPr para 614mg.L⁻¹ o HY foi reduzido para 0,101mmolH₂.g DQO⁻¹. Avaliando a produção de hidrogênio a partir de lactose, Calli *et al.* (2008) observaram como principais motivos para os baixos rendimentos de hidrogênio o efeito repressor da elevada pressão parcial de hidrogênio resultando na mudança da rota metabólica de produção de acetato para produção de butirato e a inibição dos produtores de hidrogênio por bactérias produtoras de ácido lático.

Nos reatores RM15 e RM25 maiores concentrações de lactato foram observadas nos valores de TDH de 8h e 6h, cujos valores de HY e PVH foram os menores observados. Segundo Collet *et al.* (2003) a produção de lactato utiliza os elétrons provenientes do NADH necessários para a produção de hidrogênio, reduzindo o HY. Nokie *et al.* (2002) investigaram a influência da coexistência de bactérias produtoras de hidrogênio (*Clostridium acetobutylicum* ou *Clostridium butylicum*) e de bactérias produtoras de ácido lático (*Lactobacillus paracasei* e *Enterococcus durans*) utilizando resíduo de processamento de tofu. Observou-se que a rota fermentativa de produção de ácido lático foi preterida a produção de hidrogênio. Somente a produção de hidrogênio ou a produção de ácido lático foi observada, sugerindo que a produção de hidrogênio foi inibida por bactérias produtoras de ácido lático. A produção de bacteriocinas (antibióticos polipeptídicos) pelas bactérias lácticas durante a competição por substrato foi responsável pela inibição da produção de hidrogênio.

5.2 Efeito da Temperatura na Produção de Hidrogênio a partir de Soro de Queijo em RALF Termofílico

Os valores médios das conversões de açúcares totais (em lactose) e de matéria orgânica nas diferentes operações impostas ao RTS estão apresentados na Tabela 5.9.

Tabela 5.9 – Valores médios e desvios das conversões de açúcares totais e de matéria orgânica do reator RTS

| TDH (h) | T (°C) | Conversão de açúcares (%) | Conversão de matéria orgânica (%) |
|---------|--------|---------------------------|-----------------------------------|
| 8 | 55 | 66,1 ± 16,1 | 16,6 ± 5,0 |
| 6 | 55 | 58,6 ± 11,3 | 13,9 ± 4,1 |
| 4 | 55 | 64,1 ± 5,9 | 12,0 ± 7,4 |
| 2 | 55 | 51,8 ± 10,5 | 8,2 ± 4,1 |
| 1 | 55 | 36,5 ± 5,0 | 5,6 ± 5,5 |
| 0,5 | 55 | 23,2 ± 2,9 | 0,5 ± 5,1 |
| 4 | 65 | 52,1 ± 14,3 | 8,6 ± 3,7 |
| 4 | 75 | 47,8 ± 9,5 | 8,7 ± 3,9 |

Os valores de conversão de açúcares e de matéria orgânica observados durante as quatro primeiras fases de operação foram próximos entre 51,8 ± 10,5 % e 66,1 ± 16,1 %, para açúcares, e entre 8,2 ± 4,1 % e 16,6 ± 5,0 % para a conversão de matéria orgânica. Os valores máximos de conversão foram observados no TDH de 8h. Com a redução dos valores de TDH de 8h para 0,5h os valores de conversão de açúcares e de matéria orgânica diminuíram até os valores mínimos de 23,2 ± 2,9 %, para conversão de açúcares, e 0,5 ± 5,1 %, para conversão de matéria orgânica, ambos observados no TDH de 0,5h.

Resultados similares foram observados em outros estudos presentes na literatura. Utilizando reator um reator de mistura perfeita em condições termofílicas na produção de hidrogênio a partir de água residuária da produção de queijo, Azbar et al. (2009) avaliaram o efeito da variação do TDH de 3,5, 2 e 1 dia com concentração de matéria orgânica constante de 47 g DQO.L⁻¹. Com a redução do TDH de 3,5 dia para 1 dia, o valor máximo de conversão de matéria orgânica que era de 90%, foi reduzido para 47%. Utilizando RALF em condições mesofílicas, Rosa et al. (2014) avaliaram diferentes TDH (4, 2 e 1h) na produção de hidrogênio a partir de soro de queijo, com concentração matéria orgânica de 5000 mg DQO.L⁻¹. Com a redução do TDH, a conversão de lactose foi reduzida de 95% para 85%.

Quando avaliado o efeito da temperatura no TDH de 4h entre 55°C, 65°C e 75°C, observa-se que com o aumento da temperatura a conversão de açúcares foi reduzida, com

valor mínimo de $47,8 \pm 9,5\%$ observado na temperatura de 75°C . Entretanto, os valores de conversão de matéria orgânica observados nas diferentes temperaturas foram similares, mantendo-se entre $8,6 \pm 3,7\%$ e $12,0 \pm 7,4\%$.

Os valores do pH afluente e efluente, monitorados diariamente durante a realização deste experimento, são mostrados Tabela 5.10.

Tabela 5.10 – Valores médios e desvios do pH afluente e efluente nas diferentes condições de operação do RTS

| TDH (h) | T ($^{\circ}\text{C}$) | pH Afluente | pH Efluente |
|---------|--------------------------|-----------------|-----------------|
| 8 | 55 | $7,70 \pm 0,48$ | $4,00 \pm 0,12$ |
| 6 | 55 | $7,04 \pm 0,34$ | $4,01 \pm 0,13$ |
| 4 | 55 | $7,02 \pm 0,17$ | $4,03 \pm 0,08$ |
| 2 | 55 | $6,82 \pm 0,21$ | $4,05 \pm 0,22$ |
| 1 | 55 | $6,50 \pm 0,10$ | $4,18 \pm 0,20$ |
| 0,5 | 55 | $6,48 \pm 0,13$ | $4,22 \pm 0,13$ |
| 4 | 65 | $6,70 \pm 0,32$ | $4,21 \pm 0,18$ |
| 4 | 75 | $6,70 \pm 0,20$ | $3,96 \pm 0,15$ |

Observa-se que os valores de pH efluente mantiveram-se dentro da faixa estabelecida entre 3,9 e 4,3 para favorecer a produção de hidrogênio e inibir os microrganismos produtores de metano. Essa manutenção foi controlada pela adição de NaHCO_3 e solução de NaOH 6M no afluente em função do pH efluente observado. Estes resultados estão de acordo com Davila-Vazquez *et al.* (2008) que observaram os melhores valores de rendimento de hidrogênio foram obtidos no valor de pH inicial de 7,5.

Os valores médios de sólidos suspensos totais (SST), voláteis (SSV) e fixos (SSF) medidos ao longo das diferentes condições de operação do RTS são apresentados na Tabela 5.11. A maior parte dos sólidos suspensos contidos no efluente dos reatores foi representada por sólidos suspensos voláteis com porcentagens entre 95,4% e 98,9% ao longo da variação do TDH e da temperatura. O valor de SST permaneceu estável entre 931 e 1226 mg.L^{-1} perante a variação do TDH. O aumento da temperatura para 75°C reduziu a concentração de 1096 mg.L^{-1} para 511 mg.L^{-1} .

Tabela 5.11 – Valores médios de SST, SSV e SSF para RTS

| TDH (h) | T ($^{\circ}\text{C}$) | SST (mg.L^{-1}) | SSV (mg.L^{-1}) | SSF (mg.L^{-1}) | SSV (%) | SSF (%) |
|---------|--------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|---------|---------|
| 8 | 55 | 1056 | 1011 | 45 | 95,7 | 4,3 |
| 6 | 55 | 1226 | 1202 | 24 | 98,0 | 2,0 |
| 4 | 55 | 1149 | 1096 | 53 | 95,4 | 4,6 |
| 2 | 55 | 1140 | 1105 | 35 | 96,9 | 3,1 |
| 1 | 55 | 1198 | 1177 | 21 | 98,2 | 1,8 |
| 0,5 | 55 | 931 | 921 | 10 | 98,9 | 1,1 |
| 4 | 65 | 1038 | 1003 | 35 | 96,7 | 3,3 |
| 4 | 75 | 511 | 489 | 22 | 95,7 | 4,3 |

Durante a operação do reator RTS, a composição do biogás produzido foi analisada para avaliar a produção de hidrogênio e a produção indesejada de metano. As variações de composição do biogás produzido em função do TDH são ilustradas na Figura 5.10 e em função da temperatura na Figura 5.11.

Apenas hidrogênio e CO₂ foram observados no biogás e seus respectivos valores de composição de hidrogênio no biogás produzido mantiveram-se estáveis. O gás metano não foi formado durante a operação do sistema, mostrando a eficiência do tratamento térmico adotado no lodo. Com a redução dos valores de TDH de 8h para 0,5h a fração molar de hidrogênio permaneceu estável entre $47,62 \pm 2,1\%$ e $55,5 \pm 2,5\%$. O cujo valor máximo de $55,5 \pm 2,5\%$ foi obtido no TDH de 0,5h. De forma similar o aumento da temperatura não alterou a fração molar de hidrogênio presente no biogás produzido, com valor máximo de $52,0 \pm 2,6\%$ na temperatura de 65°C e valor mínimo de $47,6 \pm 2,1\%$ na temperatura de 75°C

Em comparação com a literatura, os valores de fração molar de hidrogênio obtido no biogás foram maiores que os valores observados em Rosa *et al.* (2014), que obteve o valor máximo de fração molar de H₂ de 30% operando um RALF em condições mesofílicas. No estudo de Azbar *et al.* (2009) operando um reator CSTR em condições termofílicas, os valores médios de porcentagem de H₂ presente no biogás produzido foram de 50% e de 55% em taxas de carregamento orgânico de 35 e 21 g DQO.L⁻¹.dia⁻¹, respectivamente.

Figura 5.10 – Variações dos valores conteúdo de H₂ em função do TDH para o RTS

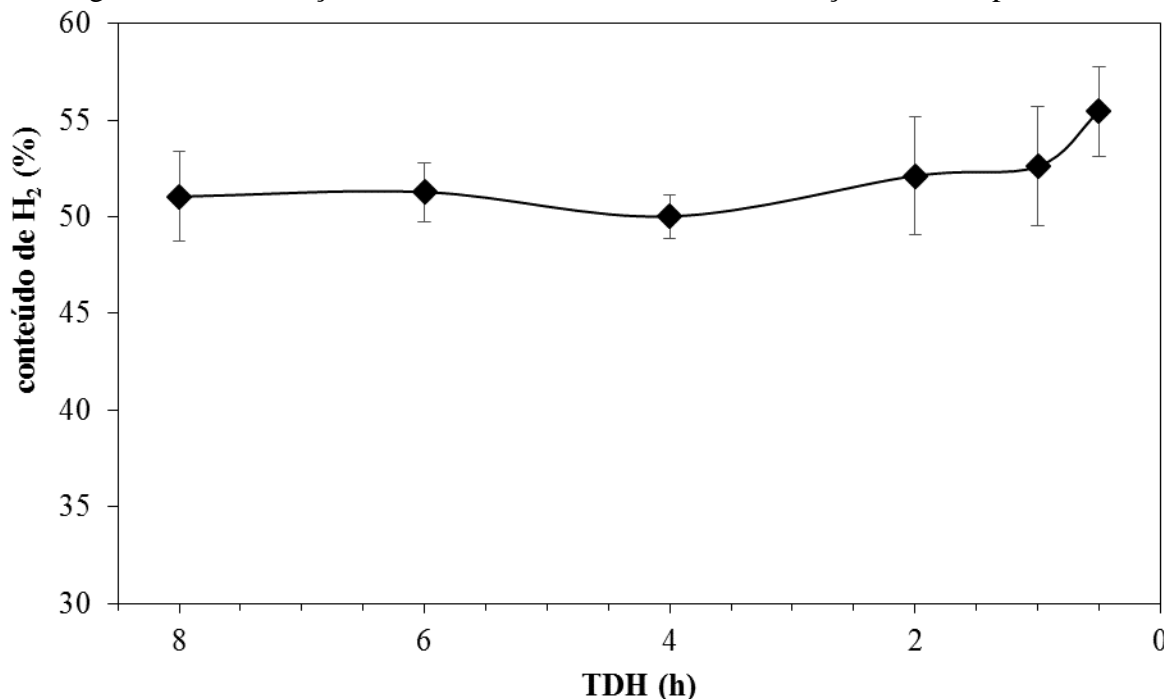
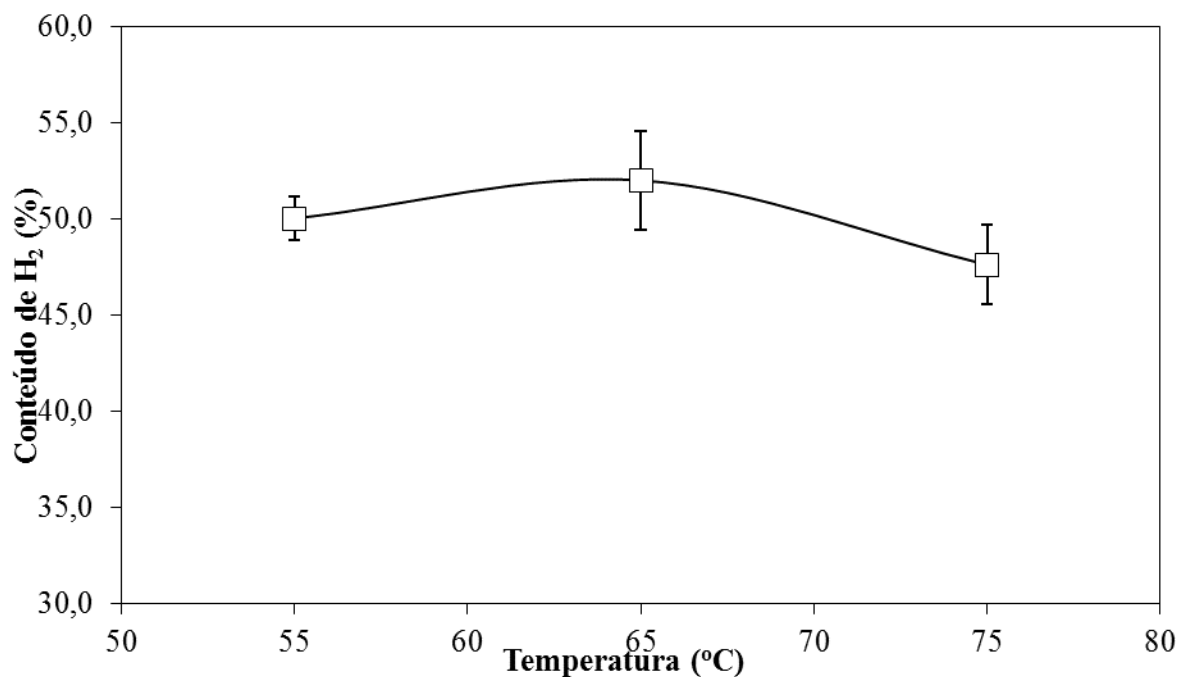


Figura 5.11 – Variações dos valores conteúdo de H₂ em função da temperatura para RTS



Na Figura 5.12 é ilustrado o comportamento da variação dos valores de PVH para o reator RALF termofílico sob efeito do TDH e na Figura 5.13, sob o efeito da temperatura.

Figura 5.12 – Variação dos valores de PVH em função do TDH para RTS

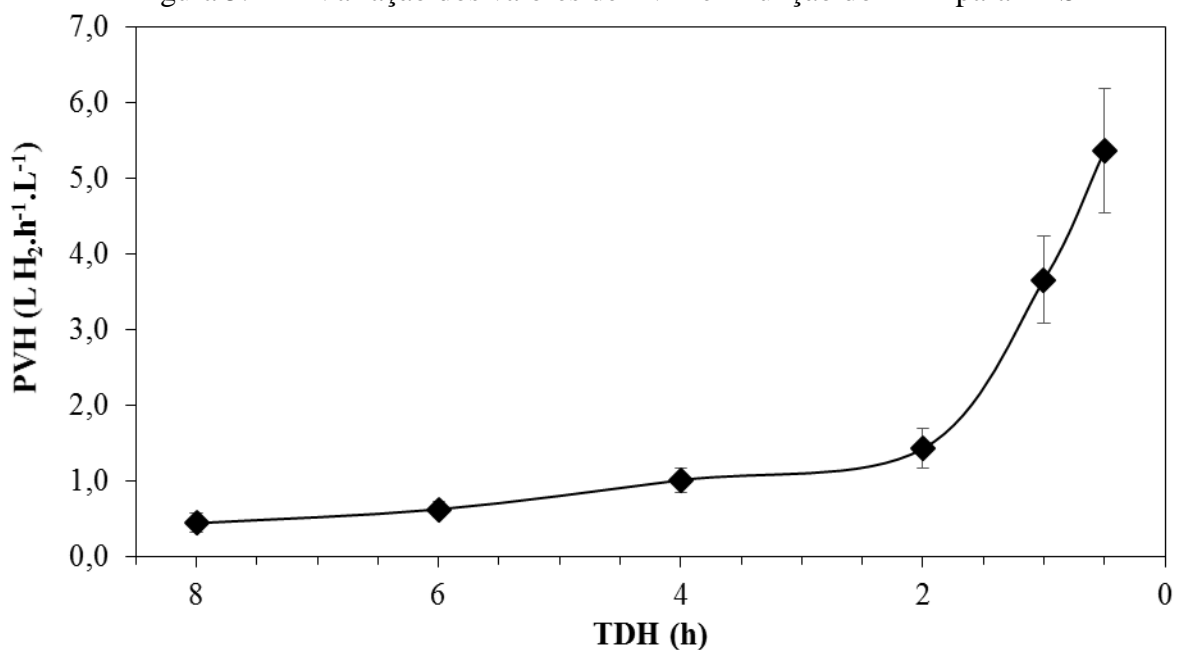
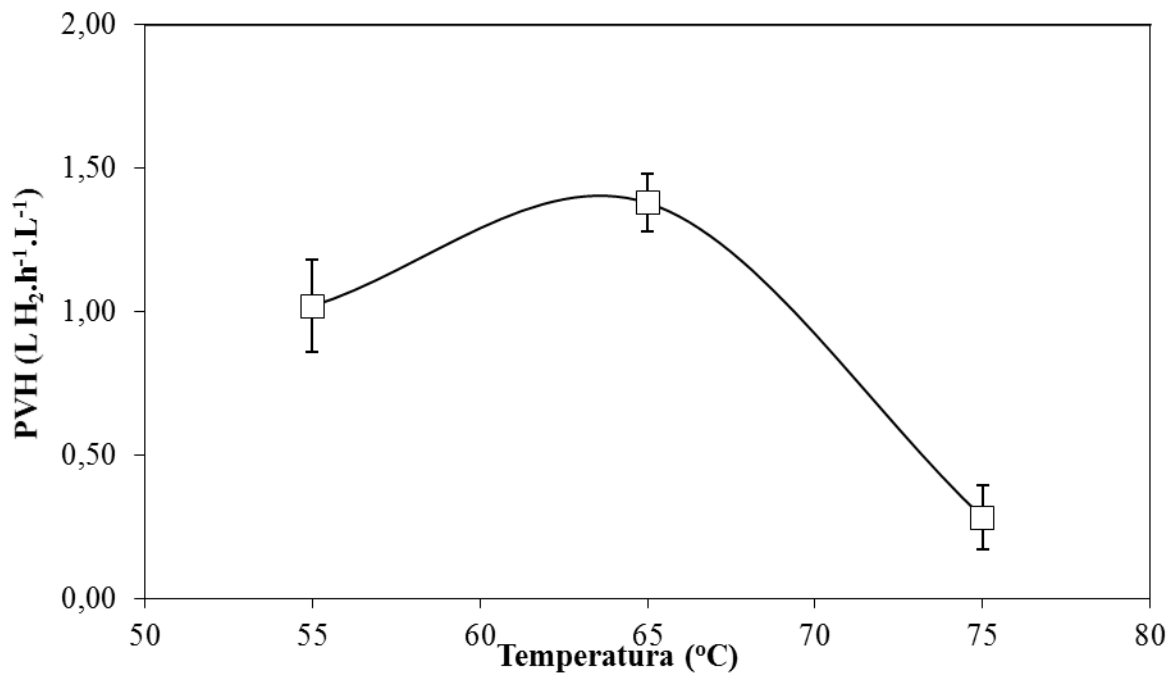


Figura 5.13 – Variação dos valores de PVH em função da temperatura para RTS



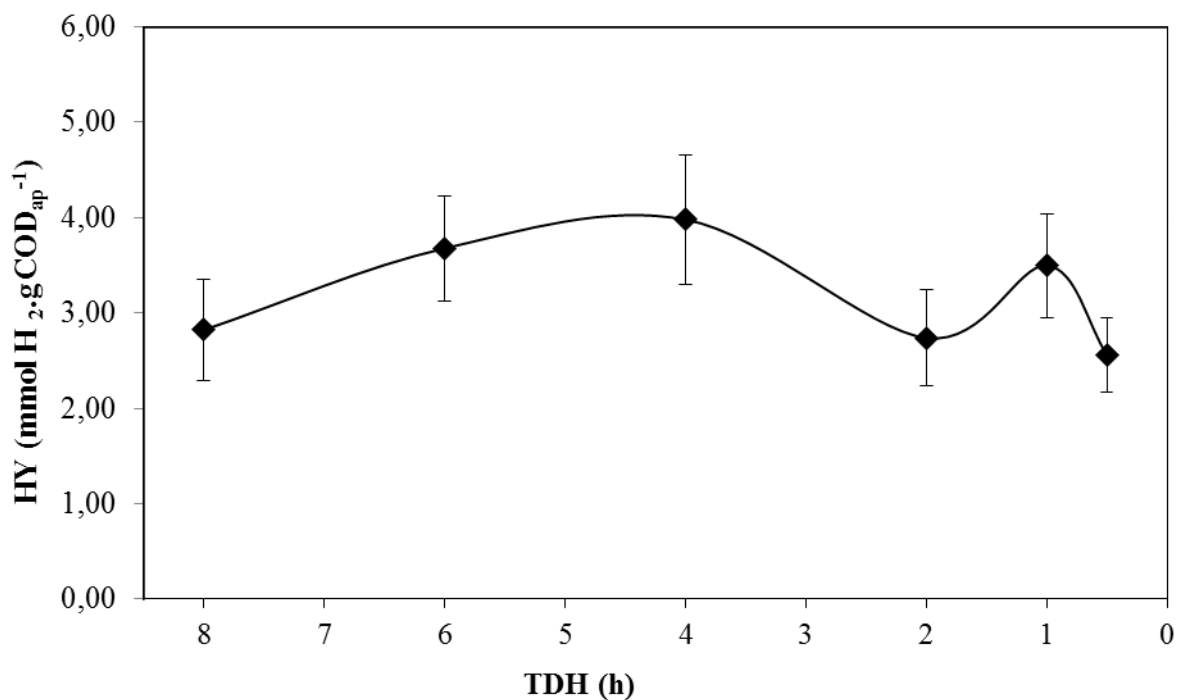
Observa-se entre os valores de PVH foram crescentes com a diminuição do TDH, com valor máximo de $5,36 \pm 0,81 \text{ L H}_2\text{.h}^{-1}\text{.L}^{-1}$ no TDH de 0,5 h. Collet *et al.* (2004) observaram aumento da produtividade de hidrogênio para o valor máximo de $63 \text{ mL H}_2\text{.L}^{-1}\text{.hr}^{-1}$ com a redução dos valores de TDH de 83,3h para 17,2h em reator de mistura termofílico para produção de hidrogênio a partir de lactose. Avaliando a produção termofílica de hidrogênio a partir água residuária de indústria de laticínios em reator de leito induzido, Zhong *et al.* (2015) observaram o aumento da PVH para $100 \text{ mL H}_2\text{.L}^{-1}\text{.hr}^{-1}$ ao reduzir o TDH de 5 dias para 3 dias. Operando reator de mistura em temperatura termofílica para produção de hidrogênio a partir de soro de queijo, Azbar *et al.* (2009) observaram produtividade máxima de hidrogênio de $330 \text{ mL H}_2\text{.L}^{-1}\text{.hr}^{-1}$.

Ao avaliar o efeito da temperatura, observa-se que as condições com temperaturas de 55 e 65°C obtiveram valores similares de $1,01 \pm 0,16 \text{ L H}_2\text{.h}^{-1}\text{.L}^{-1}$ e $1,38 \pm 0,10 \text{ L H}_2\text{.h}^{-1}\text{.L}^{-1}$. Entretanto, com o aumento da temperatura para 75°C, o valor de PVH foi reduzido para $0,28 \pm 0,11 \text{ L H}_2\text{.h}^{-1}\text{.L}^{-1}$, o menor observado neste estudo. Em comparação com a literatura, os resultados termofílicos de 55°C e 65°C foram maiores que os observados por Rosa *et al.* (2014) operando RALF mesofílico com soro de queijo que obteve valor máximo de PVH de $0,51 \text{ L H}_2\text{.h}^{-1}\text{.L}^{-1}$ no TDH de 1h. Avaliando o efeito da temperatura mesofílica (35°C) e termofílica (55°C) na produção de hidrogênio a partir de soro de queijo Kargi, Eren e Ozmihci (2012b) observaram que a fermentação termofílica obteve melhores produtividades de hidrogênio em comparação com a temperatura mesofílica. Ao operarem o reator de leito

induzido (IBR) nas temperaturas de 40°C e de 60°C, Zhong *et al.* (2015) observaram que o aumento da PVH para 110mL H₂.L⁻¹.hr⁻¹ ao aumentar a temperatura de 40°C para 60°C. Gadow *et al* (2013) avaliando o efeito da temperatura em três reatores CSTR em condições mesofílicas (37°C), termofílicas (55°C) e hipertermofílicas (80°C) no TDH de 10h com concentração de 10g celulose.L⁻¹, observaram produtividade máxima de 0,255L H₂.h⁻¹.L⁻¹ no reator operado em condições termofílicas.

As variações do rendimento durante a operação do RTS em função do TDH são ilustradas na Figura 5.14 e o efeito da temperatura é ilustrado na Figura 5.15. Observa-se que com a diminuição dos valores de TDH em temperatura de 55°C, o rendimento de hidrogênio atingiu um valor máximo de 4,10 ± 0,68 mmol.g DQO⁻¹ no TDH de 4h. A aplicação de valores menores de TDH ao RALF ocasionou na redução dos valores de HY observados, com valor mínimo de 2,58 ± 0,39 mmol.g DQO⁻¹ no TDH de 0,5h. A redução do TDH também mostrou-se depreciativa para produção de hidrogênio no estudo de Azbar *et al.* (2009) em reator de mistura termofílico para produção de hidrogênio a partir de soro de queijo. Ao diminuir o TDH de 3,5 para 1 dia os autores observaram queda de HY de 22mmol.g DQO⁻¹ para 5mmol.g DQO⁻¹.

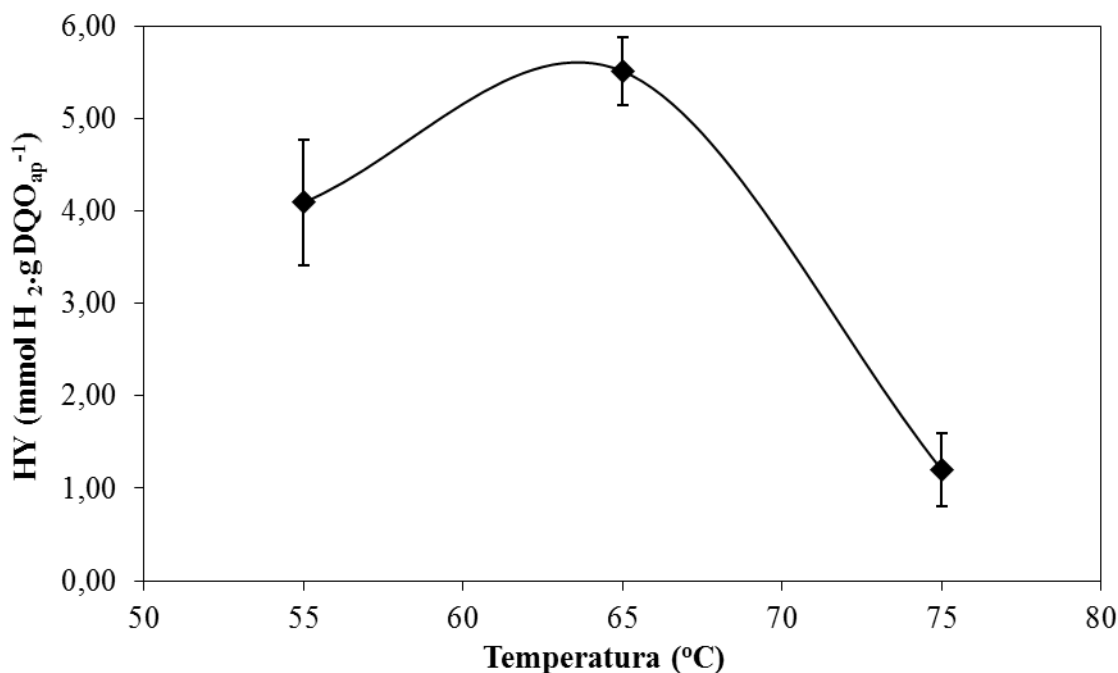
Figura 5.14 – Variação dos valores de HY em função do TDH para RTS



Quando observado o efeito da temperatura no TDH constante de 4h, o valor de rendimento de hidrogênio de 5,51 ± 0,37 mmol.g DQO⁻¹ na temperatura de 65°C foi superior

ao encontrado na temperatura de 55°C, sendo o maior valor encontrado neste estudo. Entretanto, com o aumento da temperatura para 75°C o HY observado foi reduzido para $1,20 \pm 0,39$ mmol.g DQO⁻¹.

Figura 5.15 – Variação dos valores de HY em função da temperatura para RTS



A redução do rendimento de hidrogênio de $5,51 \pm 0,37$ mmol.g DQO⁻¹ na temperatura de 65°C para $1,20 \pm 0,39$ mmol.g DQO⁻¹ em 75 °C está associada a desnaturação dos microorganismos produtores de hidrogênio dominantes na cultura termofílica utilizada neste estudo. Estudos na literatura sobre o efeito da temperatura indicam que quanto maior a complexidade do substrato, mais complexa será a adaptação da comunidade microbiana original as condições de temperatura mais elevada. Jiang *et al.* (2015) avaliaram o efeito da temperatura na estrutura e atividade da comunidade microbiana em testes em batelada entre as temperaturas de 25 e 85°C. O inóculo, originalmente termofílico (55°C) converteu a glicose e celulose entre as temperatura de 35 a 65°C, com atividade máxima em 55°C. Entretanto, a performance do meio foi afetada negativamente com o aumento da temperatura além dos 55°C, inibindo completamente o sistema em 70°C.

Zhang, Ren e Wang (2015) avaliaram o efeito da temperatura na produção fermentativa de hidrogênio de palha de milho hidrolisada nas condições mesofílicas (30 e 37°C), termofílicas (55°C) e termofílicas extremas (70°C) utilizando lodo ativado e lodo anaeróbio granular sem pré-tratamento. Os rendimentos máximos de hidrogênio foram obtidos na temperatura de 55°C para o lodo ativado ($6,08$ mmol H₂.g açúcar consumido⁻¹) e

para lodo anaeróbio (7,74 mmol H₂.g açúcar consumido⁻¹). Em ambos os inóculos utilizados a eficiência da temperatura de fermentação seguiu a ordem de 55°C > 70°C > 37°C ~ 30°C. Foi observado que com o aumento da temperatura, maior foi o tempo de fase de adaptação para ambos os inóculos, indicando que os microorganismos tem maior dificuldade de adaptação aos componentes complexos do hidrolisado em temperaturas maiores. As comunidades microbianas apresentaram menor diversidade com o aumento da temperatura, caracterizando o cultivo seletivo de algumas espécies. As performances superiores das condições termofílicas podem ser atribuídas ao cultivo seletivo de produtores de hidrogênio termofílicos mais eficientes capazes de produzir mais hidrogênio usando substratos complexos. A performance insatisfatória da produção de hidrogênio em condições termofílicas extremas é resultado da não formação de uma comunidade termofílica extrema de eficiente devido a sua baixa eficiência de consumo de substratos complexos e por serem afetados negativamente pelos subprodutos associados ao hidrolisado de palha de milho.

Na Tabela 5.12 encontra-se um resumo dos valores médios fração molar de H₂ presentes no biogás produzido, PVH e HY em função das diferentes condições operacionais de TDH, temperatura e as respectivas taxas de carregamento orgânico aplicadas (TCO). Com base nestes resultados, pode-se observa-se que com o aumento da TCO que foi associada a diminuição do TDH, os valores de produção volumétrica de hidrogênio e de composição de hidrogênio no biogás formado foram beneficiados. No caso dos valores de rendimento de hidrogênio, a condição ótima de TCO de 78,1 kg DQO.m⁻³.d⁻¹ favoreceu o HY.

Tabela 5.12 – Valores médios e desvios dos principais resultados obtidos na operação do RTS

| T (°C) | HRT (h) | TCO (kg DQO.m ⁻³ .d ⁻¹) | H ₂ (%) | PVH (L.h ⁻¹ .L ⁻¹) | HY (mmol.g DQO ⁻¹) | HY (mol H ₂ .mol lactose ⁻¹) |
|-----------|------------|---|-----------------------|--|-----------------------------------|--|
| 55 | 8 | 39 | 51,1 ± 2,3 | 0,45 ± 0,13 | 2,89 ± 0,53 | 3,06 ± 0,34 |
| 55 | 6 | 52,1 | 51,3 ± 1,5 | 0,63 ± 0,09 | 3,39 ± 0,44 | 3,51 ± 0,44 |
| 55 | 4 | 78,1 | 50,0 ± 1,1 | 1,01 ± 0,16 | 4,10 ± 0,68 | 3,77 ± 0,48 |
| 55 | 2 | 156,2 | 52,1 ± 3,1 | 1,43 ± 0,26 | 2,77 ± 0,51 | 3,55 ± 0,32 |
| 55 | 1 | 312,4 | 52,6 ± 3,1 | 3,66 ± 0,57 | 3,45 ± 0,55 | 3,50 ± 0,36 |
| 55 | 0,5 | 624,8 | 55,5 ± 2,3 | 5,36 ± 0,81 | 2,58 ± 0,39 | 3,46 ± 0,29 |
| 65 | 4 | 78,1 | 52,0 ± 2,6 | 1,38 ± 0,10 | 5,51 ± 0,37 | 4,67 ± 0,37 |
| 75 | 4 | 78,1 | 47,6 ± 2,1 | 0,28 ± 0,11 | 1,20 ± 0,39 | 1,04 ± 0,12 |

Os estudos da literatura avaliando o efeito da TCO observam que a aplicação de elevados valores de TCO inibiram a produção de hidrogênio, reduzindo o HY observado. Azbar *et al.* (2009) utilizando soro de queijo como substrato em reator de mistura termofílico verificaram que com o aumento da TCO de 21 para 47kg DQO.m⁻³.d⁻¹, pela redução do TDH de 3,5 dias para 1 dia, o HY foi reduzido de 22mmol H₂.gDQO⁻¹ para 5mmol H₂.gDQO⁻¹. Por

outro lado, a redução da TCO de 47 para 35kg DQO.m⁻³.d⁻¹, pela redução dos valores de concentração de 47g DQO.L⁻¹ para 35g DQO.L⁻¹, elevou o HY de 35mmol H₂.gDQO⁻¹ para 9mmol H₂.gDQO⁻¹.

Na tabela 5.13 os valores de rendimento e produtividade observados neste estudo e em outros autores são apresentados para efeito comparativo na avaliação do efeito do TDH. A Tabela 5.14 é uma comparação entre os rendimentos apresentados neste estudo e nos estudos de diferentes autores avaliando o efeito da temperatura.

Tabela 5.13 – Valores de HY, TDH e TCO observados em estudos com soro de queijo

| Referência | TDH _{ótimo} (h) | TCO _{ótima} (kg.m ⁻³ .d ⁻¹) | HY (mmol.g DQO ⁻¹) | HY (mol H ₂ .mol lac ⁻¹) |
|-----------------------------|-----------------------------|--|-----------------------------------|--|
| Collet <i>et al.</i> (2004) | 35,7 | 6,7 | - | 3 |
| Azbar <i>et al.</i> (2009) | 84 | 21 | 22 | 2,4 |
| Rosa <i>et al.</i> (2014) | 4 | 30 | - | 1,33 |
| Zhong <i>et al.</i> (2015) | 72 | 32,9 | 5,58 | - |
| Este estudo | 4 | 78,1 | 5,51 | 4,67 |

Os valores de rendimento de hidrogênio obtidos neste estudo nas temperaturas termofílicas de 55°C (4,10 ± 0,68 mmol.g DQO⁻¹) e 65°C (5,51 ± 0,37 mmol.g DQO⁻¹) são equivalentes a 3,77 ± 0,48mol H₂.mol lactose⁻¹ e a 4,67 ± 0,37 mol H₂.mol lactose⁻¹. Em comparação com a literatura estes resultados foram maiores que os resultados apresentados por Rosa *et al.* (2014). Foi utilizado soro de queijo alimentado a RALF mesofílico para produção de hidrogênio, com HY máximo de 1,33 mol H₂.mol lactose⁻¹ no TDH de 4h. Vale destacar que no TDH de 1h foi observado a produção de metano. Dessa forma, pode-se concluir que a produção termofílica de hidrogênio apresenta vantagens de PVH e HY em comparação com condições mesofílicas e possibilita maior repressão de metanogênicos. Observações similares foram feitas por Kargi, Eren e Ozmihci (2012b) que realizaram experimentos em batelada utilizando soro de queijo (10,77 g açúcares totais.L⁻¹) cultivados nas temperaturas de 35 °C e 55 °C. Entre os resultados principais, observou-se que a fermentação termofílica obteve melhor rendimento de hidrogênio de 0,81mol H₂. mol glicose⁻¹ em comparação com a temperatura mesofílica (0,47 mol H₂. mol glicose⁻¹).

Collet *et al.* (2004) utilizando reator de mistura, avaliaram o efeito do TDH entre 77h a 5,25h na produção termofílica de hidrogênio a partir de lactose em concentração de 10g.L⁻¹. Com a redução do TDH de 77h a 35,7h os valores de rendimento de hidrogênio foram elevados de 2,3mol H₂.mol lactose⁻¹ para 3,0 mol H₂.mol lactose⁻¹. Valores menores de TDH

reduziram o rendimento de hidrogênio pelo aumento de matéria orgânica disponível para o consumo microbiano, possibilitando o maior acúmulo de ácidos voláteis que são inibitórios. Efeito similar foi identificado Azbar et al. (2009), com rendimento máximo de 22mmol H₂.g DQO⁻¹ em TCO de 21kg DQO.m⁻³.d⁻¹ e em Zhong et al. (2015) que na TCO de 32,9kg DQO.m⁻³.d⁻¹ obteve com rendimento máximo de 5,58mmol H₂.g DQO⁻¹, resultado similar ao valor de de 5,51mmol H₂.g DQO⁻¹ obtido no RTS em temperatura de 65°C e TCO de 78,1 kg DQO.m⁻³.d⁻¹.

Tabela 5.14 – Comparação de valores de HY relatados em estudos avaliando o efeito da temperatura

| Referências | Reator | Substrato | T _{ótima} (°C) | HY (mol H ₂ .mol hexose ⁻¹) | HY (mmol H ₂ .g DQO ⁻¹) |
|----------------------------|--------|---|----------------------------|---|---|
| Obazu, Ngoma e Gray (2012) | RALF | Sacarose (17,8 g .L ⁻¹) | 70 | 3,55 | - |
| Jiang <i>et al.</i> (2015) | CSTR | Celulose (10 g.L ⁻¹) | 55 | 2,77 | - |
| Zhong <i>et al.</i> (2015) | IBR | Água residuária de indústria de laticínio (98,7g DQO.L ⁻¹) | 60 | - | 5,58 |
| Este estudo | RALF | Soro de queijo (10 g lac.L ⁻¹) | 65 | 2,33 | 5,51 |

Ao avaliar o efeito da temperatura dentro da faixa termofílica dos diferentes estudos apresentados na Tabela 5.14 deve-se observar a origem do inóculo e a complexidade dos substratos. Em busca de condições operacionais que possibilitassem elevadas produtividades e rendimentos de forma simultânea, Obazu, Ngoma e Gray (2012) estudaram a influência combinada de fatores que restringem a transferência de massa do hidrogênio, como a temperatura, que foi estudada nos valores de 45 a 70°C. . A melhor condição de operação observada com simultaneamente elevados valores de produtividade (231,3 mmol H₂.L⁻¹.h⁻¹) e de rendimento de hidrogênio (3,55 mol H₂. mol glicose⁻¹) foi obtida aumentando a temperatura para 70°C. A sacarose é um substrato simples e fácil conversão pela comunidade microbiana. Desta forma, a comunidade microbiana tem maior facilidade em adaptar-se a este substrato em condição hipertermofílica.

Ao avaliarem a produção de hidrogênio usando uma microflora mista originária de lodo de digestor de esgoto municipal na conversão de 10g celulose.L⁻¹ entre as temperaturas de 25 e 85°C Jiang *et al.* (2015) observaram que o inóculo, originalmente termofílico (55°C) converteu a glicose e celulose entre as temperatura de 35 a 65°C, com atividade máxima em

55°C. Entretanto, a performance do meio foi afetada negativamente com o aumento da temperatura além dos 55°C, inibindo completamente o sistema em 70°C.

Ao avaliarem o efeito da temperatura na produção de hidrogênio a partir de água residuária de laticínios em reator de leito induzido, Zhong *et al.* (2015) observaram rendimento máximo de hidrogênio de 5,58mmol H₂.g DQO⁻¹ obtido na temperatura de 60°C, mesmo com elevada concentração afluyente de 98,7g DQO.L⁻¹. Este resultado foi similar condição de temperatura ótima de 65 °C para produção de hidrogênio no reator RTS, com rendimento máximo de 5,58mmol H₂.g DQO⁻¹.

Assim, pode-se concluir que quanto maior a complexidade do substrato, menor será a temperatura ótima para produção de hidrogênio devido a dificuldade de adaptação de um inóculo originalmente termofílico para condições hipertermofílicas. Portanto, a temperatura ótima para produção de hidrogênio a partir de soro de queijo foi a temperatura de 65°C, selecionando a melhor comunidade produtora de hidrogênio.

A quantificação dos metabólitos líquidos produzidos no RTS, como os ácidos orgânicos voláteis e alcoóis, é necessária devido a atuação destes metabólitos como reguladores de possíveis rotas no metabolismo da comunidade microbiana, compreendendo os produtores e consumidores de hidrogênio e os competidores por substrato. Além disso, parte destes metabólitos podem ter papel tóxico ou inibitório para as populações de microorganismos produtores de hidrogênio. Na Figura 5.16 é ilustrada a distribuição dos principais metabólitos observados no efluente do reator nas diferentes condições de operação. Na tabela 5.15 são apresentados os valores de concentração média e fração molar de cada componente.

Figura 5.16 – Distribuição principais dos metabólitos observados nos efluentes do RTS

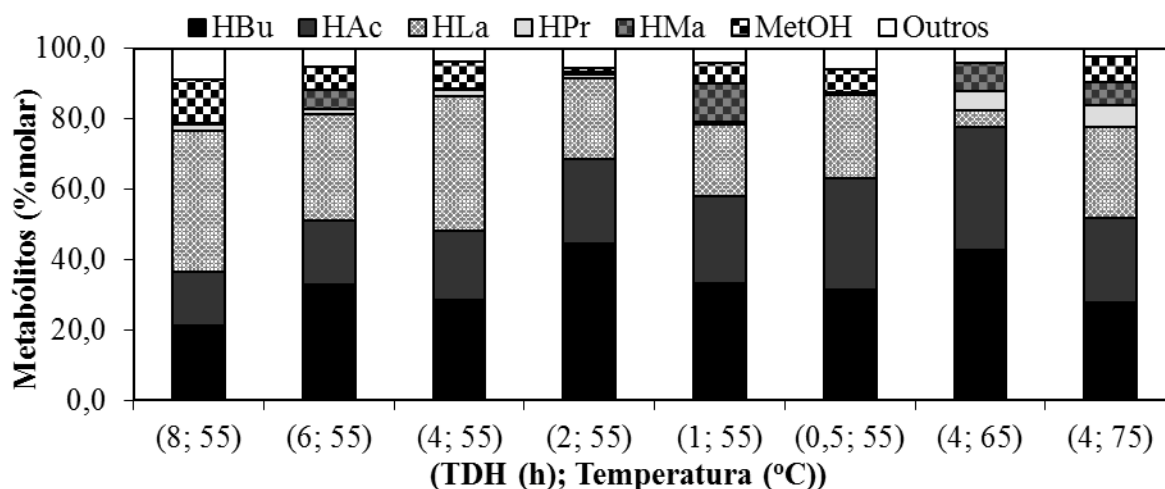


Tabela 5.15 – Principais metabólitos obtidos nas diferentes condições operacionais de operação do RTS

| TDH (h) | T (°C) | HBu | | HAc | | HPr | | HLa | | Met | | PVH (L.h ⁻¹ .L ⁻¹) | HY (mmol.g DQO ⁻¹) |
|------------|-----------|-----------------------|----|-----------------------|----|-----------------------|-----|-----------------------|-----|-----------------------|------|--|-----------------------------------|
| | | (mg.L ⁻¹) | % | (mg.L ⁻¹) | % | (mg.L ⁻¹) | % | (mg.L ⁻¹) | % | (mg.L ⁻¹) | % | | |
| 8 | 55 | 1163 ± 110 | 37 | 577 ± 20 | 16 | 86 ± 13 | 1,9 | 2039 ± 116 | 36 | 284 ± 10 | 14,6 | 0,45 ± 0,13 | 2,89 ± 0,53 |
| 6 | 55 | 1684 ± 69 | 32 | 741 ± 84 | 19 | 80 ± 4 | 1,7 | 1846 ± 139 | 32 | 142 ± 20 | 6,8 | 0,63 ± 0,09 | 3,39 ± 0,44 |
| 4 | 55 | 1077 ± 189 | 35 | 499 ± 119 | 19 | 67 ± 10 | 2 | 1399 ± 166 | 32 | 199 ± 10 | 13,9 | 1,01 ± 0,16 | 4,10 ± 0,68 |
| 2 | 55 | 1335 ± 88 | 24 | 558 ± 78 | 26 | 28 ± 6 | 1,1 | 754 ± 82 | 24 | 0 | 0 | 1,43 ± 0,26 | 2,77 ± 0,51 |
| 1 | 55 | 1130 ± 33 | 20 | 574 ± 36 | 25 | 19 ± 3 | 0,7 | 703 ± 137 | 20 | 75 ± 19 | 6,1 | 3,66 ± 0,57 | 3,45 ± 0,55 |
| 0,5 | 55 | 729 ± 31 | 24 | 526 ± 10 | 33 | 0 | 0 | 582 ± 8 | 24 | 56 ± 10 | 6,5 | 5,36 ± 0,81 | 2,58 ± 0,39 |
| 4 | 65 | 1344 ± 71 | 40 | 844 ± 103 | 37 | 169 ± 10 | 6 | 162 ± 30 | 4,7 | 0 | 0 | 1,38 ± 0,10 | 5,51 ± 0,37 |
| 4 | 75 | 1080 ± 32 | 25 | 730 ± 83 | 25 | 239 ± 30 | 6,6 | 1116 ± 161 | 26 | 126 ± 25 | 8,1 | 0,28 ± 0,11 | 1,20 ± 0,39 |

Os principais metabólitos encontrados no efluente do reator em todas as fases de operação foram os ácidos butírico, láctico e acético, com porcentagens entre 21,6 e 43,0%; 4,7 e 37,1% e 15,8 e 36,9%, respectivamente. Foram observadas ainda a presença de ácido propiônico, iso-butírico e málico, com porcentagens entre 0,7 e 6,6%; 0,8 e 2,6% e 0,4 e 8,1%, respectivamente. Azbar et al. (2009) observaram valor máximo de produtividade de 6 L H₂.h⁻¹.L⁻¹, com conseqüente aumento na concentração de ácido acético por meio da redução do valor de TDH, assim como observado neste estudo. No RTS, a maior concentração de ácido acético, de 844 mg.L⁻¹, ocorreu com a aplicação da maior taxa de carregamento aplicada, de 624,8 kg DQO.m⁻³.d⁻¹, sendo observado o valor máximo de produtividade de hidrogênio (5,36 L H₂.h⁻¹.L⁻¹).

Além dos ácidos, foi produzido metanol com porcentagem molar entre 6,1 e 14,6%. Segundo Schink e Zeikus (1980), bactérias *Clostridium sp.* que produzem hidrogênio podem produzir metanol como principal metabólito. Resultado similar foi encontrado por Rosa *et al.* (2014) operando RALF mesofílico para produção de hidrogênio a partir de soro de leite. O rendimento máximo de metanol de 1,44mol.mol lactose⁻¹ foi observado no TDH de 4h, mesma condição de rendimento máximo de hidrogênio de 1,33mol.mol lactose⁻¹.

Segundo Collet *et. al* (2006), o piruvato produzido a partir da glicólise da lactose pode convertido em acetilcoenzima A ou lactato. A acetilcoenzima A pode originar acetato, produzindo 2 ATP ou butirato, que consomem o NADH produzido nas reações glicolíticas para que a glicólise possa continuar. A descarboxilação do piruvato reduz a ferredoxina, que possibilita a produção de hidrogênio com a enzima hidrogenase. Assim, apenas a produção de acetato e butirato possibilitam a produção de hidrogênio, enquanto que a produção de lactato compete por substrato. Assim, com o aumento da temperatura de 55°C para 65°C observa-se que a redução da fração molar de lactato de 32% para 4,7% favoreceu a produção de

hidrogênio pelas rotas acéticas e butíricas. Nesta condição, o HY máximo de 5,51mmol H₂.g DQO⁻¹ foi observado com valores máximos de fração molar de acetato (37%) e butirato (40%).

A produção de ácido propiônico é associada ao consumo de hidrogênio devido a elevadas pressões parciais de hidrogênio no biogás. A produção máxima de ácido propiônico de 230mg.L⁻¹ (6,6%) foi observada na temperatura de 75°C, condição associada ao menor HY de 1,20mmol H₂.g DQO⁻¹. Resultado similar foi obtido por Zhang, Ren e Wang (2015) avaliaram a produção fermentativa de hidrogênio de palha de milho hidrolisada nas condições termofílicas (55°C) e termofílicas extremas (70°C) utilizando lodo ativado e lodo anaeróbio granular sem pré-tratamento. Em ambos os inóculos utilizados a eficiência da temperatura de fermentação foi maior para 55°C que em 70°C. Foi observado que com o aumento da temperatura, maior foi o tempo de fase de adaptação para ambos os inóculos, indicando que os microorganismos tem maior dificuldade de adaptação aos componentes complexos do hidrolisado em temperaturas maiores. As fermentações a 55°C corresponderam as maiores concentrações de acetato e butirato, com produção mínima de etanol, indicando a utilização mais eficiente de NADH para produção de hidrogênio. Em 70 °C, grandes quantidades de NADH foram utilizadas para metabólitos não relacionados a produção de hidrogênio ou intermediários, como propionato e ácido fórmico. As comunidades microbianas apresentaram menor diversidade com o aumento da temperatura, caracterizando o cultivo seletivo de algumas espécies. As performances superiores das condições termofílicas podem ser atribuídas ao cultivo seletivo de produtores de hidrogênio termofílicos mais eficientes capazes de produzir mais hidrogênio usando substratos complexos. A performance insatisfatória da produção de hidrogênio em condições termofílicas extremas é resultado da não formação de uma comunidade termofílica extrema de eficiente devido a sua baixa eficiência de consumo de substratos complexos e por serem afetados negativamente pelos subprodutos associados ao hidrolisado de palha de milho.

5.3 Efeito da Temperatura na Produção de Hidrogênio a partir de Vinhaça de Cana de Açúcar em RALF Termofílico

Na Tabela 5.16 estão representados os valores médios obtidos das conversões de açúcares totais (em glicose) e de matéria orgânica nas diferentes condições de operação impostas ao RTV. Os valores de conversão de açúcares e de matéria orgânica observados durante a redução do TDH de 8h para 1h foram próximos entre $54,5 \pm 4,4$ % e $69,3 \pm 6,0$ %, para conversão de açúcares, e entre $13,0 \pm 7,2$ % e $17,4 \pm 7,5$ % para a conversão de matéria orgânica, atingindo valores máximos de conversão no TDH de 8h. Com a redução do valor de TDH para 0,5h os valores de conversão de açúcares e de matéria orgânica diminuíram até os valores mínimos de $27,9 \pm 7,2$ %, para conversão de açúcares, e $1,4 \pm 3,6$ %, para conversão de matéria orgânica, ambos observados no TDH de 0,5h. Os valores reduzidos de conversão de matéria orgânica podem ser atribuídos a presença dos ácidos orgânicos, alcoóis e outros metabólitos produzidos na fermentação acidogênica.

Tabela 5.16 – Valores médios e desvios das conversões de açúcares totais e de matéria orgânica no RTV

| TDH (h) | T (°C) | Conversão de açúcares (%) | Conversão de matéria orgânica (%) |
|---------|--------|---------------------------|-----------------------------------|
| 8 | 55 | $69,3 \pm 6,0$ | $17,4 \pm 7,5$ |
| 6 | 55 | $62,0 \pm 8,5$ | $15,4 \pm 8,1$ |
| 4 | 55 | $66,1 \pm 9,5$ | $15,1 \pm 8,4$ |
| 2 | 55 | $56,0 \pm 6,3$ | $14,6 \pm 6,1$ |
| 1 | 55 | $54,5 \pm 4,4$ | $13,0 \pm 7,2$ |
| 0,5 | 55 | $27,9 \pm 7,2$ | $1,4 \pm 3,6$ |
| 4 | 65 | $54,0 \pm 8,2$ | $10,8 \pm 8,7$ |
| 4 | 75 | $51,2 \pm 7,5$ | $9,9 \pm 4,5$ |

Quando avaliado o efeito da temperatura no TDH de 4h entre as temperaturas de 55°C, 65°C e 75°C observa-se os valores de conversão açúcares e de matéria orgânica observados nas diferentes temperaturas foram similares, mantendo-se respectivamente entre $51,2 \pm 7,5$ % a $66,1 \pm 9,5$ % e entre $9,9 \pm 4,5$ % a $15,1 \pm 8,4$ %. Desta forma, a variação da temperatura não afetou as conversões de açúcares totais e de matéria orgânica pelos microorganismos fermentativos presentes na comunidade do reator.

É assumido que a DQO afluyente está relacionada aos componentes encontrados na vinhaça como ácidos, álcoois, aminoácidos, compostos fenólicos, melanoidinas e açúcar residual representando a fração orgânica, e potássio, fósforo e sulfato como fração inorgânica (Wilkie, Riedesel e Owens 2000). Com o objetivo de produzir hidrogênio, apenas os açúcares

são convertidos, produzindo metabólitos (ácidos e álcoois) que não são oxidados por completo para a produção de metano. Assim, os baixos valores médios da conversão de matéria orgânica estão relacionados à eficiência de remoção de açúcares e correspondem à fração de matéria orgânica que foi convertida CO₂, H₂ e metabólitos, estes representados pela DQO efluente em conjunto com outros compostos não convertidos.

Os valores de pH medidos nas amostras afluentes e efluentes ao longo das diferentes condições operacionais são apresentados na Tabela 5.17.

Tabela 5.17 – Valores médios e desvios do pH afluente e do pH efluente nas diferentes operações do RTV

| TDH (h) | T (°C) | pH Afluente | pH Efluente |
|---------|--------|-------------|-------------|
| 8 | 55 | 4,25 ± 0,14 | 4,61 ± 0,11 |
| 6 | 55 | 4,39 ± 0,26 | 4,61 ± 0,19 |
| 4 | 55 | 4,54 ± 0,16 | 4,79 ± 0,13 |
| 2 | 55 | 4,78 ± 0,31 | 4,55 ± 0,18 |
| 1 | 55 | 5,05 ± 0,23 | 4,65 ± 0,17 |
| 0,5 | 55 | 5,23 ± 0,10 | 4,75 ± 0,09 |
| 4 | 65 | 4,96 ± 0,22 | 4,93 ± 0,12 |
| 4 | 75 | 4,81 ± 0,11 | 4,95 ± 0,10 |

Observa-se que os valores de pH no afluente e no efluente mantiveram-se similares e constantes durante as diferentes condições operacionais dentro da faixa estabelecida entre 4,25 ± 0,14 e 5,23 ± 0,10, no afluente e entre 4,55 ± 0,18 e 4,95 ± 0,10, no efluente. O controle do pH foi realizado pela adição de NaOH no afluente em função do pH efluente observado de forma a manter o pH interno no reator em condições que favorecem a produção de hidrogênio e inibem os microorganismos produtores de metano.

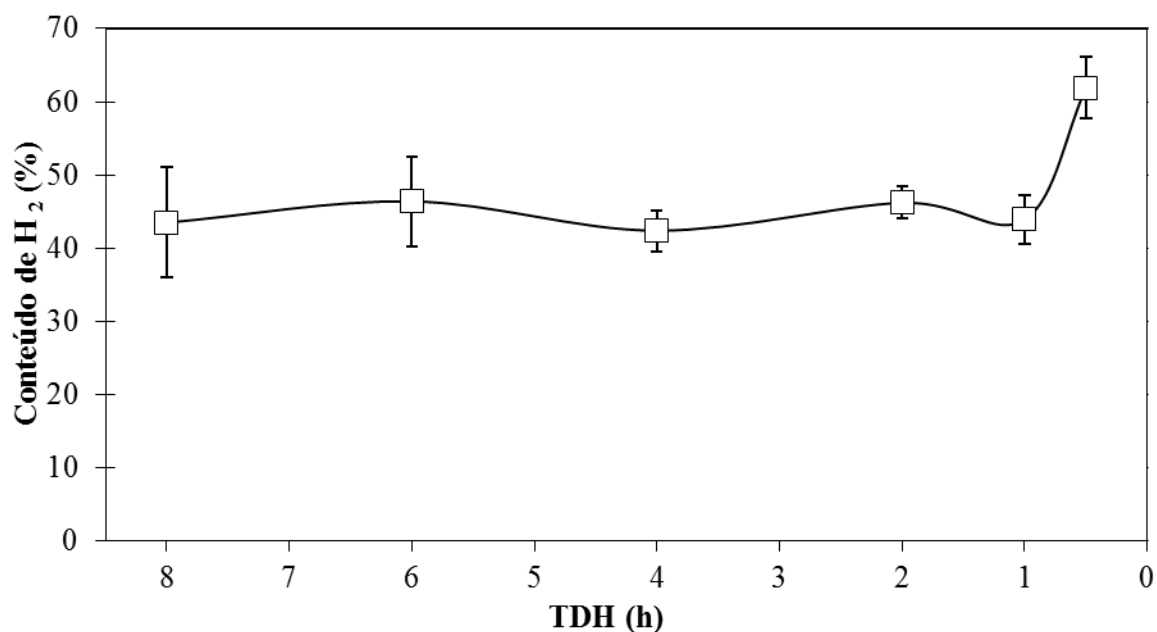
Os valores médios de sólidos suspensos totais (SST), voláteis (SSV) e fixos (SSF) medidos ao longo das diferentes condições de operação do RTV são apresentados na Tabela 5.18. A maior parte dos sólidos suspensos contidos no efluente dos reatores foi representada por sólidos suspensos voláteis com porcentagens entre 80,1% e 90,8% ao longo da variação do TDH e da temperatura. O valor de SST permaneceu estável entre 577 e 766mg.L⁻¹ perante a variação do TDH. Com aumento da temperatura de 55°C para 75°C, o valor de SST permaneceu estável entre 561mg.L⁻¹ e 611mg.L⁻¹.

Tabela 5.18 – Valores médios de SST, SSV e SSF para RTV

| TDH (h) | T (°C) | SST (mg.L ⁻¹) | SSV (mg.L ⁻¹) | SSF (mg.L ⁻¹) | SSV (%) | SSF (%) |
|---------|--------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------|---------|
| 8 | 55 | 577 | 461 | 115 | 80,1 | 19,9 |
| 6 | 55 | 704 | 637 | 67 | 90,5 | 9,5 |
| 4 | 55 | 578 | 503 | 76 | 86,9 | 13,1 |
| 2 | 55 | 621 | 548 | 73 | 88,2 | 11,8 |
| 1 | 55 | 585 | 536 | 48 | 91,8 | 8,2 |
| 0,5 | 55 | 766 | 691 | 74 | 90,3 | 9,7 |
| 4 | 65 | 561 | 494 | 67 | 88,0 | 12,0 |
| 4 | 75 | 611 | 524 | 87 | 85,7 | 14,3 |

Durante a operação do RALF termofílico, a composição do biogás produzido foi analisada para avaliar a produção de hidrogênio. As variações dos valores de fração molar do biogás produzido em função do TDH e em função da temperatura são ilustradas nas Figuras 5.17 e 5.18.

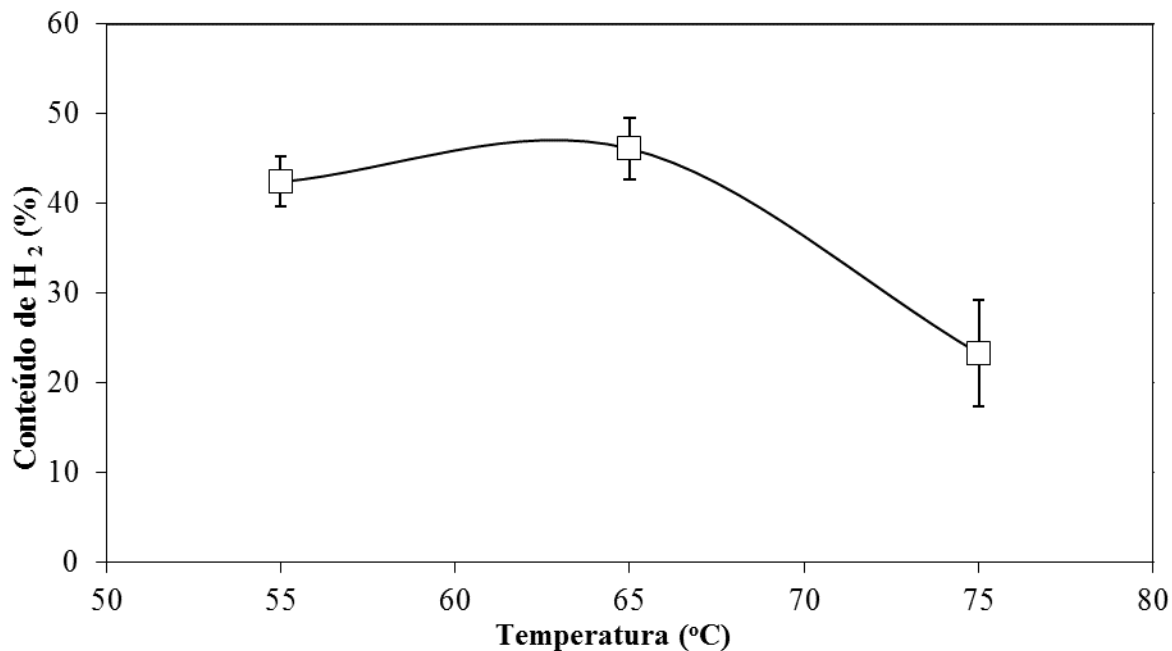
Figura 5.17 – Variação dos valores de composição de H₂ em função do TDH para RTV



Apenas hidrogênio e CO₂ foram observados no biogás e seus respectivos valores de composição de hidrogênio no biogás produzido mantiveram-se estáveis durante a variação do TDH entre 8h e 1h, cujos valores de composição de H₂ foram observados entre 43,5 ± 7,5 % e 46,4 ± 6,1%. Com a redução do TDH para 0,5h a fração molar de hidrogênio no biogás foi favorecida, apresentando valor máximo de 61,9 ± 6,1%. O gás metano não foi formado durante a operação do sistema, mostrando a eficiência do tratamento térmico adotado no lodo. e a produtividade volumétrica foram analisadas para avaliar a produção de hidrogênio. Ao

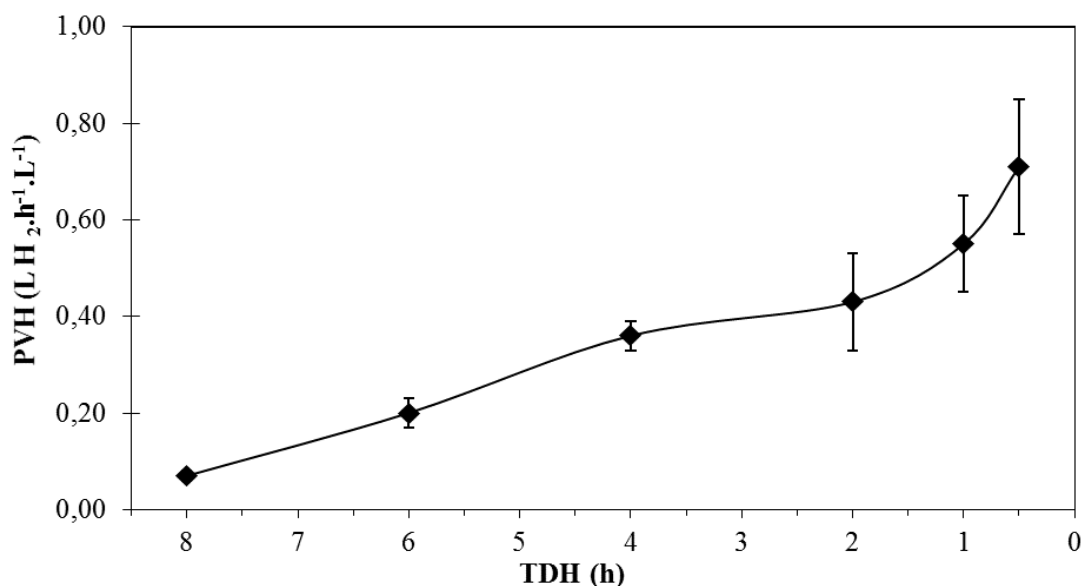
avaliar o efeito do aumento da temperatura de 55°C para 75°C observa-se que os valores nas temperaturas de 55°C e 65°C foram similares a 46%. Entretanto com o aumento da temperatura de 75°C, a fração molar de hidrogênio foi reduzida para $23,3 \pm 5,9\%$.

Figura 5.18 – Variação dos valores de composição de H₂ em função da temperatura para RTV



As variações dos valores de PVH em função do TDH e em função da temperatura são ilustradas nas Figuras 5.19 e 5.20. Com a redução do TDH de 8h para 0,5h a PVH foi elevada de $0,07 \pm 0,03 \text{ L H}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ para $0,71 \pm 0,16 \text{ L H}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$, os maiores valores encontrados neste estudo.

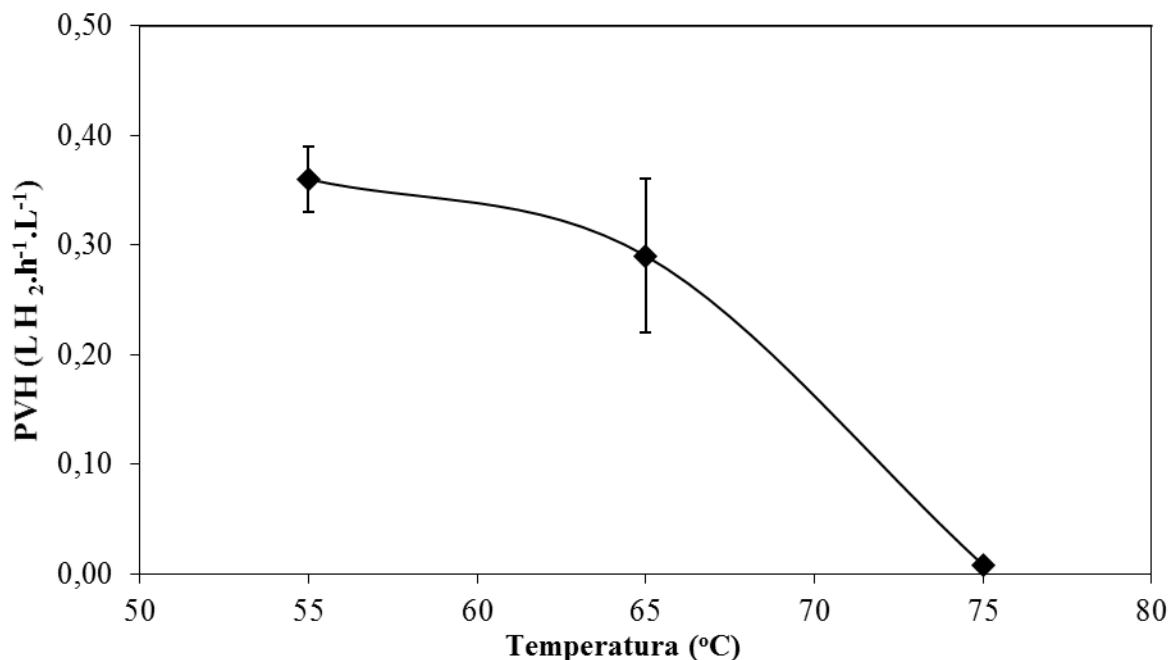
Figura 5.19 – Variação dos valores de PVH em função do TDH para RTV



Em RALF com vinhaça na DQO afluente de $5000 \text{ mg DQO} \cdot \text{L}^{-1}$, Santos *et al* (2014a)

observaram perfil crescente da produtividade de hidrogênio com a redução do TDH, com valor máximo de $0,78 \text{ L H}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ no TDH de 1h. A mesma tendência foi observada no estudo realizado por Santos *et al* (2014b) utilizando dois reatores de leito fluidizado termofílico (55°C) reduzindo o TDH de 6 a 1h, com conseqüente aumento da taxa de carregamento orgânico de 60 para $360 \text{ kg DQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{dia}^{-1}$ ($15 \text{ gDQO} \cdot \text{L}^{-1}$) e de 80 para $480 \text{ kg DQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{dia}^{-1}$ ($20 \text{ gDQO} \cdot \text{L}^{-1}$). Com este aumento, a produtividade de hidrogênio manteve perfil crescente em ambos os reatores, com valores máximos de $1,49 \text{ L H}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ($15 \text{ gDQO} \cdot \text{L}^{-1}$) e $1,2 \text{ L H}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ($20 \text{ gDQO} \cdot \text{L}^{-1}$) no TDH de 1h. Ferraz Júnior, Etchebehere e Zaiat (2015) operaram um reator anaeróbico de leito fixo em elevada taxa de carregamento orgânico ($84,2 \text{ kg DQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$) avaliando a produção termofílica de hidrogênio usando vinhaça como substrato ($35,2 \text{ g DQO} \cdot \text{L}^{-1}$) no TDH de 10,2h, obtendo de produtividade máxima de $2284 \text{ mL H}_2 \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$.

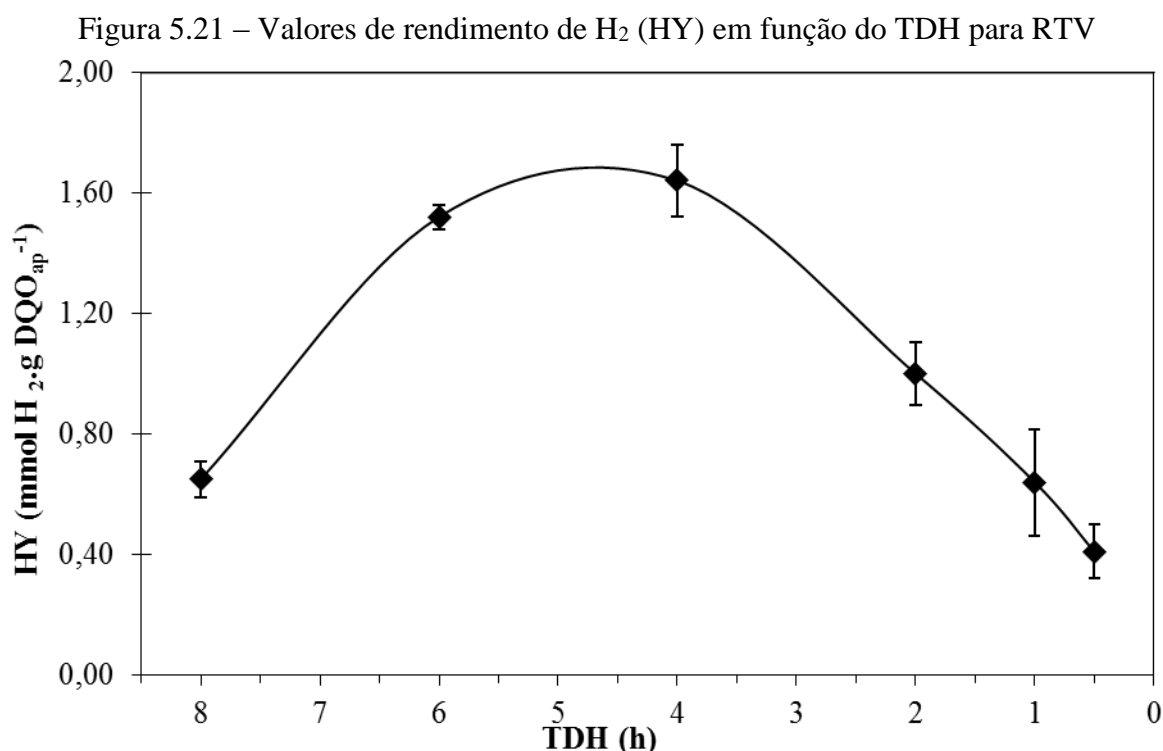
Figura 5.20 – Variação dos valores de PVH em função da temperatura para RTV



Ao avaliar o efeito da temperatura, observa-se que as condições com temperaturas de 55 e 65°C obtiveram valores similares de PVH de $0,36 \pm 0,05 \text{ L H}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ e $0,29 \pm 0,10 \text{ L H}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$, assim como seus valores de composição de hidrogênio. Entretanto, com o aumento da temperatura para 75°C , ambos PVH e composição de hidrogênio foram reduzidos para $0,008 \pm 0,005 \text{ L H}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ e $23,3 \pm 5,9\%$. De forma similar, Gadow *et al* (2013) avaliando o efeito da temperatura em três reatores CSTR em condições mesofílicas (37°C), termofílicas (55°C) e hipertermofílicas (80°C) no TDH de 10h com concentração de $10 \text{ g celulose} \cdot \text{L}^{-1}$, observaram produtividade máxima de $0,255 \text{ L H}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ no reator operado em condições termofílicas.

As variações do rendimento durante a operação do RALF termofílico em função do

TDH e da temperatura são ilustradas nas Figuras 5.21 e 5.22. Observa-se que com a diminuição dos valores de TDH na temperatura de 55°C, o rendimento de hidrogênio atingiu um valor máximo de $1,64 \pm 0,22 \text{ mmol.g DQO}^{-1}$ no TDH de 4h. A aplicação de valores menores de TDH ao RALF ocasionou na redução dos valores de HY observados, com valor mínimo de $0,41 \pm 0,09 \text{ mmol.g DQO}^{-1}$ no TDH de 0,5h. Assim, esta redução dos valores de TDH abaixo de 4h, com conseqüente aumento da taxa de carregamento orgânico, foi depreciativa ao rendimento de hidrogênio.



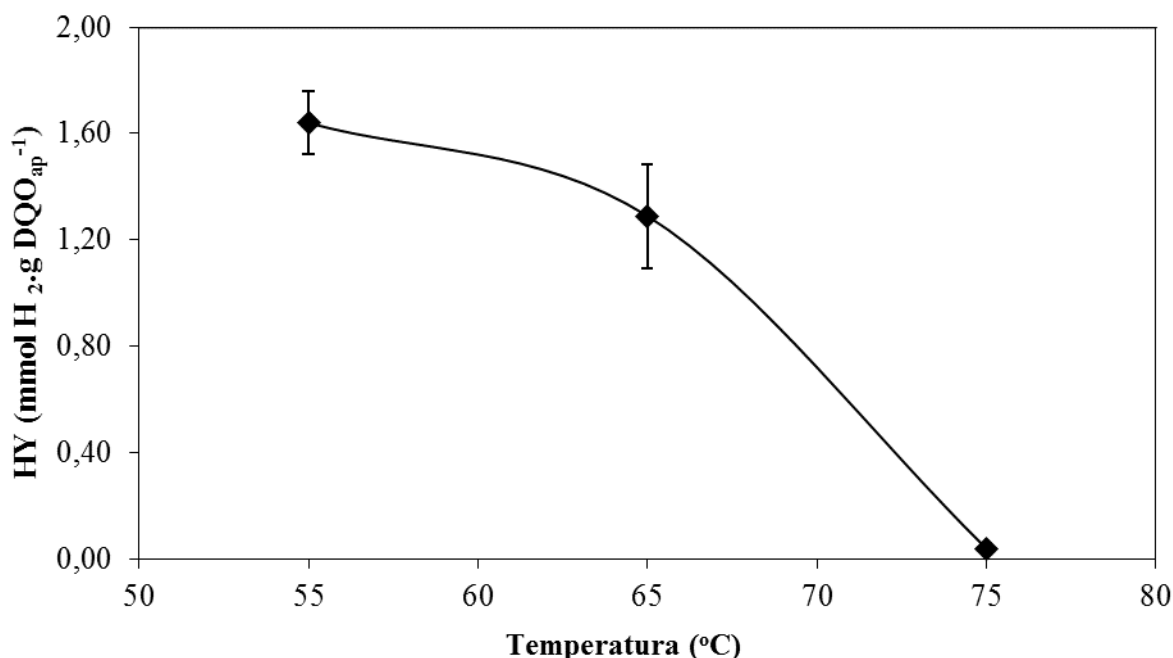
Ao avaliarem o efeito da taxa de carregamento orgânico na produção termofílica de hidrogênio em reatores de leito fixo nos valores de TDH entre 24 a 8h, correspondendo a valores de TCO entre 36,2 a 108,8 kg DQO.m⁻³.dia⁻¹, Ferraz Júnior et al. (2014) observaram valores máximos de produtividade e de rendimento de hidrogênio de 1023 mL H₂.d⁻¹.L⁻¹ e 2,4 mol H₂.mol carboidrato⁻¹ (0,7 mmol H₂.g DQO⁻¹) no valor de TDH de 12h, correspondendo a TCO de 72,4kg DQO.m⁻³.dia⁻¹. Ao aumentar a TCO para o valor de 108,6kg DQO.m⁻³.dia⁻¹, o rendimento e a produtividade de hidrogênio obtidos foram reduzidos em 63,9% e 42,8%, respectivamente.

Similarmente, Santos *et al* (2014b) utilizaram dois reatores de leito fluidizado termofílico (55°C) reduzindo o TDH de 6 a 1h, com conseqüente aumento da taxa de carregamento orgânico de 60 para 360kg DQO.m⁻³.dia⁻¹ (15gDQO.L⁻¹) e de 80 para 480kg

DQO.m⁻³.dia⁻¹ (20gDQO.L⁻¹). Com este aumento da TCO, o rendimento de hidrogênio foi reduzido, com valores máximos de 2,23mmol H₂. g DQO_{ap}⁻¹ (15gDQO.L⁻¹) e de 1,85mmol H₂. g DQO_{ap}⁻¹ (20gDQO.L⁻¹) observados no TDH de 6h. Estes resultados indicaram que a produção de hidrogênio foi realizada sobre condições de sobrecarga orgânica no reator. Santos *et al.* (2014c) também observaram resultando em sobrecarga de reatores RALF termofílicos (55°C) na produção contínua de hidrogênio, com concentrações afluentes de vinhaça de 10.000mgDQO.L⁻¹ e de 30.000mgDQO.L⁻¹, reduzindo o TDH de operação de 6 para 1h. A concentração de 10.000mgDQO.L⁻¹ foi considerada ótima ao obter os maiores valores de rendimento (2,86mmol H₂. g DQO_{ap}⁻¹, no TDH de 6h). No caso da concentração de 30.000mgDQO.L⁻¹, o rendimento máximo de hidrogênio de 0,79mmol H₂.g DQO_{ap}⁻¹, no TDH de 6h.

Quando observado o efeito da temperatura no TDH constante de 4h, o valor de rendimento de hidrogênio de 1,29 ± 0,39 mmol.g DQO⁻¹ na temperatura de 65°C foi similar ao encontrado na temperatura de 55°C. Entretanto, com o aumento da temperatura para 75°C o HY observado foi reduzido para 0,04 ± 0,02 mmol.g DQO⁻¹. Assim o aumento da temperatura foi negativo ao rendimento de hidrogênio observado.

Figura 5.22 – Valores de rendimento de H₂ (HY) em função da temperatura para RTV



Considerando a utilização de efluentes gerados em altas temperaturas, Luo *et al* (2010b) investigaram a influência da temperatura (37°C, 60°C e 70°C) na produção fermentativa de hidrogênio a partir de vinhaça de mandioca em testes em batelada. O

rendimento máximo de hidrogênio de 53,3 mL H₂.g SV⁻¹ foi obtido na temperatura de 60°C. Este resultado foi 53,5% maior que a condição mesofílica e 198% maior que a condição termofílica extrema.

Zhang, Ren e Wang (2015) avaliaram o efeito da temperatura na produção fermentativa de hidrogênio de palha de milho hidrolisada nas condições mesofílicas (30 e 37°C), termofílicas (55°C) e termofílicas extremas (70°C) utilizando lodo ativado e lodo anaeróbio granular sem pré-tratamento. Os rendimentos máximos de hidrogênio foram obtidos na temperatura de 55°C tanto para o lodo ativado (6,08 mmol H₂.g açúcar consumido⁻¹) e para lodo anaeróbio (7,74 mmol H₂.g açúcar consumido⁻¹). Em ambos os inóculos utilizados a eficiência da temperatura de fermentação seguiu a ordem de 55°C > 70°C > 37°C ~ 30°C. Foi observado que com o aumento da temperatura, maior foi o tempo de fase de adaptação para ambos os inóculos, indicando que os microorganismos tem maior dificuldade de adaptação aos componentes complexos do hidrolisado em temperaturas maiores.

Jiang *et al.* (2015) avaliaram o efeito da temperatura na estrutura e atividade da comunidade microbiana em testes em batelada entre as temperaturas de 25 e 85°C. O inóculo, originalmente termofílico (55°C) converteu a glicose e celulose entre as temperatura de 35 a 65°C, com atividade máxima em 55°C. Entretanto, a performance do meio foi afetada negativamente com o aumento da temperatura além dos 55°C, inibindo completamente o sistema em 70°C.

Na Tabela 5.19 encontra-se um resumo dos valores médios composição de H₂ presente no biogás produzido, PVH e HY em função das diferentes condições operacionais de TDH e temperatura. Na Tabela 5.20 os valores de rendimento observados neste estudo e em outros autores são apresentados para efeito comparativo na avaliação do efeito do TDH. A Tabela 5.21 é uma comparação entre os rendimentos apresentados neste estudo e nos estudos de diferentes autores avaliando o efeito da temperatura.

Tabela 5.19 – Valores médios e desvios dos principais resultados do RTV

| T (°C) | HRT (h) | TCO (kg DQO.m ⁻³ .d ⁻¹) | H ₂ (%) | HPR (L.h ⁻¹ .L ⁻¹) | HY (mmol.g COD ⁻¹) |
|--------|---------|--|--------------------|---|--------------------------------|
| 55 | 8 | 30 | 43,5 ± 7,5 | 0,07 ± 0,03 | 0,65 ± 0,32 |
| 55 | 6 | 40 | 46,4 ± 6,1 | 0,20 ± 0,06 | 1,52 ± 0,32 |
| 55 | 4 | 60 | 42,4 ± 2,8 | 0,36 ± 0,05 | 1,64 ± 0,22 |
| 55 | 2 | 120 | 46,2 ± 2,2 | 0,43 ± 0,1 | 1,00 ± 0,24 |
| 55 | 1 | 240 | 43,9 ± 3,3 | 0,55 ± 0,19 | 0,64 ± 0,22 |
| 55 | 0,5 | 480 | 61,9 ± 4,2 | 0,71 ± 0,16 | 0,41 ± 0,09 |
| 65 | 4 | 60 | 46,1 ± 3,4 | 0,29 ± 0,09 | 1,29 ± 0,39 |
| 75 | 4 | 60 | 23,3 ± 5,9 | 0,008 ± 0,005 | 0,04 ± 0,02 |

Tabela 5.20 – Valores de HY, TDH e TCO ótimos observados em estudos com vinhaça

| Referências | Reator | TDH _{ótimo} (h) | TCO _{ótima} (kg DQO.m ⁻³ .d ⁻¹) | HY (mmol H ₂ .g DQO ⁻¹) |
|---------------------------------------|---------------|-----------------------------|--|---|
| Santos <i>et al.</i> (2014a) | RALF | 4 | 52,7 | 5,73 |
| Santos <i>et al.</i> (2014b) | RALF | 6 | 60 | 2,23 |
| Santos <i>et al.</i> (2014c) | RALF | 6 | 40 | 2,86 |
| Ferraz Júnior <i>et al.</i> (2014) | Leito fixo | 12 | 72,4 | 0,77 |
| Este estudo | RALF | 4 | 60 | 1,64 |

Tabela 5.21 – Comparação de valores de rendimento de hidrogênio relatados em estudos avaliando o efeito da temperatura

| Referências | Reator | Substrato | T _{ótima} (°C) | HY |
|--------------------------------|----------|---|----------------------------|--|
| Luo <i>et al.</i> (2010b) | Batelada | Vinhaça de mandioca (28,2 g açúcares.L ⁻¹) | 60 | 53,8 mL H ₂ . g SV ⁻¹ |
| Gadow <i>et al.</i> (2013) | CSTR | Celulose (10 g.L ⁻¹) | 55 | 12,3 mmol H ₂ .g celulose ⁻¹ |
| Jiang <i>et al.</i> (2015) | CSTR | Celulose (10 g.L ⁻¹) | 55 | 2,77 mol H ₂ .mol hexose ⁻¹ |
| Zhang, K, Ren e Wang (2015) | Batelada | Hidrolisado de palha de milho | 55 | 7,74 mmol H ₂ .g açúcar ⁻¹ |
| Este estudo | RALF | Vinhaça de cana de açúcar (10 g DQO.L ⁻¹) | 55 | 1,64 mmol H ₂ .g DQO ⁻¹ |

Observa-se na pela Tabela 5.19 que os resultados obtidos estão de acordo com a literatura e que o decréscimo do rendimento de hidrogênio produzido está associado ao aumento da TCO alimentada ao reator. Sob condições termofílicas utilizando vinhaça como substrato orgânico, Santos *et al.* (2014a) reduziram os valores de TDH de 8 a 1h, com subsequente aumento da taxa de carregamento orgânico de 26,6 para 225,3Kg DQO.m⁻³.dia⁻¹. O valor máximo de rendimento de hidrogênio de 5,73 mmol H₂. g DQO_{ap}⁻¹ foi observado no TDH de 4h. Com a redução do TDH, foi observada a redução dos valores de rendimento. Ao longo da redução do TDH, comportamento similar foi observado com redução do valor de rendimento de hidrogênio de 1,64 mmol.g DQO⁻¹ na TCO de 64,8 kg DQO.m⁻³.d⁻¹, para 0,41 mmol.g DQO⁻¹ na TCO de 518,4kg DQO.m⁻³.d⁻¹, associado ao TDH de 0,5h. Santos *et al.* (2014b), Santos *et al.* (2014c) e Ferraz Júnior *et al.* (2014) relataram esta mesma ocorrência. O aumento da TCO resulta o aumento de matéria orgânica disponível para consumo microbiano, atingindo seu valor ótimo para conversão de carboidratos em hidrogênio na TCO de 60kg DQO.m⁻³.d⁻¹. Entretanto, o efeito negativo da TCO associado à redução do TDH

sugere que taxas de carregamento maiores são deletérias para a biomassa, com consequente acúmulo no reator de ácidos voláteis, compostos recalcitrantes e tóxicos presentes na vinhaça alimentada. Estes resultados indicaram que a produção de hidrogênio em valores de TDH inferiores a 4h foi realizada sobre condições de sobrecarga orgânica no reator.

O efeito da temperatura, avaliado pelos diferentes estudos apresentados na tabela 5.20, atinge de forma sinérgica um conjunto de fatores que compreendem a cinética e termodinâmica das reações bioquímicas, a transferência de massa, a complexidade do substrato, a origem do inóculo e a diversidade microbiana da comunidade. Utilizando vinhaça de mandioca, Luo *et al* (2010b) observaram rendimento máximo de hidrogênio de 53,3 mL H₂.g SV⁻¹ na temperatura de 60°C. Este resultado foi 53,5% maior que a condição mesofílica (35°C) e 198% maior que a condição termofílica extrema (70°C). Os autores observaram que apesar de ser um inóculo mesofílico, os resultados mostraram que o inóculo misto continha várias comunidades microbianas que podem ser seletivamente cultivadas em diferentes temperaturas.

Gadow *et al* (2013) avaliaram o efeito da temperatura operando três reatores CSTR em condições mesofílicas (37°C), termofílicas (55°C) e hipertermofílicas (80°C). As condições termofílicas e hipertermofílicas apresentaram produção estável de hidrogênio com rendimentos médios de 12,28 e 9,72 mmol H₂.g celulose⁻¹, respectivamente.

Estudando o efeito da temperatura na estrutura e atividade da comunidade microbiana, Jiang *et al.* (2015) realizaram em testes em batelada entre as temperaturas de 25 e 85°C. O inóculo, originalmente termofílico (55°C) converteu a glicose e celulose entre as temperatura de 35 a 65°C, com atividade máxima em 55°C. Entretanto, a performance do meio foi afetada negativamente com o aumento da temperatura além dos 55°C, inibindo completamente o sistema em 70°C.

Zhang, Ren e Wang (2015) avaliaram o efeito da temperatura na produção fermentativa de hidrogênio de palha de milho hidrolisada nas condições mesofílicas (30 e 37°C), termofílicas (55°C) e termofílicas extremas (70°C) utilizando lodo ativado e lodo anaeróbio granular sem pré-tratamento. Os rendimentos máximos de hidrogênio foram obtidos na temperatura de 55°C tanto para o lodo ativado (6,08 mmol H₂.g açúcar consumido⁻¹) e para lodo anaeróbio (7,74 mmol H₂.g açúcar consumido⁻¹). Em ambos os inóculos utilizados a eficiência da temperatura de fermentação seguiu a ordem de 55°C > 70°C > 37°C ~ 30°C. Foi observado que com o aumento da temperatura, maior foi o tempo de fase de adaptação para ambos os inóculos, indicando que os microorganismos tem maior dificuldade de adaptação aos componentes complexos do hidrolisado em temperaturas maiores. As

comunidades microbianas apresentaram menor diversidade com o aumento da temperatura, caracterizando o cultivo seletivo de algumas espécies. As performances superiores das condições termofílicas podem ser atribuídas ao cultivo seletivo de produtores de hidrogênio termofílicos mais eficientes capazes de produzir mais hidrogênio usando substratos complexos. A performance insatisfatória da produção de hidrogênio em condições termofílicas extremas é resultado da não formação de uma comunidade termofílica extrema de eficiente devido a sua baixa eficiência de consumo de substratos complexos e por serem afetados negativamente pelos subprodutos associados ao hidrolisado de palha de milho. Similarmente, neste estudo tanto a produtividade quanto o rendimento de hidrogênio obtiveram seus valores ótimos de $0,36\text{L.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$ e $1,64\text{mmol H}_2.\text{g DQO}^{-1}$, respectivamente, na temperatura de 55°C . Conforme o aumento da temperatura, os valores do rendimento e da produtividade foram reduzidos, com seus valores mínimos de $0,04\text{mmol H}_2.\text{g DQO}^{-1}$ e $0,008\text{L.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$, respectivamente, na temperatura de 75°C .

De forma geral, devido à maior dificuldade de adaptação aos substratos de maior complexidade da biomassa hipertermofílica presente em lodos não originalmente hipertermofílicos, torna-se de difícil seleção uma comunidade microbiana capaz de produzir H_2 em condições hipertermofílicas (Luo *et al*, 2010b; Gadow *et al*, 2013; Jiang *et al.*, 2015; Zhang, Ren e Wang, 2015). Além disso, mesmo com substratos puros com a celulose, ao operar os reatores em concentrações maiores ou cargas mais elevadas, a condição termofílica apresentou melhores resultados, seguida de hipertermofílica. Assim, avaliando os resultados obtidos sobre o efeito da temperatura e a literatura sobre este assunto, quanto maior a complexidade do substrato e a carga aplicada, menor será a temperatura ótima para produção de hidrogênio devido ao efeito de diminuição da diversidade microbiana que reduz a capacidade sinérgica de degradação de substrato e produção de hidrogênio na comunidade microbiana em temperaturas mais elevadas. Portanto, a temperatura ótima para produção de hidrogênio a partir de vinhaça foi a temperatura de 55°C , selecionando a melhor comunidade produtora de hidrogênio para a vinhaça e aprimorando as condições de transferência de massa.

A quantificação dos metabólitos líquidos produzidos no RALF, como os ácidos orgânicos voláteis e alcoóis é ilustrada na Figura 5.23 na forma de distribuição dos principais produtos observados no efluente do reator nas diferentes condições de operação. Na Tabela 5.22 são apresentados os valores de concentração média e fração molar de cada componente.

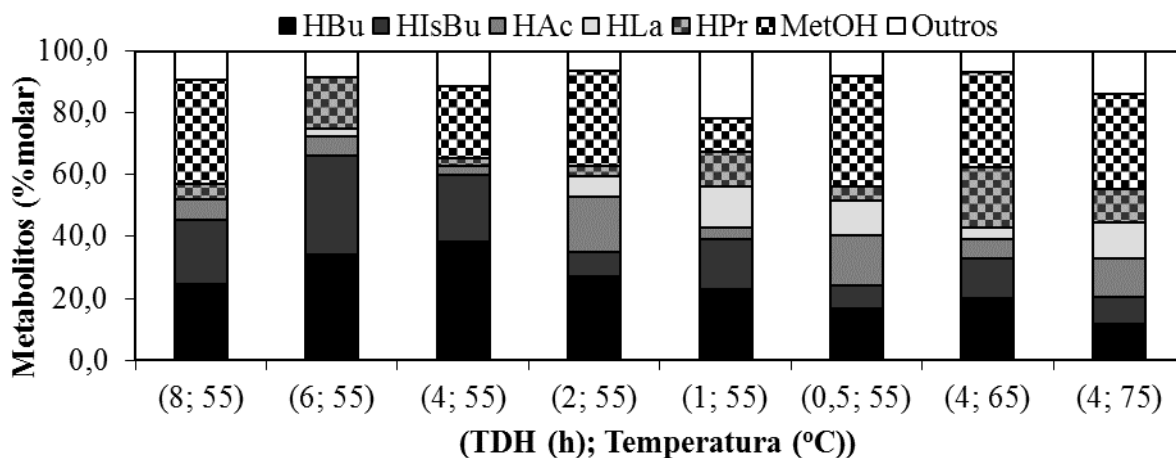
Os principais metabólitos encontrados no efluente do reator em todas as condições de operação foram os ácidos butírico e isobutírico e o álcool metanol, com porcentagens entre

12,2 e 37,0%; 7,6 e 32,0% e 10,8 e 35,7%, respectivamente. Foram observadas ainda a presença de ácido propiônico, acético, láctico e málico, com porcentagens entre 3,1 e 16,9%; 3,8 e 17,8%; 3,8 e 13,2%; 2,3 e 6,2%, respectivamente. Vale ressaltar que para maximizar a produção biológica de hidrogênio é necessário reduzir a quantidade de diferentes metabólitos produzidos. Entretanto, esta meta é de difícil alcance devido a composição altamente complexa da vinhaça.

Tabela 5.22 – Principais metabólitos obtidos nas diferentes condições de operação do RTV

| TDH (h) | T (°C) | HBu | | HIsBu | | HAc | | HPr | | HLa | | MetOH | | HPR (L.h ⁻¹ .L ⁻¹) | HY (mmol.g COD ⁻¹) |
|------------|-----------|-----------------------|----|-----------------------|-----|-----------------------|----|-----------------------|----|-----------------------|----|-----------------------|------|--|-----------------------------------|
| | | (mg.L ⁻¹) | % | (mg.L ⁻¹) | % | (mg.L ⁻¹) | % | (mg.L ⁻¹) | % | (mg.L ⁻¹) | % | (mg.L ⁻¹) | % | | |
| 8 | 55 | 2970 ± 518 | 25 | 2497 ± 379 | 21 | 567 ± 266 | 7 | 493 ± 72 | 5 | 0 | 0 | 1473 ± 64 | 33,5 | 0,07 ± 0,03 | 0,65 ± 0,32 |
| 6 | 55 | 3468 ± 377 | 34 | 3244 ± 637 | 32 | 429 ± 103 | 6 | 1444 ± 58 | 17 | 243 ± 41 | 2 | 0 | 0 | 0,20 ± 0,06 | 1,52 ± 0,32 |
| 4 | 55 | 4144 ± 194 | 37 | 1802 ± 1398 | 16 | 267 ± 97 | 4 | 512 ± 93 | 5 | 0 | 0 | 1104 ± 433 | 27,1 | 0,36 ± 0,05 | 1,64 ± 0,22 |
| 2 | 55 | 3530 ± 697 | 27 | 991 ± 506 | 7,6 | 1578 ± 477 | 18 | 339 ± 178 | 3 | 913 ± 252 | 7 | 1464 ± 217 | 31 | 0,43 ± 0,1 | 1,00 ± 0,24 |
| 1 | 55 | 2847 ± 551 | 23 | 1997 ± 943 | 16 | 371 ± 60 | 4 | 1189 ± 360 | 11 | 1667 ± 622 | 13 | 485 ± 300 | 10,8 | 0,55 ± 0,19 | 0,64 ± 0,22 |
| 0,5 | 55 | 3275 ± 131 | 17 | 1494 ± 174 | 7,6 | 2186 ± 192 | 16 | 738 ± 97 | 4 | 2280 ± 52 | 11 | 2567 ± 58 | 35,7 | 0,71 ± 0,16 | 0,41 ± 0,09 |
| 4 | 65 | 2230 ± 619 | 20 | 1458 ± 400 | 13 | 459 ± 176 | 6 | 1833 ± 538 | 11 | 433 ± 346 | 4 | 1253 ± 241 | 30,8 | 0,29 ± 0,09 | 1,29 ± 0,39 |
| 4 | 75 | 696 ± 150 | 12 | 505 ± 131 | 8,9 | 502 ± 47 | 13 | 535 ± 45 | 8 | 700 ± 54 | 12 | 587 ± 207 | 28,4 | 0,008 ± 0,005 | 0,04 ± 0,02 |

Figura 5.23 – Distribuição dos principais metabólitos observados nos efluentes do RTV



Metanol esteve presente em todas as condições de operação do reator exceto no TDH de 6h (55°C). As frações molares de metanol variaram entre 10,8% (TDH de 1h e 55°C) e 35,7% (TDH de 0,5h e 55°C). Nestas condições as produtividades de hidrogênio de 0,55 e 0,71L H₂.h⁻¹.L⁻¹ foram obtidas, respectivamente. Além disso, no TDH de 4h em 55°C, onde o rendimento de H₂ observado foi o valor máximo neste estudo de 1,64 mmol.g DQO⁻¹, obteve-se metanol em 27,1%. Portanto, o desempenho do reator termofílico não foi afetado pelas diferentes composições deste álcool entre os metabólitos produzidos.

Com a diminuição do TDH de 8h para 4h a fração molar de ácido butírico foi elevada de 25% para 37%, onde seu valor foi máximo. De forma similar, a fração molar do ácido

isobutírico também obteve seu valor máximo entre a redução do TDH de 8h para 6h, aumentando de 20,7% para 32%. Estes valores máximos de fração molar de butirato e isobutirato estão associados a condições de TDH de 6h (55°C) e 4h (55°C) cujos rendimentos de hidrogênio foram os maiores obtidos neste estudo de 1,52 e 1,64 mmol.g DQO⁻¹, respectivamente. A produção destes ácidos reflete a predominância da rota butírica para as condições de rendimento máximo na produção de hidrogênio. Similarmente, Santos *et al.* (2014b) em dois RALF termofílicos com 15000 mg DQO.L⁻¹ e 20000 mg DQO.L⁻¹, observou que na TCO de 60 kg DQO.m⁻³.d⁻¹ a produtividade máxima de 0,45L H₂.h⁻¹.L⁻¹, sem reduzir o rendimento de hidrogênio, ocorreu na presença de 16% de ácido butírico. Entretanto, com a redução do TDH para 0,5h e o aumento da temperatura para 65°C e 75°C, as composições de ácidos butírico e isobutírico foram reduzidas, notadamente desfavorecendo a rota butírica de produção de hidrogênio.

A produção de ácido propiônico está associada ao consumo de hidrogênio. Durante o experimento, sua fração molar manteve-se entre 3,1 e 17%. Apesar das quantidades significativas deste ácido em todas as etapas, a condição onde foi obtido a fração molar máxima de 17% (6h, 55°C) está associada a redução do TDH de 8h para 6h resultando no aumento do rendimento de hidrogênio de 0,65 para 1,52 mmol.g DQO⁻¹.

Com a redução do TDH de 8h para 0,5h a produção de ácido acético e láctico foi favorecida, observando seus valores máximos de concentração de 2186 mg.L⁻¹ e 2280 mg.L⁻¹. Com a redução do TDH de 4h para 0,5h, a fração molar de ácido butírico foi reduzida de 37% (4h; 55°C) para 17% (0,5h; 55°C), valor similar a fração molar de ácido acético de 16%. A mudança aparente na composição dos metabólitos produzidos indica a mudança da rota metabólica majoritariamente butírica para a produção de ácidos acético, butírico e láctico em proporções similares e produtividade máxima de hidrogênio de 0,71L H₂.h⁻¹.L⁻¹). Santos *et al.* (2014c) observaram com a redução do TDH em todas as condições de operação ácido acético (6,3-22,8%) e ácido láctico (25,4-32,7%) com valor máximo de produtividade de 1,96L H₂.h⁻¹.L⁻¹ em TDH de 1h.

Os principais metabólitos encontrados por Santos *et al.* (2014a) foram os ácidos succínico, láctico e butírico. Apenas a rota butírica é responsável pela produção de hidrogênio, mas a presença destes outros ácidos em grandes concentrações não alterou a produção de hidrogênio. O uso da vinhaça bruta favoreceu a produção de butirato, acetato e isobutirato e a redução do ácido succínico, sugerindo uma mudança de rota metabólica favorável a produção de hidrogênio. A comunidade microbiana foi dominada por *Thermoanaerobacterium* sp. e *Clostridium* sp.

Santos *et al* (2014b) observaram como principais metabólitos produzidos os ácidos láctico, butírico, isobutírico e propiônico, com a redução do TDH favorecendo a rota butírica de produção de hidrogênio. A população microbiana caracterizou-se pela presença de produtores de hidrogênio (*Megasphaera* sp.) e outros organismos (*Lactobacillus* sp.)

Ferraz Júnior *et al.* (2014) notaram que os principais metabólitos detectados foram acetato, butirato e propionato, sendo a rota butírica de produção de hidrogênio favorecida em elevada TCO e a rota acética favorecida com valores menores de TCO. Na condição de rendimento máximo, acetato e butirato foram produzidos em concentrações elevadas.

Com o aumento gradual da temperatura de 55°C para 65°C e 75°C observa-se a redução na concentração dos ácidos butírico e isobutírico de 4144 mg.L⁻¹ para 696 mg.L⁻¹ e 1802 mg.L⁻¹ para 505 mg.L⁻¹, respectivamente. Na temperatura de 75 °C, o metanol e os ácidos acético e láctico foram produzidos em concentrações reduzidas de 587 mg.L⁻¹, 502 mg.L⁻¹ e 700 mg.L⁻¹. Estes valores reduzidos estão associados aos menores valores de rendimento (0,04 mmol.g DQO⁻¹) e produtividade de hidrogênio (0,001 L H₂.h⁻¹.L⁻¹). Avaliando o efeito das temperaturas de 30 °C, 37 °C, 55 °C e 70 °C com palha de milho hidrolisada para a produção de hidrogênio com lodo ativado e lodo granular anaeróbio, Zhang *et al.* (2015) observaram fermentações mais eficientes na temperatura de 55°C em comparação com 70°C, com predominância de acetato e butirato. A análise da comunidade microbiana observou que o aumento da temperatura reduziu a diversidade, selecionando o crescimento de espécies específicas. Sabe-se que comunidades produtoras de hidrogênio apresentam alta dominância de certas espécies e grande competição por substrato, caracterizando uma baixa resistência do meio a perturbações. Como inóculo utilizado neste experimento foi obtido de um reator adaptado a temperatura termofílica de 55°C para produção de biogás, o aumento da temperatura de 55 °C para 75 °C pode inibir a comunidade microbiana que não está adaptada a esta condição, desnaturando componentes celulares importantes, como enzimas e proteínas. As fermentações a 55°C corresponderam as maiores concentrações de acetato e butirato, com produção mínima de etanol, indicando a utilização mais eficiente de NADH para produção de hidrogênio. Nas outras condições, grandes quantidades de NADH foram utilizadas para metabólitos não relacionados a produção de hidrogênio ou intermediários, como propionato e ácido fórmico.

No estudo de Luo *et al* (2010b) os principais metabólitos foram butirato e etanol na temperatura de 60°C, acetato, propionato e butirato em 37°C e em 70°C acetato e etanol foram predominantes, mas em concentrações menores e com inibição da produção de butirato de acordo com o rendimento de hidrogênio reduzido. A produção termofílica de hidrogênio

correspondeu com a maior concentração de ácido butírico e inibição da produção de propionato.

Jiang *et al.* (2015) observaram que as concentrações e distribuições metabólitos líquidos foram dependentes da temperatura, aumentando a composição e a concentração de acetato e butirato até 55°C. Entretanto, a concentração destes metabólitos relacionados a produção de hidrogênio foi reduzida em consequência do aumento da temperatura além deste ponto crítico.

Assim, observa-se que neste estudo a temperatura de 75°C reduziu a produtividade, a composição de hidrogênio no biogás, o rendimento de hidrogênio e as concentrações de metabólitos produzidos.

5.4 Efeito da Co-digestão de Vinhaça e Soro de Queijo em RALF Termofílico

Na Tabela 5.23 estão apresentados os valores médios obtidos das conversões de açúcares totais (em glicose) e de matéria orgânica nas diferentes condições de operação do reator termofílico do experimento de co-digestão alimentado com vinhaça (RTCV) e do reator termofílico do experimento de co-digestão alimentado com vinhaça e concentrações graduais de soro (RTCVS).

Tabela 5.23 - Valores médios e desvios das conversões da co-digestão de vinhaça e soro

| RTCV | | | RTCVS | | | |
|---------|------------------------------|--------------------|---------|------------------------------|------------------------------|--------------------|
| TDH (h) | Conversão de Carboidrato (%) | Remoção de DQO (%) | TDH (h) | DQO V:S (g.L ⁻¹) | Conversão de Carboidrato (%) | Remoção de DQO (%) |
| 8 | 55,0 ± 4,5 | 9,8 ± 4,2 | 8 | 10:02 | 42,9 ± 7,8 | 8,6 ± 2,5 |
| 6 | 58,4 ± 5,7 | 10,2 ± 4,6 | 8 | 10:04 | 65,8 ± 5,3 | 8,8 ± 2,4 |
| 4 | 56,0 ± 3,6 | 10,2 ± 2,3 | 8 | 10:06 | 65,7 ± 5,9 | 9,8 ± 2,4 |
| 2 | 49,2 ± 10,1 | 11,1 ± 2,8 | 8 | 10:08 | 63,5 ± 8,3 | 7,8 ± 2,4 |
| 1 | 50,9 ± 9,6 | 9,5 ± 3,8 | 8 | 10:10 | 77,1 ± 4,9 | 8,6 ± 4,7 |
| - | - | - | 6 | 10:02 | 60,7 ± 12,0 | 12,5 ± 3,3 |

Os valores de conversão de açúcares e de matéria orgânica no RTCV permaneceram entre 49,2 ± 10,1% e 58,4 ± 5,7%, para conversão de açúcares, e entre 9,5 ± 3,8% e 11,1 ± 2,8%, para conversão de matéria orgânica, atingindo valores máximos de conversão no TDH de 6h. Por outro lado, apesar de não apresentar variação da remoção de DQO com o aumento da concentração de soro no afluente acima de 2g DQO.L⁻¹, a conversão de carboidrato aumentou de 42,9 ± 7,8% para 77,1 ± 4,9%, obtendo valor máximo na relação de DQO vinhaça:soro de 10:10g.L⁻¹. O aumento da conversão de carboidratos neste caso deve-se a maior disponibilidade de carboidratos vindos do soro de queijo para consumo pelos microrganismos, favorecendo o processo fermentativo. De forma similar, Santos *et al* (2014a) avaliaram a co-digestão de diferentes razões de vinhaça e glicose em reator anaeróbio de leite fluidizado na DQO afluente de 5000 mg DQO.L⁻¹. Foi observado valor máximo de conversão de carboidrato de 52,6% no TDH de 8h com proporção 67% glicose e 33% vinhaça.

Os valores médios de pH verificados nos afluentes e efluentes dos reatores ao longo da operação são apresentados na Tabela 5.24. Observa-se que os valores de pH do RTCV no afluente e no efluente mantiveram-se similares e constantes durante as diferentes condições operacionais dentro da faixa estabelecida entre 4,25 ± 0,14 e 5,23 ± 0,10, no afluente e entre

4,55 ± 0,18 e 4,95 ± 0,10, no efluente. Os valores de pH do RTCVS foram maiores e também mantiveram-se constantes entre 4,90 ± 0,25 e 6,05 ± 0,43, no afluente e entre 4,26 ± 0,21 e 4,71 ± 0,31, no efluente. O controle do pH foi realizado pela adição de NaOH no afluente em função do pH efluente observado de forma a manter o pH interno no reator em condições que favorecem a produção de hidrogênio e inibem os microorganismos produtores de metano.

Tabela 5.24 - Valores médios e desvios do pH afluente e efluente dos reatores de co-digestão

| RTCV | | | RTCVS | | | |
|---------|------------------|------------------|---------|------------------------------|------------------|------------------|
| TDH (h) | pH _{AF} | pH _{EF} | TDH (h) | DQO V:S (g.L ⁻¹) | pH _{AF} | pH _{EF} |
| 8 | 4,77 ± 0,16 | 4,83 ± 0,17 | 8 | 10:02 | 4,90 ± 0,25 | 4,64 ± 0,13 |
| 6 | 4,86 ± 0,20 | 4,79 ± 0,15 | 8 | 10:04 | 5,39 ± 0,47 | 4,46 ± 0,15 |
| 4 | 4,89 ± 0,17 | 4,74 ± 0,22 | 8 | 10:06 | 5,70 ± 0,33 | 4,26 ± 0,21 |
| 2 | 4,83 ± 0,13 | 4,77 ± 0,16 | 8 | 10:08 | 5,92 ± 0,66 | 4,30 ± 0,35 |
| 1 | 4,80 ± 0,20 | 4,71 ± 0,16 | 8 | 10:10 | 5,75 ± 0,80 | 4,68 ± 0,18 |
| - | - | - | 6 | 10:02 | 6,05 ± 0,43 | 4,71 ± 0,31 |

Os valores médios de SST, SSV e SSF medidos nas diferentes condições operacionais são apresentados na Tabela 5.25. A maior parte dos sólidos suspensos contidos no efluente dos reatores foi representada por sólidos suspensos voláteis com porcentagens entre 83,7% e 91,4% para todos os reatores ao longo da variação do TDH. O reator RTCVS apresentou o valor de sólidos suspensos máximo de 1322mg.L⁻¹ no TDH de 6h com. Quanto maior a concentração de soro de queijo no substrato, maior a concentração de sólidos suspensos observados no efluente do reator. Com a redução do TDH de 8h para 6h, o valor de SST foi elevado de 572mg.L⁻¹ para 1322mg.L⁻¹ no reator RTCVS.

Tabela 5.25 – Valores médios de SST, SSV e SSF para RTCV e RTCVS

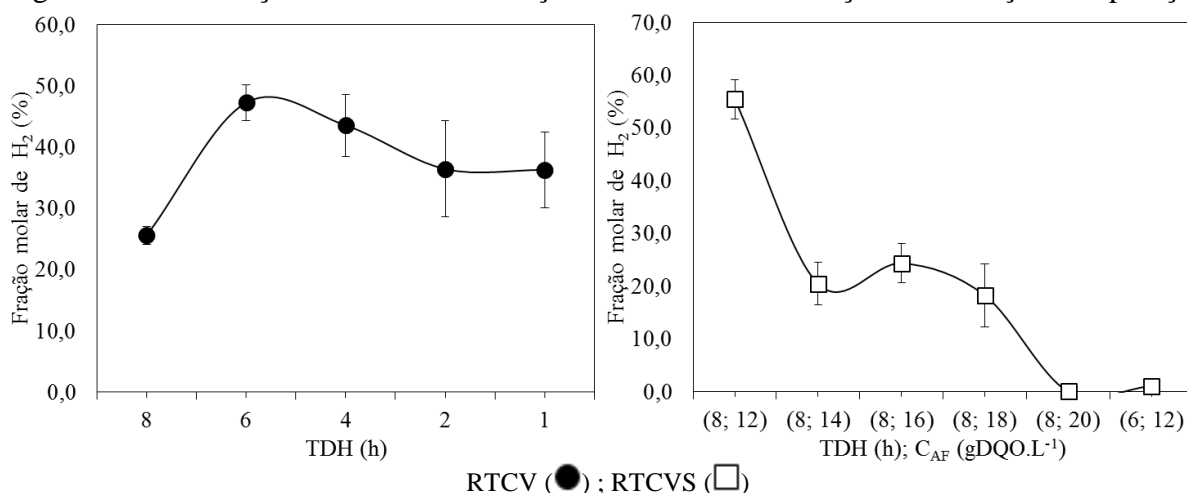
| Reator | TDH (h) | DQO (g.L ⁻¹) | SST (mg.L ⁻¹) | SSV (mg.L ⁻¹) | SSF (mg.L ⁻¹) | SSV (%) | SSF (%) |
|--------|---------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------|---------|
| RTCV | 8 | 10 | 646 | 572 | 74 | 88,6 | 11,4 |
| | 6 | 10 | 510 | 427 | 83 | 83,7 | 16,3 |
| | 4 | 10 | 491 | 417 | 75 | 84,8 | 15,2 |
| | 2 | 10 | 437 | 376 | 61 | 86,1 | 13,9 |
| | 1 | 10 | 461 | 418 | 43 | 90,7 | 9,3 |
| RTCVS | 8 | 12 | 572 | 505 | 67 | 88,3 | 13,3 |
| | 8 | 14 | 597 | 535 | 62 | 89,7 | 11,5 |
| | 8 | 16 | 770 | 670 | 100 | 87,0 | 14,9 |
| | 8 | 18 | 1063 | 938 | 125 | 88,2 | 13,3 |
| | 8 | 20 | 1208 | 1078 | 130 | 89,2 | 12,1 |
| | 6 | 12 | 1322 | 1208 | 114 | 91,4 | 9,4 |

Os valores médios do conteúdo de hidrogênio observado no biogás dos reatores em função da concentração afluente e do TDH são apresentados na Tabela 5.25. As variações dos valores de composição do biogás produzido função do TDH e das relações de cofermentação são ilustradas na Figuras 5.24.

Tabela 5.26 – Valores médios de fração molar de H₂ nos experimentos de co-digestão

| RTCVC | | RTCVCs | | |
|---------|--------------------|---------|------------------------------|--------------------|
| TDH (h) | H ₂ (%) | TDH (h) | DQO V:S (g.L ⁻¹) | H ₂ (%) |
| 8 | 25,6 ± 1,5 | 8 | 10:02 | 55,5 ± 3,7 |
| 6 | 47,3 ± 2,9 | 8 | 10:04 | 20,4 ± 4,0 |
| 4 | 43,6 ± 5,1 | 8 | 10:06 | 24,3 ± 3,8 |
| 2 | 36,4 ± 7,8 | 8 | 10:08 | 18,2 ± 6,0 |
| 1 | 36,3 ± 6,2 | 8 | 10:10 | 0 |
| - | - | 6 | 10:02 | 1,1 ± 0,3 |

Figura 5.24 – Variação dos valores de fração molar de H₂ em função da condição de operação



Em ambos os casos não foi observada produção de metano no biogás, demonstrando a efetividade do tratamento térmico do lodo. Com a redução do TDH de 8h para 1h no reator RTCV, os valores médios do conteúdo de hidrogênio mantiveram-se elevados e constantes entre $25,9 \pm 3,2\%$ e $47,0 \pm 3,5\%$. O valor máximo de fração de hidrogênio de $47,0 \pm 3,5\%$ para o reator RTCV foi obtido no TDH de 6h.

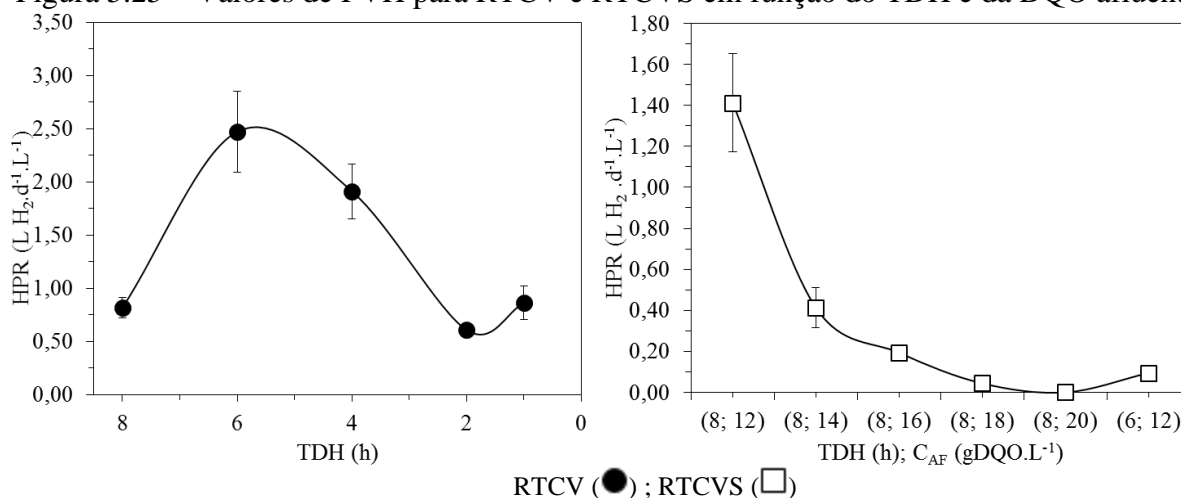
No reator RTCVS, com o aumento da concentração de soro na co-digestão com a vinhaça de 2g DQO.L^{-1} para 10g DQO.L^{-1} , os valores de conteúdo de hidrogênio foram reduzidos de $52,0 \pm 4,6\%$, na relação vinhaça:soro de $10:02\text{g.L}^{-1}$, até não ser observada a produção de hidrogênio na relação vinhaça:soro de $10:10\text{g.L}^{-1}$. O aumento do TDH de 8h para 6h reduziu a fração molar de hidrogênio de $52,0 \pm 4,6\%$ para $1,1 \pm 0,3\%$.

A produtividade volumétrica de hidrogênio nas diferentes relações de vinhaça:soro e TDH é apresentada na Tabela 5.27 e ilustrada na Figura 5.25. Os valores observados no RTCV com a redução do TDH foram crescentes até o TDH de 6h, com valor de produtividade máxima encontrado de $2,50 \pm 0,62\text{ L H}_2\text{.d}^{-1}\text{.L}^{-1}$. Com a redução do TDH para valores inferiores a 6h.

Tabela 5.27 – Variação dos valores de PVH na co-digestão de vinhaça com soro de queijo

| RTCVC | | RTCVS | | |
|-------|---|-------|--------------------------|---|
| TDH | PVH | TDH | DQO | PVH |
| (h) | (L H ₂ .d ⁻¹ .L ⁻¹) | (h) | V:S (g.L ⁻¹) | (L H ₂ .d ⁻¹ .L ⁻¹) |
| 8 | 0,84 ± 0,10 | 8 | 10:02 | 1,41 ± 0,24 |
| 6 | 2,54 ± 0,39 | 8 | 10:04 | 0,41 ± 0,10 |
| 4 | 1,97 ± 0,26 | 8 | 10:06 | 0,19 ± 0,04 |
| 2 | 0,63 ± 0,04 | 8 | 10:08 | 0,04 ± 0,03 |
| 1 | 0,89 ± 0,16 | 8 | 10:10 | 0 |
| - | - | 6 | 10:02 | 0,09 ± 0,01 |

Figura 5.25 – Valores de PVH para RTCV e RTCVS em função do TDH e da DQO afluyente



Por outro lado, a produtividade volumétrica observada para o RTCVS reproduziu o perfil observado com os valores do conteúdo de hidrogênio no biogás. Com relação vinhaça:soro de 10:02g.L⁻¹, o valor máximo de produtividade de hidrogênio de 1,41 ± 0,24L H₂.d⁻¹.L⁻¹ foi observado. Ao aumentar a concentração de soro a produtividade foi reduzida até não observar PVH na relação vinhaça:soro de 10:10g.L⁻¹, com valor mínimo de 0,04 ± 0,03L H₂.d⁻¹.L⁻¹ obtido na relação vinhaça:soro de 10:08g.L⁻¹. A redução do TDH de 8h para 6h depreciou os valores de PVH de 1,41 ± 0,24L H₂.d⁻¹.L⁻¹ para 0,09 ± 0,01L H₂.d⁻¹.L⁻¹.

Resultados similares foram obtidos por Ferraz Júnior *et al.* (2014) ao avaliarem o efeito da taxa de carregamento orgânico na produção termofílica de hidrogênio em reatores de leito fixo nos valores de TDH entre 24 a 8h, correspondendo a valores de TCO entre 36,2 a 108,8 kg DQO.m⁻³.dia⁻¹. O valor máximo de PVH de 1023 mL H₂.d⁻¹.L⁻¹ foi obtido no valor de TDH de 12h, correspondendo a TCO de 72,4kg DQO.m⁻³.dia⁻¹. Ao aumentar a TCO para o valor de 108,6kg DQO.m⁻³.dia⁻¹, com redução do TDH para 8h, a produtividade de hidrogênio obtida foi reduzida em 42,8%.

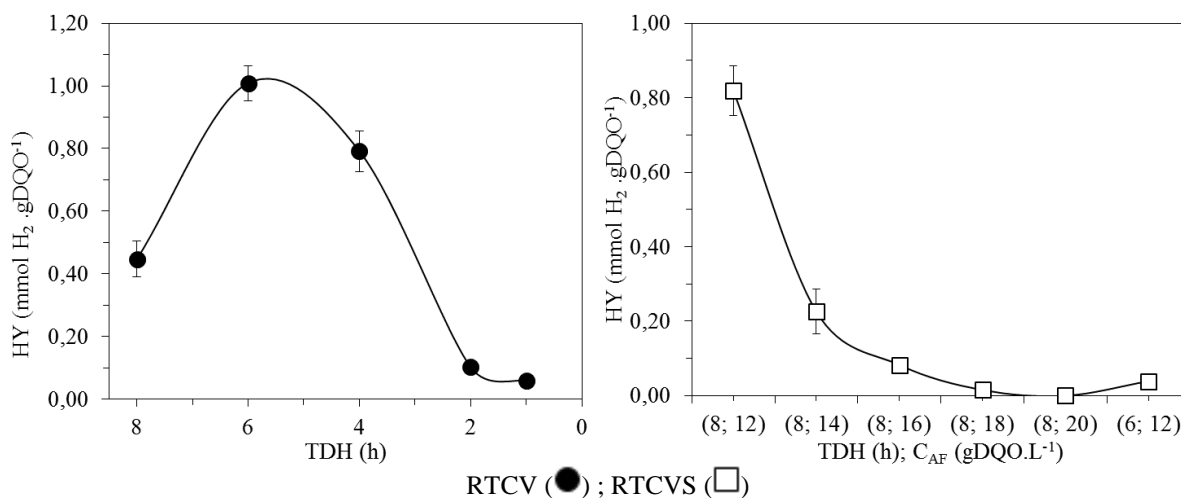
Os valores de rendimento de hidrogênio obtidos nos experimentos de co-digestão estão apresentados na Tabela 5.28 e na Figura 5.26. No reator RTCV com a redução do TDH de 8

para 6h e consequente aumento da TCO de 30 para 40kg DQO.m⁻³.d⁻¹ o rendimento de hidrogênio foi favorecido. O maior valor de rendimento de hidrogênio de 1,03 ± 0,37mmol H₂.g DQO⁻¹ foi observado no TDH de 6h. Entretanto, com o aumento da TCO para valores acima de 60kg DQO.m⁻³.d⁻¹ o rendimento de hidrogênio foi reduzido para 0,06 ± 0,01mmol H₂.g DQO⁻¹, observado no TDH de 1h.

Tabela 5.28 – Valores médios HY para RTCV e RTCVS

| RTCV | | | RTCVS | | | |
|------|---|--|-------|--------------------------|---|--|
| TDH | TCO | HY | TDH | DQO | TCO | HY |
| (h) | (kgDQO.m ⁻³ .d ⁻¹) | (mmol H ₂ .gDQO ⁻¹) | (h) | V:S (g.L ⁻¹) | (kgDQO.m ⁻³ .d ⁻¹) | (mmol H ₂ .gDQO ⁻¹) |
| 8 | 30 | 0,45 ± 0,06 | 8 | 10:02 | 36 | 0,82 ± 0,07 |
| 6 | 40 | 1,01 ± 0,06 | 8 | 10:04 | 42 | 0,23 ± 0,06 |
| 4 | 60 | 0,79 ± 0,07 | 8 | 10:06 | 48 | 0,08 ± 0,02 |
| 2 | 120 | 0,1 ± 0,01 | 8 | 10:08 | 54 | 0,02 ± 0,01 |
| 1 | 240 | 0,06 ± 0,01 | 8 | 10:10 | 60 | 0 |
| - | - | - | 6 | 10:02 | 48 | 0,04 ± 0,01 |

Figura 5.26 – Valores de HY para RTCV e RTCVS em função do TDH e da DQO afluente



Ao avaliar o efeito da relação vinhaça:soro de queijo no reator RTCVS, o valor máximo de rendimento de hidrogênio foi de 0,82 ± 0,07mmol H₂.g DQO⁻¹ na TCO de 36 kg DQO.m⁻³.d⁻¹. A partir do aumento da concentração de soro de queijo de 2g DQO.L⁻¹ para 10g DQO.L⁻¹ o rendimento de hidrogênio foi reduzido até não ser observada produção de hidrogênio. Observa-se que a aplicação de maiores concentrações de soro de queijo depreciou a produção de hidrogênio. Possivelmente o aumento da concentração de soro na vinhaça desbalanceou a relação DQO:N, com a disponibilidade de mais carboidratos sem o aumento das fontes de nitrogênio. Com a redução do TDH de 8h para 6h o rendimento de hidrogênio foi reduzido de 0,82 ± 0,07mmol H₂.g DQO⁻¹ para 0,04 ± 0,01mmol H₂.g DQO⁻¹.

Similarmente, Similarmente, Santos *et al* (2014b) utilizaram dois reatores de leito fluidizado termofílico (55°C) reduzindo o TDH de 6 a 1h, com conseqüente aumento da taxa de carregamento orgânico de 60 para 360kg DQO.m⁻³.dia⁻¹ (15gDQO.L⁻¹) e de 80 para 480kg DQO.m⁻³.dia⁻¹ (20gDQO.L⁻¹). Com este aumento da TCO, o rendimento de hidrogênio foi reduzido, com valores máximos de 2,23mmol H₂. g DQO_{ap}⁻¹ (15gDQO.L⁻¹) e de 1,85mmol H₂. g DQO_{ap}⁻¹ (20gDQO.L⁻¹) observados no TDH de 6h. Estes resultados indicaram que a produção de hidrogênio foi realizada sobre condições de sobrecarga orgânica no reator. Santos *et al.* (2014c) também observaram resultando em sobrecarga de reatores RALF termofílicos (55°C) na produção contínua de hidrogênio, com concentrações afluentes de vinhaça de 10.000mgDQO.L⁻¹ e de 30.000mgDQO.L⁻¹, reduzindo o TDH de operação de 6 para 1h.

Buscando comparar os resultados obtidos com a literatura, a Tabela 5.29 apresenta os valores de rendimento e produtividade de hidrogênio obtidos no RTCV, no RTCVS e em outros estudos utilizando vinhaça.

Tabela 5.29 – Valores de HY, PVH e TDH ótimos em trabalhos com vinhaça

| Referências | Reator | TDH _{ótimo} (h) | HY (mmol H ₂ .g DQO ⁻¹) | PVH (mL H ₂ .L ⁻¹ .dia ⁻¹) |
|--|---------------|-----------------------------|---|---|
| Searmsirimongkol <i>et al.</i> (2011) | AnSBR | 16 | 7,7 | 3310 |
| Ferraz Júnior <i>et al.</i> (2014) | Leito fixo | 12 | 0,77 | 1023 |
| Santos <i>et al.</i> (2014a) | RALF | 4 | 5,73 | 18720 |
| Este estudo | RTCV | 6 | 1,11 | 2540 |
| | RTCVS | 8 | 0,82 | 1410 |

Observa-se que os resultados apresentados neste estudo são similares aos apresentados por Ferraz Júnior *et al.* (2014). Neste estudo foram utilizados 4 reatores de leito fixo operando a 55°C e em valores de TDH entre 24 a 8h, correspondendo a valores de TCO entre 36,2 a 108,8 kg DQO.m⁻³.dia⁻¹. A conversão de matéria orgânica resultou na produção dos ácidos acético, butírico e propiônico. Os valores máximos de produtividade e de rendimento de hidrogênio de 1023 mL H₂.d⁻¹.L⁻¹ e 2,4 mol H₂.mol carboidrato⁻¹ (0,7 mmol H₂.g DQO⁻¹) foram obtidos no valor de TDH de 12h, correspondendo a TCO de 72,4kg DQO.m⁻³.dia⁻¹. Ao aumentar a TCO para o valor de 108,6kg DQO.m⁻³.dia⁻¹, o rendimento e a produtividade de hidrogênio obtidos foram reduzidos em 63,9% e 42,8%, respectivamente. Ao compilar os

dados de biologia molecular observou-se que o número de cópias de Fe-hidrogenase foi máximo na condição de maior rendimento de hidrogênio e a principal sequência genética foi 99% similar a *Thermoanaerobacterium*.

Os resultados apresentados por Santos *et al.* (2014a) utilizando RALF termofílico com a estratégia de cofermentação de vinhaça com glicose são superiores aos apresentados pelos reatores RTCV e RTCVS. Neste caso, o rendimento máximo de 5,73 mmol H₂.g DQO⁻¹ foi obtido no TDH de 4h com 33% de glicose e 67% de vinhaça. Por ser um substrato simples de fácil conversão, a utilização de glicose possibilitou a obtenção de rendimentos maiores de hidrogênio que aqueles observados nos reatores RTCV e RTCVS.

A quantificação dos metabólitos líquidos produzidos no RALF, como os ácidos orgânicos voláteis e alcoóis é ilustrada na Figura 5.27 para o reator RTCV e na Figura 5.28 para o reator RTCVS na forma de distribuição dos principais produtos observados no efluente do reator nas diferentes condições de operação. Na Tabela 5.30 são apresentados os valores de concentração média e fração molar de cada componente.

Figura 5.27 – Distribuição dos principais metabólitos observados nos efluentes do RTCV

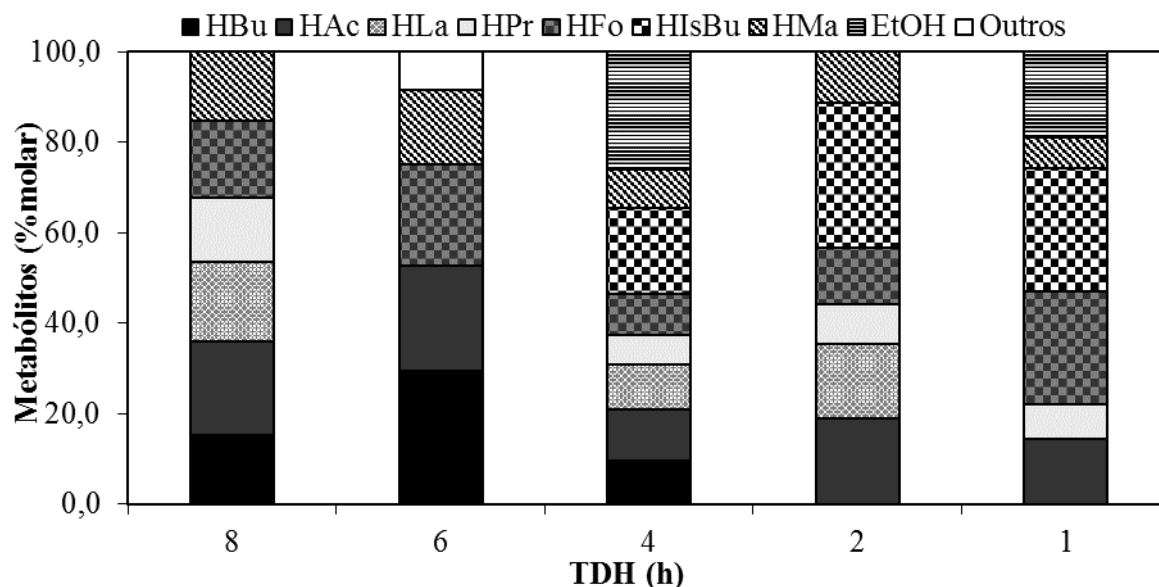


Figura 5.28 – Distribuição dos principais metabólitos observados nos efluentes do RTCVS

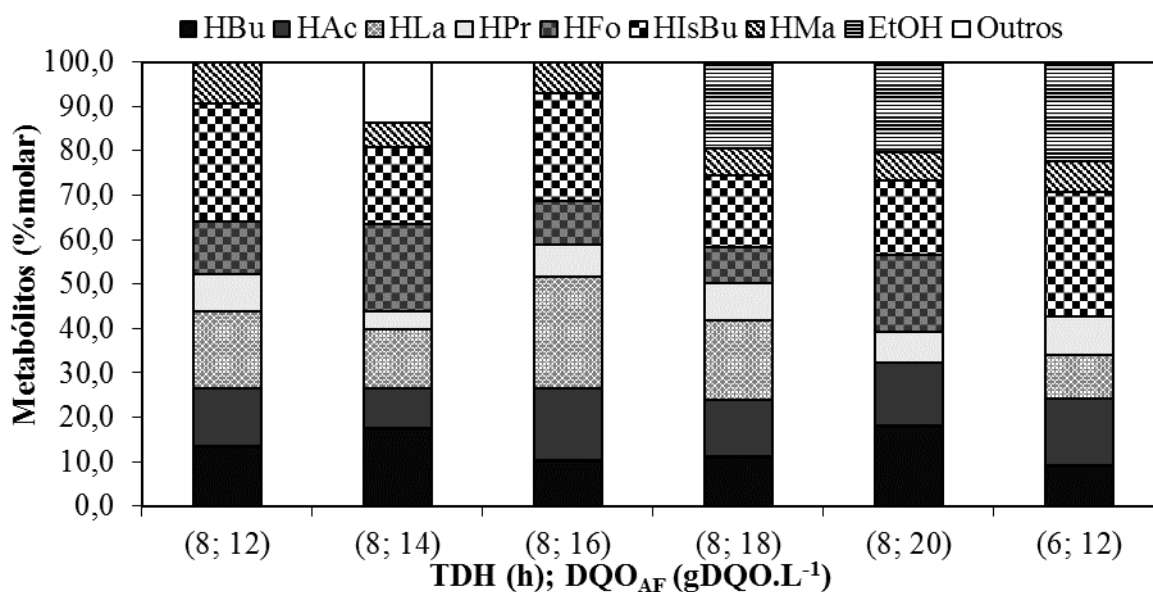


Tabela 5.30 – Principais metabólitos observados nos reatores RTCV e RTCVS

| | | RTCV | | | | | | | | | | | | | |
|---------|------------------------------|-----------------------|------|-----------------------|------|-----------------------|------|-----------------------|------|-----------------------|------|-----------------------|------|--|--|
| TDH (h) | DQO (g.L ⁻¹) | HBu | | HIsBu | | HAc | | HPr | | HLa | | EtOH | | HY (mmolH ₂ .gDQO _{ap} ⁻¹) | PVH ₂ (L.d ⁻¹ .L ⁻¹) |
| | | (mg.L ⁻¹) | (%) | (mg.L ⁻¹) | (%) | (mg.L ⁻¹) | (%) | (mg.L ⁻¹) | (%) | (mg.L ⁻¹) | (%) | (mg.L ⁻¹) | (%) | | |
| 8 | 10 | 1288 ± 65 | 51,5 | 0,0 | 0,0 | 1164 ± 129 | 20,4 | 983 ± 124 | 14,0 | 1519 ± 78 | 17,8 | 0 | 0 | 0,45 ± 0,06 | 0,84 ± 0,10 |
| 6 | 10 | 2004 ± 153 | 30,4 | 0,0 | 0,0 | 1077 ± 8 | 23,3 | 0 | 0,0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1,01 ± 0,06 | 2,54 ± 0,39 |
| 4 | 10 | 783 ± 68 | 32,9 | 1533 ± 133 | 18,8 | 637 ± 61 | 11,5 | 443 ± 205 | 6,5 | 813 ± 123 | 9,8 | 1106 ± 75 | 26 | 0,79 ± 0,07 | 1,97 ± 0,26 |
| 2 | 10 | 0 | 0,0 | 2390 ± 104 | 32,2 | 961 ± 195 | 19,0 | 562 ± 131 | 9,0 | 1237 ± 49 | 16,3 | 0 | 0 | 0,1 ± 0,01 | 0,63 ± 0,04 |
| 1 | 10 | 0 | 0,0 | 2195 ± 159 | 27,3 | 784 ± 28 | 14,3 | 527 ± 73 | 7,8 | 0 | 0 | 800 ± 95 | 19 | 0,06 ± 0,01 | 0,89 ± 0,16 |
| | | RTCVS | | | | | | | | | | | | | |
| TDH (h) | DQO V:S (g.L ⁻¹) | HBu | | HIsBu | | HAc | | HPr | | HLa | | EtOH | | HY (mmolH ₂ .gDQO _{ap} ⁻¹) | PVH ₂ (L.d ⁻¹ .L ⁻¹) |
| | | (mg.L ⁻¹) | (%) | (mg.L ⁻¹) | (%) | (mg.L ⁻¹) | (%) | (mg.L ⁻¹) | (%) | (mg.L ⁻¹) | (%) | (mg.L ⁻¹) | (%) | | |
| 8 | 10:02 | 693 ± 35 | 13,5 | 1357 ± 70 | 26,5 | 456 ± 21 | 13,0 | 368 ± 111 | 8,5 | 905 ± 60 | 17,2 | 0 | 0 | 0,82 ± 0,07 | 1,41 ± 0,24 |
| 8 | 10:04 | 1573 ± 689 | 17,5 | 1555 ± 162 | 17,3 | 560 ± 73 | 9,2 | 301 ± 19 | 4,0 | 1209 ± 487 | 13,2 | 0 | 0 | 0,23 ± 0,06 | 0,41 ± 0,10 |
| 8 | 10:06 | 1145 ± 447 | 10,5 | 2645 ± 314 | 24,2 | 1193 ± 117 | 16,0 | 653 ± 221 | 7,1 | 2817 ± 251 | 25,2 | 0 | 0 | 0,08 ± 0,02 | 0,19 ± 0,04 |
| 8 | 10:08 | 1166 ± 345 | 11,3 | 1659 ± 133 | 16,0 | 899 ± 131 | 12,8 | 715 ± 112 | 8,2 | 1891 ± 83 | 17,9 | 1056 ± 96 | 19,5 | 0,02 ± 0,01 | 0,04 ± 0,03 |
| 8 | 10:10 | 2394 ± 189 | 18,2 | 2217 ± 50 | 16,9 | 1273 ± 89 | 14,2 | 751 ± 112 | 6,8 | 0 | 0 | 1400 ± 119 | 20,4 | 0 | 0 |
| 6 | 10:02 | 545 ± 36 | 9,1 | 1673 ± 33 | 28,1 | 615 ± 96 | 15,1 | 433 ± 8 | 8,7 | 593 ± 24 | 9,7 | 700 ± 63 | 22,5 | 0,04 ± 0,01 | 0,09 ± 0,01 |

Observa-se no reator RTCV que com a redução do TDH de 8h para 6h a produção de butirato e acetato foi favorecida, com porcentagens máximas de 23,3% e 29,5%, respectivamente. Entretanto, a redução do TDH para valores menores reprimou estas rotas de produção de hidrogênio, caracterizando a produção de ácidos isobutírico, etanol e ácido fórmico.

Resultados similares foram observados por Santos *et al.* (2014 b) utilizando dois RALF para produção de hidrogênio a partir de vinhaça em concentrações de 10g DQO.L⁻¹ e 30g DQO.L⁻¹. Os autores observaram que o aumento da taxa de carregamento orgânico (TCO) reduziu o HY devido a inibição por elevadas concentrações de vinhaça contendo elevadas concentrações de compostos tóxicos. Ao comparar ambos os reatores no mesmo TDH observa-se que a adição de soro de queijo (2 g DQO.L⁻¹) na vinhaça aumentou a H₂%, HPR

and HY em 117%, 68% e 82% respectivamente.

Por outro lado o aumento da concentração de soro afluyente favoreceu a produção de ácido láctico, isobutírico e etanol, que são metabólitos não diretamente associados a produção de hidrogênio. Possivelmente, a variação da relação DQO:N ocasionou na mudança para rotas não produtoras de hidrogênio. Intanoo *et al.* (2012) avaliando as relações DQO, nitrogênio e fósforo na produção de hidrogênio em reator AnSBR termofílico, observaram o maior rendimento de hidrogênio ($5,73 \text{ mmol H}_2.\text{gCOD}^{-1}$) na relação DQO:N:P de 100:6:0,5 na TCO de $68\text{kg DQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$. A elevação da TCO para $79\text{kg DQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ ocasionou no aumento da produção de etanol e propionato, reduzindo a produção de hidrogênio.

5.5 Considerações Finais sobre as Melhores Condições Operacionais Observadas para a Produção de Hidrogênio

Após a observação dos resultados das diferentes condições de operação dos reatores anaeróbios para produção de hidrogênio, identificam-se faixas ótimas de parâmetros que são similares e outras que específicas para cada reator. Na Figura 5.29 são ilustrados os valores máximos de HY ($\text{mmol H}_2 \cdot \text{g DQO}^{-1}$) e de produtividade de hidrogênio ($\text{L H}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$) obtidos para cada um dos reatores. Nas tabelas 5.31 e 5.32 os resultados de rendimento, produtividade de hidrogênio e condições de operação ótimos de todos os reatores.

Figura 5.29 – Rendimento e produtividade ótimos para cada reator

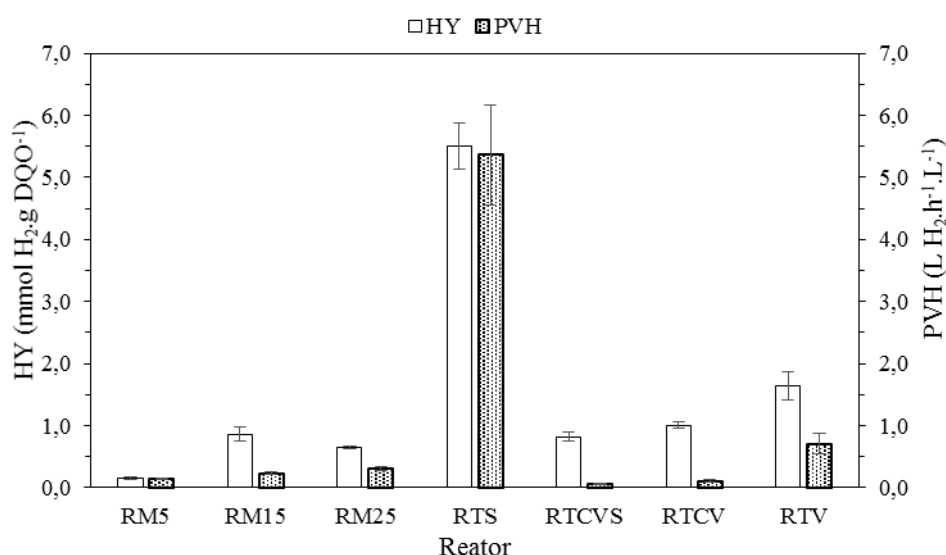


Tabela 5.31 – Valores ótimos de rendimento de hidrogênio

| Reator | RM5 | RM15 | RM25 | RTS | RTCVS | RTCV | RTV |
|---|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| HY ($\text{mmol H}_2 \cdot \text{g DQO}_{\text{ad}}^{-1}$) | 0,16 ± 0,02 | 0,86 ± 0,11 | 0,64 ± 0,02 | 5,51 ± 0,37 | 0,82 ± 0,07 | 1,01 ± 0,06 | 1,64 ± 0,22 |
| H ₂ (%) | 39,6 ± 3,5 | 24,5 ± 3,9 | 26,7 ± 0,8 | 50,0 ± 1,1 | 55,5 ± 3,7 | 47,3 ± 2,9 | 42,4 ± 2,8 |
| HAc (%) | 44,2 | 37,3 | 32,6 | 37 | 13 | 23,3 | 4 |
| HBu (%) | 25,1 | 46,3 | 23,7 | 40 | 13,5 | 30,4 | 37 |
| TDH (h) | 0,25 | 4 | 4 | 4 | 8 | 6 | 4 |
| DQO ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) | 7,2 | 22 | 36 | 13 | 12 | 10 | 10 |
| TCO ($\text{kg DQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$) | 691 | 133 | 216 | 78 | 36 | 40 | 60 |
| Temperatura (°C) | 30 | 30 | 30 | 65 | 55 | 55 | 55 |

O maior valor de rendimento de hidrogênio de $5,51 \pm 0,37 \text{ mmol H}_2 \cdot \text{g DQO}^{-1}$ foi obtido pelo reator RTS na TCO de $78 \text{ kg DQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$, com TDH de 4 h, DQO afluente de $13 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ na temperatura de 65°C . Os valores de rendimento foram decrescentes para a seguinte ordem: $\text{RTS} > \text{RTV} > \text{RTCV} > \text{RM15} > \text{RTCVS} > \text{RM25} > \text{RM5}$. Os maiores valores de rendimento foram obtidos nos valores de TCO entre 36 e $133 \text{ kg DQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$, no TDH de 4h, favorecendo a produção de acetato e butirato acima de 40% dos metabólitos produzidos.

Tabela 5.32 – Valores ótimos de produtividade de hidrogênio

| Reator | RM5 | RM15 | RM25 | RTS | RTCVS | RTC | RTV |
|--|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| PVH ₂ (L.h ⁻¹ .L ⁻¹) | 0,15 ± 0,01 | 0,23 ± 0,02 | 0,31 ± 0,03 | 5,36 ± 0,81 | 0,06 ± 0,01 | 0,11 ± 0,02 | 0,71 ± 0,16 |
| H ₂ (%) | 39,6 ± 3,5 | 24,5 ± 3,9 | 26,7 ± 0,8 | 55,5 ± 2,3 | 55,5 ± 3,7 | 47,3 ± 2,9 | 61,9 ± 4,2 |
| HAc (%) | 44,2 | 37,3 | 32,6 | 33 | 13 | 23,3 | 16 |
| HBu (%) | 25,1 | 46,3 | 23,7 | 24 | 13,5 | 30,4 | 17 |
| TDH (h) | 0,25 | 4 | 4 | 0,5 | 8 | 6 | 0,5 |
| DQO (g.L ⁻¹) | 7,2 | 22 | 36 | 13 | 12 | 10 | 10 |
| TCO (kg DQO.m ⁻³ .d ⁻¹) | 691 | 133 | 216 | 625 | 36 | 40 | 480 |
| Temperatura (°C) | 30 | 30 | 30 | 55 | 55 | 55 | 55 |

O maior valor de produtividade de hidrogênio de $5,36 \pm 0,81 \text{ L H}_2\text{.h}^{-1}\text{.L}^{-1}$ foi obtido pelo reator RTS na TCO de $625 \text{ kg DQO.m}^{-3}\text{.d}^{-1}$, com TDH de 0,5 h, DQO afluente de 13g.L^{-1} na temperatura de 55°C. Os valores de produtividade foram decrescentes para a seguinte ordem: $\text{RTS} > \text{RTV} > \text{RM25} > \text{RM15} > \text{RM5} > \text{RTC} > \text{RTCVS}$. Os maiores valores de produtividade foram obtidos nos valores de TCO entre 133 e 691 $\text{kg DQO.m}^{-3}\text{.d}^{-1}$, nos valores de TDH entre 4h e 0,5h, favorecendo a produção de acetato e butirato acima de 50% dos metabólitos produzidos.

Nos reatores RM5, RM15, RM25, RTCVS e RTCV as condições de operação para rendimento e produtividade foram as mesmas para cada reator. Por outro lado, para os reatores RTS e RTV a condição de rendimento ótimo foi obtido nos valores de TCO de 78 e 60 $\text{kg DQO.m}^{-3}\text{.d}^{-1}$, respectivamente. Observa-se para estes casos que os valores de rendimento de hidrogênio ótimos foram obtidos em valores de TCO mais reduzidos em valores de TDH maiores que 4h, com excessão do RM5. Com o aumento da TCO, os rendimentos de hidrogênio foram reduzidos devido a sobrecarga de substrato. Apenas as produtividades de hidrogênio dos reatores RTS e RTV foram elevadas com o aumento da TCO devido ao favorecimento da comunidade microbiana na temperatura termofílica com estes substratos.

É possível observar que a temperatura termofílica com soro de queijo obteve melhores resultados de rendimento e de produtividade devido a seleção de uma comunidade produtora de hidrogênio mais eficiente nesta temperatura, evidenciado pela produção de 33% de acetato na TCO de $625\text{kg DQO.m}^{-3}\text{.d}^{-1}$ em valor reduzido de TDH.

Os valores de produtividades e rendimentos de hidrogênio obtidos com soro de queijo foram maiores que as obtidas com vinhaça em valores de TCO mais elevados. Com soro de queijo a rota acética teve maior preferência, enquanto que a rota butírica foi favorecida para a vinhaça. Este perfil pode ser explicado devido a maior complexidade da vinhaça como fonte de carbono em relação ao soro de queijo.

Ao comparar os resultados da co-fermentação de soro de queijo com vinhaça e os resultados observados com a fermentação separada destes substratos, observa-se que a co-fermentação obteve seus melhores resultados com valores de TDH maiores. Desta forma, ao co-fermentar ambos substratos, a complexidade da fonte de carbono para a comunidade microbiana foi elevada, sendo necessário maior tempo de contato entre os microrganismos e os substratos.

6. Conclusões

Diante dos resultados obtidos neste estudo é possível concluir de o desempenho da produção mesofílica de hidrogênio a partir de soro de queijo em reator EGSB é influenciado pelo aumento da concentração do soro e pela redução de TDH. Com a redução dos valores de TDH o conteúdo de hidrogênio, rendimento e produtividade foram favorecidos em todas as concentrações até atingirem suas condições ótimas. Na concentração de 5g lactose.L⁻¹, a condição ótima foi obtida no TDH de 0,25h com produtividade máxima de $0,151 \pm 0,013$ L H₂.h⁻¹.L⁻¹, rendimento máximo de $0,163 \pm 0,017$ mmol H₂.g DQO⁻¹ e conteúdo máximo de hidrogênio de $39,6 \pm 3,5\%$. Neste caso, a produção de hidrogênio pela rota acetogênica foi favorecida pela redução do TDH, aumentando a porcentagem de acetato. No reator alimentado com a concentração de 15g lactose.L⁻¹, o valor ótimo de TDH de 4h, com rendimento máximo de $0,856 \pm 0,106$ mmol H₂.g DQO⁻¹, produtividade máxima de $0,228 \pm 0,024$ L H₂.h⁻¹.L⁻¹ e conteúdo máximo de hidrogênio de $24,5 \pm 3,9\%$. Por fim, a condição ótima para produção de hidrogênio na concentração afluente de 25g lactose.L⁻¹ foi observada no TDH de 4h com produtividade máxima de $0,312 \pm 0,026$ L H₂.h⁻¹.L⁻¹, rendimento máximo de $0,638 \pm 0,023$ mmol H₂.g DQO⁻¹ e conteúdo máximo de hidrogênio de $37,5 \pm 3,1\%$. Nestes reatores de concentração mais elevada a rota butírica prevaleceu como a principal rota de produção de hidrogênio.

A temperatura mostrou ser um fator capaz de alterar a produção termofílica de hidrogênio em RALF com soro de queijo e com vinhaça. No reator com soro de queijo, a redução do TDH e o aumento da temperatura foram benéficos a produção de hidrogênio até atingir suas condições ótimas no TDH de 4h e temperatura de 65°C, com rendimento máximo de $5,51$ mmol H₂.g DQO⁻¹. Neste caso a produção de hidrogênio por intermédio da rota acética e da rota butírica foi favorecida, reprimindo a produção de lactato. A produtividade e o conteúdo de hidrogênio obtiveram valores máximos de $5,36 \pm 0,81$ L H₂.h⁻¹.L⁻¹ e $55,5 \pm 2,3\%$. No RALF alimentado com vinhaça de cana de açúcar, a redução do TDH auxiliou a produção de hidrogênio, com rendimento máximo de $5,51$ mmol H₂.g DQO⁻¹ no TDH de 4h e com produtividade máxima de $0,71 \pm 0,16$ L H₂.h⁻¹.L⁻¹ no TDH de 0,5h. Entretanto, o aumento da temperatura reduziu a produção de hidrogênio devido a dificuldade de adaptação da comunidade, originalmente a 55°C, a temperaturas mais altas consumindo vinhaça como substrato.

A co-digestão de vinhaça com soro de queijo foi satisfatória com relação à viabilidade da produção de hidrogênio em RALF em condições termofílicas. A composição ótima do substrato foi obtida com 10g DQO.L⁻¹ de vinhaça e 2gDQO.L⁻¹ de soro de leite, com produtividade máxima de 1,41 ± 0,24L H₂.h⁻¹.L⁻¹, rendimento máximo de 0,82 ± 0,07mmol H₂.g DQO⁻¹ e conteúdo máximo de 55,5 ± 3,7%. O aumento da concentração de soro de queijo e a redução do TDH causaram redução nos valores de PVH, H₂% e HY até não ser mais observado hidrogênio. No caso do TDH uma possível sobrecarga de substrato ocorreu. Com o aumento da concentração de soro de queijo possivelmente a relação DQO:N foi desbalanceada, mudando as rotas metabólicas preferenciais. Observou-se maiores concentrações de acetato e butirato no TDH de 8h com concentração de 12g DQO.L⁻¹. Com o aumento da concentração e do TDH, a produção de ácido isobutírico, láctico e etanol foram favorecidas, justificando a não produção de H₂.

7. Sugestões

A partir dos resultados obtidos neste estudo, sugere-se para pesquisas posteriores e complementares a esta:

- Avaliar a produção contínua de metano em sistema simples (reator metanogênico) e em sistema seqüencial (reator acidogênico associado a reator metanogênico) a partir de vinhaça de cana de açúcar ou soro de queijo nas faixas mesofílicas e termofílicas;
- Avaliar a produção contínua de hidrogênio a partir da vinhaça de etanol de segunda geração;
- Analisar o fenômeno de granulação do leito de reatores EGSB após adaptação da comunidade para produção de grânulos adaptados a condições termofílicas de produção de hidrogênio;
- Avaliar em ensaios celulares in situ os efeitos inibitórios causados às cepas microbianas devido a produção de toxinas por bactérias lácticas em reatores EGSB;
- Avaliar a adaptação de diferentes fontes de inóculo a faixas de temperatura mesofílica, termofílica e hipertermofílica para produção de hidrogênio a partir de soro de queijo ou vinhaça;

8. Referências Bibliográficas

- Azbar, N.; Dokgöz, F.T.Ç.; Keskin, T.; Korkmaz, K.S.; Syed, H.M. (2009) Continuous Fermentative Hydrogen Production from Cheese Whey Wastewater under Thermophilic Anaerobic Conditions, *International Journal of Hydrogen Energy*, **34**, 7441-7447.
- Barca, C.; Soric, A.; Ranava, D.; Giudici-Ortoni, M.; Ferrasse, J. (2015) Anaerobic Biofilm Reactors for Dark Fermentative Hydrogen Production from Wastewater: a Review, *Bioresource Technology*, **185**, 386-398.
- BRASIL. Ministério de Minas e Energia. Secretaria de Planejamento e Desenvolvimento Energético. Núcleo de Estudos Estratégicos de Energia (2015). Boletim Mensal de Energia – Novembro 2015. Acesso [HTTP://www.mme.gov.br/mme](http://www.mme.gov.br/mme)
- Calli, B.; Schoenmaekers, K.; Vanbroekhoven, K.; Diels, L. (2008) Dark Fermentative H₂ Production from Xylose and Lactose – Effects of On-Line pH Control, *International Journal of Hydrogen Energy*, **33**, 522-530.
- Carvalho, F.; Prazeres, A. R.; Rivas, J. (2013) Cheese Whey Wastewater: Characterization and Treatment, *Science of the Total Environment*, **445 – 446**, 385 – 396.
- Castelló, E.; García y Santos, C.; Iglesias, T.; Paolino, G.; Wenzel, J.; Borzacconi, L.; Etchebehere, C. (2009) Feasibility of Biohydrogen Production from Cheese Whey using a UASB Reactor: Links between Microbial Community and Reactor Performance, *International Journal of Hydrogen Energy*, **34**, 5674-5682.
- Collet, C., Adler, N., Schwitzguébel, J.P., Péringer, P. (2004) Hydrogen Production by *Clostridium thermolacticum* during Continuous Fermentation of Lactose, *International Journal of Hydrogen Energy*, **29**, 1479-1485.

- Christofoletti, C.A.; Escher, J.P.; Correia, E.J.; Marinho, J.F.U.; Fontanetti, C.S. (2013) Sugarcane Vinasse: Environmental Implications of its use, *Waste Management*, **33**, 2752-2761.
- Das, D.; Veziroglu, T.N. (2001) Hydrogen Production by Biological Processes: A Survey of Literature. *International Journal of Hydrogen Energy*, **26**, 13-28.
- Das, D.; Veziroglu, T.N. (2008) Advances in Biological Hydrogen Production Processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, **33**, 6046-6057.
- Davila-Vazquez, G.; Alastriste-Mondragón, F.; León-Rodríguez, A.; Razo-Flores, E. (2008) 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**, 4989-4997.
- Del Nery, V. (1987) Utilização de Lodo Anaeróbio Imobilizado em Gel no Estudo de Partida de Reatores de Fluxo Ascendente com Manta de Lodo. Dissertação de Mestrado EESC/USP, São Carlos – SP.
- Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A.; Smith, F. (1956) Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, **28**, 350-356.
- Fang, H.H.P.; Liu, H. (2002) Effect of pH on Hydrogen Production from Glucose by a Mixed Culture, *Bioresource Technology*, **82**, 87-93.
- Ferchichi, M.; Crabbe, E.; Gil, G.H.; Hintz, W.; Almadidy, A. (2005) Influence of Initial pH on Hydrogen Production from Cheese Whey, *Journal of Biotechnology*, **120**, 402-409.
- Ferraz Júnior, A.D.; Wenzel, J.; Etchebehere, C.; Zaiat, M. (2014) Effect of Organic Loading Rate on Hydrogen Production from Sugarcane Vinasse in Thermophilic Acidogenic Packed Bed Reactors, *International Journal of Hydrogen Energy*, **39**, 16852-16862.
- Fox, P.F.; Guinee, T.P.; Cogan, T.M.; McSweeney, P.L.H.; Fundamentals of Cheese Science. 1st ed. Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, Maryland, 2000.

- Gabardo, S.; Rech, R.; Rosa, C.A.; Ayub, M.A.Z. (2014) Dynamics of Ethanol Production from Whey and Whey Permeate by Immobilized Strains of *Kluyveromyces marxianus* in Batch and Continuous Bioreactors, *Renewable Energy*, **69**, 89-96.
- Gelegenis, J.; Georgakakis, D.; Angelidaki, I.; Vassilis, M. (2007) Optimization of Biogas Production by Co-digesting Whey with Diluted Poultry Manure, *Renewable Energy*, **32**, 2147-2160.
- Gonzalez, B.C.; Spindola, A.L.G.; Lamon, A.W.; Araujo, J.C.; Campos, J.R. (2011) The Use of Microsensors to Study the Role of the Loading Rate and Surface Velocity on the Growing and the Composition of Nitrifying Biofilm, *Water Science and Technology*, **64**, 1607-1613.
- Hallenbeck, P.C. (2009) Fermentative Hydrogen Production: Principles, Progress and Prognosis. *International Journal of Hydrogen Energy*, **34**, 7379-7389.
- Kargi, F.; Eren, N.S.; Ozmihci, S. (2012a) Hydrogen Gas Production from Cheese Whey Powder (CWP) Solution by Thermophilic Dark Fermentation, *International Journal of Hydrogen Energy*, **37**, 2260-2266.
- Kargi, F.; Eren, N.S.; Ozmihci, S. (2012b) Bio-Hydrogen Production from Cheese Whey Powder (CWP) Solution: Comparison of Thermophilic and Mesophilic Dark Fermentations, *International Journal of Hydrogen Energy*, **37**, 8338-8342.
- Kim, S.; Han, S.; Shin, H. (2006) Effect of Substrate Concentration on Hydrogen Production and 16S rDNA-based Analysis of the Microbial Community in a Continuous Fermenter. *Process Biochemistry*, **41**, 199-207.
- Khanal, S.K., Chen, W.H., Li, L., Sung, S. (2004) Biological Hydrogen Production: Effects of pH and Intermediate Products, *International Journal of Hydrogen Energy*, **29**, 1123-1131.

- Kongjan, P.; Angelidaki, I. (2010) Extreme Thermophilic Biohydrogen Production from Wheat Straw Hydrolysate using Mixed Culture Fermentation: Effect of Reactor Configuration, *Bioresource Technology*, **101**, 7789-7796.
- Kunni, D; Levenspiel, O. (1991) Fluidization Engineering, 2nd Ed. Newton, MA, EUA, Butterworth-Heinemann, 490 p.
- Levin, D.B., Pitt, L., Love, M. (2004) Biohydrogen Production: Prospects and Limitations to Practical Application. *International Journal of Hydrogen Energy*, **29**, 173-185.
- Lettinga, G.; Rebac, S.; Zeeman, G. (2001) Challenge of Psychrophilic Anaerobic Wastewater Treatment, *Trends in Biotechnology*, **19(9)**, 363-370.
- Luo, G.; Xie, L.; Zou, Z.; Wang, W.; Zhou, Q. (2010) Exploring Optimal Conditions for Thermophilic Fermentative Hydrogen Production from Cassava Stillage, *International Journal of Hydrogen Energy*, **35**, 6161-6169.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Stahl, D.A., Clark, D.P. (2012) Brock Biology of Microorganisms, San Francisco, Pearson Education.
- Manssour, M.E. (2012) Influência da Carga Orgânica na Produção de Biohidrogênio em ASBBR com Agitação Tratando Água Residuária Sintética, Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Engenharia Hidráulica e Saneamento - Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, São Paulo, 171 p.
- Mohan, S.V.; Babu, V.L.; Sarma, P.N. (2007) Anaerobic Biohydrogen Production from Dairy Wastewater in Sequencing Batch Reactor (AnSBR): Effect of Organic Loading Rate, *Enzyme and Microbial Technology*, **41**, 506-515.
- Moraes, B.S.; Zaiat, M.; Bonomi, A. (2015) Anaerobic Digestion of Vinasse from Sugarcane Ethanol Production in Brazil: Challenges and Perspectives, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **44**, 888-903.

- Muyzer, G., Waal, E.C., Uitterlinden, A.G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturation gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA, *Applied and Environmental Microbiology*, **59**, 695-700.
- Nielsen, T., Liu, W.T., Filipe, C., Grady, L., Molin, S., Stahl, D.A. (1999) Identification of a novel group of bacteria in sludge from a deteriorated biological phosphorus removal reactor, *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 1251-1258.
- Noike, T., Takabatake, H., Mizuno, O., Ohba, M. (2002) Inhibition of Hydrogen Fermentation of Organic Wastes by Lactic Acid Bacteria, *International Journal of Hydrogen Energy*, **27**, 1367-1371.
- Ortega, F.S.; Rocha, K.M.; Zaiat, M.; Pandolfelli, V.C. (2001) Aplicação de espumas cerâmicas produzidas via “gelcasting” em biorreator para tratamento anaeróbio de águas residuárias, *Cerâmica*, **47**, 199-203.
- Ozmihci, S.; Kargi, F. (2007) Kinetics of Batch Ethanol Fermentation of Cheese Whey Powder (CWP) Solution as Function of Substrate and Yeast Concentrations, *Bioresource Technology*, **98**, 2978-2984.
- Prazeres, A.R.; Carvalho, F.; Rivas, J. (2012) Cheese Whey Management: A Review, *Journal of Environmental Management*, **110**, 48-68.
- Qiu, C.; Wen, J.; Jia, X. (2011) Extreme-Thermophilic Biohydrogen Production from Lignocellulosic Bioethanol Distillery Wastewater with Community Analysis of Hydrogen-Producing Microflora, *International Journal of Hydrogen Energy*, **36**, 8243-8251.
- Rosa, P.R.F.; Santos, S.C.; Sakamoto, I.K.; Varesche, M.B.A.; Silva, E.L. (2014) Hydrogen Production from Cheese whey with ethanol-type fermentation: Effect of Hydraulic Retention Time on the Microbial Community Compositon, *International Journal of Hydrogen Energy*, **161**, 10-19.

- Searmsirimongkol, P.; Rangsunvigit, P.; Leethochawalit, M.; Chavadej, S. (2011) Hydrogen Production from Alcohol Distillery Wastewater Containing High Potassium and Sulfate using an Anaerobic Sequencing batch Reactor
- Shilapuram, V.; Krishnaiah, K.; Sai, P.S.T. (2011) Macroscopic Properties of Liquid-Solid Circulating Fluidized Bed with Viscous Liquid Medium, *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, **50**, 42-52.
- Show, K.Y., Lee, D.J., Tay, J.H., Lin, C.Y., Chang, J.S. (2012) Biohydrogen Production: Current Perspectives and the Way Forward. *International Journal of Hydrogen Energy*, **37**, 15616-15631.
- Silva, E.L. Tratamento aeróbio de fenol em reator aeróbio de leito fluidificado trifásico. São Carlos. Tese (Doutorado) SHS-EESC-USP, 1995.
- Sinha, P., Pandey, A. (2011) An Evaluative Report and Challenges for Fermentative Biohydrogen Production. *International Journal of Hydrogen Energy*, **36**, 7460-7478.
- Siso, M.I.G. (1996) The Biotechnological Utilization of Cheese Whey: A Review, *Bioresource Technology*, **57**, 1-11.
- Sreethawong, T.; Chatsiriwatana, S.; Rangsunvigit, P.; Chavadej, S. (2010) Hydrogen Production from Cassava Wastewater using an Anaerobic Sequencing Batch Reactor: Effects of Operational Parameters, COD:N ratio, and Organic Acid Composition, *International Journal of Hydrogen Energy*, **35**, 4092-4102.
- Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (1998) 20th ed. American Public Health Association / American Water Works Association / Water Environment Federation, Washington, DC, USA.
- UNITED STATES OF AMERICA. United States Department of Agriculture. Foreign Agricultural Service (2015). Dairy: World Markets and Trade. Acesso em 20 de fevereiro de 2015 <http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/dairy.pdf>

- Venetsaneas, N.; Antonopoulou, G.; Stamatelatou, K.; Kornaros, M.; Lyberatos, G. (2009) Using Cheese Whey for Hydrogen and Methane Generation in a Two-Stage Continuous Process with Alternative pH Controlling Approaches, *Bioresource Technology*, **100**, 3713-3717.
- Walker, M.; Zhang, Y.; Heaven, S.; Banks, C. (2009) Potential Errors in the Quantitative Evaluation of Biogas Production in Anaerobic Digestion Processes, *Bioresource Technology*, **100**, 6339-6346.
- Wang, J., Wan, W. (2009) Factors Influencing Fermentative Hydrogen Production: A Review. *International Journal of Hydrogen Energy*, **34**, 799-811.
- Wilkie, A.C.; Riedesel, K.J.; Owens, J.M. (2000) Stillage Characterization and Anaerobic Treatment of Ethanol Stillage from Conventional and Cellulosic Feedstocks, *Biomass & Bioenergy*, **19**, 63-102.
- Yang, K., Yu, Y., Hwang, S. (2003) Selective optimization in thermophilic acidogenesis of cheese-whey wastewater to acetic and butyric acids: partial acidification and methanation, *Water Research*, **37**, 2467-2477.
- Yang, P.; Zhang, R.; McGarvey, J.A.; Benemann, J.R. (2007) Biohydrogen Production from Cheese Processing Wastewater by Anaerobic Fermentation Using Mixed Microbial Communities, *International Journal of Hydrogen Energy*, **32**, 4761-4771.
- Yu, H.Q., Fang, H.H.P. (2001) Acidification of Mid- and High-Strength Dairy Wastewaters, *Water Research*, **35** (15), 3697-3705.