

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

TACIANA CARNEIRO CHAVES

**Produção de hidrogênio a partir do melaço de cana-de-açúcar em reator anaeróbio de
leito fluidificado**

Maceió

2018

TACIANA CARNEIRO CHAVES

**Produção de hidrogênio a partir do melaço de cana-de-açúcar em reator anaeróbio de
leito fluidificado**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Professor Dr. Eduardo Lucena Cavalcante de Amorim.

Maceió

2018

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

C527i Chaves, Taciana Carneiro.

Produção de hidrogênio a partir do melaço de cana-de-açúcar em reator anaeróbico de leito fluidificado / Taciana Carneiro Chaves. – 2018.

98 f. : il., tabs., grafs.

Orientador: Eduardo Lucena Cavalcante de Amorim.

Dissertação (mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Tecnologia. Maceió, 2018.

Bibliografia: f. 89-98.

1. Reator anaeróbico. 2. Hidrogênio. 3. Melaço de cana-de-açúcar.
4. Engenharia química. I. Título.

CDU: 62-622

Taciana Carneiro Chaves

**Produção de hidrogênio a partir do melaço de cana-de açúcar
em reator anaeróbio de leito fluidificado**

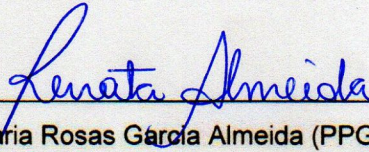
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Alagoas, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Engenharia Química.

Aprovada em: Maceió, 07 de março de 2018.

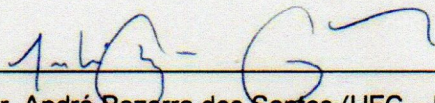
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Eduardo Lucena Cavalcante de Amorim (PPGEQ/UFAL – Orientador)



Prof^ª. Dr^ª. Renata Maria Rosas Garcia Almeida (PPGEQ/UFAL)



Prof. Dr. André Bezerra dos Santos (UFC – Membro Externo)

DEDICATÓRIA

A Deus, pela minha existência.

A minha querida e inesquecível avó, Amara Caetano da Silva (*In memoriam*), por todo amor e carinho dedicados a mim.

AGRADECIMENTOS

A conclusão deste trabalho só foi possível graças, primeiramente a Deus, e a contribuição de muitas pessoas, as quais tenho a satisfação de agradecer:

A minha filha Tainá Carneiro Chaves, que com sua pureza e amor incondicional, me ajudou a enfrentar os problemas com maior facilidade, pois sempre após uma jornada cansativa de trabalho, ao chegar em casa, ela estava lá me esperando com um abraço apertado e confortável. Te amo demais filha!

Ao meu amado esposo, Edeilton de Lima Chaves, pelo apoio e paciência; agradeço por todos esses anos que estive ao meu lado.

As minhas tias Lusinete e Inácia, por cuidarem da minha filha nos momentos em que eu tive que me ausentar; obrigada por dedicarem tanto amor e atenção a Tainá.

Ao meu orientador, Eduardo Lucena Cavalcante de Amorim, pelos ensinamentos e pela atenção dedicada nas situações em que surgiram problemas e dúvidas pertinentes a pesquisa;

Aos amigos que colaboraram com a manutenção e operação do reator: Vinícius, Pablo e Thiago. Os mesmos sempre estiveram presentes quando eu precisava.

Aos amigos, Emannelle e Gabryel, que contribuíram com as análises finais da pesquisa. Juntos, aprendemos a utilizar o amostrador automático e aprimoramos o método para a análise de metabólitos.

Ao professor Roberto Cafaro e a Izabel Sakamoto, pela contribuição no desenvolvimento da análise de PCR-DGGE.

Aos amigos do mestrado, Laryssa, Poly, Jamerson, Rodrigo, Rafaela, Ewerton, Juliane e Jaqueline. Juntos passamos muitos obstáculos durante o curso das disciplinas.

Aos professores, que dedicaram tempo para compartilhar seus conhecimentos teóricos e práticos.

A todos do LSA, por disponibilizarem o espaço laboratorial para o desenvolvimento deste trabalho.

A Norma Candida de Amorim, que mesmo à distância, sempre respondeu a cada dúvida que eu lhe perguntava.

Por fim, também agradeço a Capes, pelo financiamento do projeto.

“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis. ”

Fernando Pessoa.

RESUMO

O hidrogênio é uma das fontes de energia mais estudadas na atualidade. Este pode ser produzido de várias formas, dentre as quais, se destaca a sua produção biológica a partir de fontes renováveis, tais como resíduos industriais e domésticos ricos em carboidratos. Nesse contexto, o melaço de cana-de-açúcar, um subproduto gerado na produção de açúcar, contém grande quantidade de matéria orgânica e, portanto, ao passar pelo processo de digestão anaeróbia, pode ser convertido em hidrogênio. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi utilizar um reator anaeróbio de leito fluidificado (RALF) em temperatura ambiente para produzir hidrogênio a partir de melaço de cana de açúcar alimentado a $25 \text{ g}_{\text{DQO}} \cdot \text{L}^{-1}$. O volume total do reator foi 1,2 L. O material suporte empregado para garantir a adesão microbiana foi o pneu triturado e a fonte de microrganismos consistiu de lodo coletado de um reator de manta de lodo (UASB) usado numa estação de tratamento de esgoto. Foram analisadas diferentes cargas orgânicas volumétricas (COV) e tempos de detenção hidráulica (TDHs: 12, 6, 4 e 3 h), obtidos a partir da variação da vazão do sistema. A máxima taxa de produção de hidrogênio ($\text{HPR} = 1,44 \text{ L}_{\text{H}_2} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{Reator} \cdot \text{h}^{-1}$) foi alcançada no TDH de 4 h equivalendo a $373,25 \text{ kJ} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{Reator} \cdot \text{d}^{-1}$ de taxa de produção de energia (EPR-H_2). O maior rendimento de hidrogênio ($\text{HY} = 3,07 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}^{-1}_{\text{glicose}}$) foi obtido no TDH ótimo de 6 h. O conteúdo de hidrogênio no biogás atingiu 25,95% de H_2 . Os principais metabólitos produzidos foram o etanol e o ácido acético, a partir de fermentação tipo etanol. A análise de PCR-DGGE revelou que a comunidade bacteriana do reator sofreu alterações estruturais ao longo da diminuição do TDH, as quais foram reduzindo até obtenção de 88% de similaridade entre os TDHs de 4 h e 3 h.

Palavras-chave: Reator anaeróbio de leito fluidificado, produção de hidrogênio, melaço de cana de açúcar.

ABSTRACT

Hydrogen is one of the most studied energy sources nowadays. It can be produced in a number of ways, among which its organic production from renewable sources, such as industrial and household waste rich in carbohydrates, stands out. In this context, sugarcane molasses, a byproduct generated in the production of sugar, contains a large quantity of organic matter and, therefore, when passing through the process of anaerobic digestion, can be converted into hydrogen. Thus, the objective of this study was to use an anaerobic fluidized bed reactor (AFBR) at room temperature to produce hydrogen from sugarcane molasses fed at $25 \text{ g}_{\text{DQO}} \cdot \text{L}^{-1}$. The total volume of the reactor was 1.2 L. The support material employed to ensure microbial adhesion was the crushed tire and the source of microorganisms consisted of sludge collected from a sludge blanket reactor (UASB) used in a sewage treatment plant. Different volumetric organic loads (VOL) and hydraulic retention times (HRTs: 12, 6, 4 and 3 h), obtained from the variation of the system flow, were analyzed. A maximum hydrogen production rate ($\text{HPR} = 1.44 \text{ L}_{\text{H}_2} \cdot \text{L}^{-1}_{\text{Reactor}} \cdot \text{h}^{-1}$) was achieved at HRT of 4 h with a energy production rate (EPR- H_2) of $373.25 \text{ kJ} \cdot \text{L}^{-1}_{\text{Reactor}} \cdot \text{d}^{-1}$. The highest hydrogen yield ($\text{HY} = 3.07 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}^{-1}_{\text{glucose}}$) was obtained at optimal HRT of 6 h. The hydrogen content in the biogas reached 25.95% H_2 (HRT 6 h). The main metabolites produced were ethanol and acetic acid, from ethanol type fermentation. PCR-DGGE analysis revealed that the bacterial community of the reactor underwent structural changes along the decrease of HRT, which were reduced until obtaining an 88% similarity between HRTs of 4 h and 3 h.

Keywords: Anaerobic fluidized bed reactor, hydrogen production, sugarcane molasses.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Classificação da produção biológica de hidrogênio	13
Figura 2: Rotas metabólicas e grupos microbianos envolvidos na digestão anaeróbia.	16
Figura 3: Fluxograma das diferentes rotas metabólicas a partir da glicose.	19
Figura 4: Esquema ilustrativo da configuração de um RALF.....	20
Figura 5: Fluxograma do processo de produção de açúcar, com geração de melão e outros subprodutos.....	32
Figura 6: Fluxograma das atividades desenvolvidas durante o estudo.	42
Figura 7: Tratamento do inóculo: a) aquecimento a 90 °C e b) resfriamento a 25 °C.....	43
Figura 8: Partículas de pneu triturado utilizado como material suporte na pesquisa.	44
Figura 9: Esquema de instalação do reator anaeróbio de leito fluidificado.	45
Figura 10: a) bomba de recirculação e b) bomba de alimentação utilizadas para operação do RALF.	46
Figura 11: Foto do RALF utilizado na pesquisa.	46
Figura 12: Perfil de dependência do pH afluente e efluente nos diferentes TDHs ao longo da operação do RALF.....	58
Figura 13: Perfil de dependência do TDH com a variação de DQO e a sua eficiência de remoção no RALF.	59
Figura 14: Perfil de dependência do TDH no RALF com a variação de carboidrato na forma de glicose afluente e efluente e com a eficiência de conversão de carboidrato.....	61
Figura 15: Porcentagens médias de sólidos suspensos fixos e voláteis nos efluentes do RALF verificados ao longo das fases operacionais.	63
Figura 16: Perfil de dependência do rendimento de hidrogênio (HY) com o TDH ao longo do tempo de operação do RALF.	64
Figura 17: Rendimento de hidrogênio no RALF ao longo da diminuição do TDH.....	65
Figura 18: Perfil de dependência da produção volumétrica de hidrogênio (HPR) com o TDH ao longo do tempo de operação do RALF.	66
Figura 19: Produção volumétrica de hidrogênio no RALF ao longo da diminuição do TDH.	67
Figura 20: Perfil de dependência do conteúdo de H ₂ com o TDH ao longo do tempo de operação do RALF.....	69

Figura 21: Conteúdo do biogás produzido no RALF ao longo da diminuição do tempo de detenção hidráulica (TDH).	69
Figura 22: Rendimento e conteúdo de hidrogênio no RALF ao longo do aumento da taxa de carregamento orgânico (TCO).	71
Figura 23: Produção volumétrica de hidrogênio (HPR) no RALF ao longo do aumento da taxa de carregamento orgânico (TCO).	71
Figura 24: Perfil de dependência da concentração molar média, em mmol.L ⁻¹ dos metabólitos solúveis produzidos (SMPs) no RALF, com os diferentes TDHs.	74
Figura 25: Metabólitos solúveis produzidos (SMPs) no RALF (%) ao longo da diminuição do TDH (HAc=ácido acético, HPr = ácido propiônico e Hbu = ácido butírico).	75
Figura 26: Perfil de bandas da análise de PCR-DGGE da comunidade bacteriana presente no RALF nos diferentes TDHs.	82
Figura 27: Índice de diversidade de Shannon-Wiener (H) para a comunidade bacteriana presente nos diferentes TDHs aplicados no RALF.	83
Figura 28: Dendograma e coeficiente de similaridade (correlação de Pearson) gerado a partir do perfil de DGGE referente as comunidades bacterianas presentes em cada fase operacional.	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Poder calorífico de diferentes combustíveis	11
Tabela 2: Métodos de produção de hidrogênio	12
Tabela 3: Comparação entre três tecnologias de produção de biohidrogênio	14
Tabela 4: Microrganismos envolvidos na conversão microbiana de resíduos em biogás.....	17
Tabela 5: Estudos anteriores que utilizaram RALF para produzir hidrogênio por digestão anaeróbia.....	23
Tabela 6: Substratos utilizados para a produção biológica de hidrogênio.	28
Tabela 7: Composição do melaço de cana de açúcar	31
Tabela 8: Estudos anteriores que utilizaram o melaço de cana de açúcar para produção de hidrogênio.....	40
Tabela 9: Características físicas do pneu triturado de acordo com Barros (2009).....	44
Tabela 10: Fases experimentais de operação do RALF	47
Tabela 11: Frequência das análises das amostras coletadas no reator anaeróbio.....	49
Tabela 12: Reagentes usados na amplificação dos fragmentos de DNA por PCR.	53
Tabela 13: Quantidades dos componentes usados no preparo das soluções do gel gradiente desnaturante.....	54
Tabela 14: Características do melaço utilizado neste estudo.	56
Tabela 15: Condições operacionais médias do RALF durante as quatro fases operacionais..	58
Tabela 16: Médias de DQO afluente e efluente e de eficiência de remoção nos TDHs aplicados, com seus respectivos desvios padrões.....	59
Tabela 17: Médias de Carboidrato na forma de glicose afluente e efluente e eficiência de conversão para os TDHs aplicados, com seus respectivos desvios padrões.	61
Tabela 18: Variação da concentração de SST, SSF e SSV no afluente e no efluente durante os TDHs aplicados.	62
Tabela 19: Valores médios do rendimento de hidrogênio (HY) e da eficiência de conversão do melaço em hidrogênio, com seus respectivos desvios padrões, para cada faixa de TDH aplicado no RALF.....	65
Tabela 20: Valores médios da produção volumétrica de hidrogênio (HPR) e da taxa de produção de energia de H ₂ (EPR – H ₂) para cada TDH aplicado no RALF.	67
Tabela 21: Comparação entre valores máximos de HPR e EPR-H ₂ obtidas a partir de alguns estudos utilizados para produzir H ₂	68

Tabela 22: Valores médios e desvios padrões da composição percentual do biogás produzido no RALF para cada tempo de detenção hidráulica (TDH) aplicado.	69
Tabela 23: Valores médios do rendimento de hidrogênio (HY), da produção volumétrica de hidrogênio (HPR) e do conteúdo de hidrogênio (%) para as diferentes cargas orgânicas volumétricas (COV) aplicadas no RALF. (\pm desvios padrões).	71
Tabela 24: Concentrações médias, em mg/L, dos metabólitos solúveis produzidos no RALF em cada TDH aplicado e seus respectivos desvios padrões.	73
Tabela 25: Concentração molar, em mmol/L, e porcentagem dos metabólitos produzidos no RALF nos diferentes TDHs.	74
Tabela 26: Rendimentos de etanol obtidos no RALF em cada TDH aplicado.	77
Tabela 27: Concentrações médias e desvios padrões da biomassa, da glicose efluente e dos metabólitos solúveis produzidos no RALF nos diferentes TDHs.	79
Tabela 28: Valores médios, em $\text{mg}_{\text{DQO}}\cdot\text{L}^{-1}$, e desvios padrões, da biomassa, da glicose efluente, dos metabólitos solúveis produzidos no RALF e da DQO efluente medida nos diferentes TDHs.	80
Tabela 29: Dados experimentais obtidos na produção de hidrogênio em RALF a partir do melaço de cana de açúcar em cada TDH.	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABR	Biorreator Anaeróbio com Compartimentos
ACR	Reator Anaeróbio de Contato
Acetil-coA	Acetil coenzima A
AnSBBR	Biorreator Anaeróbio Operado em Bateladas Sequenciais
APBR	Reator anaeróbio de leito empacotado
APHA	Métodos Padrões para Análise de Águas e Efluentes
ASTR	Reator anaeróbio de tanque agitado
AVT	Ácidos Voláteis Totais
CaCO₃	Carbonato de Cálcio
CECA	Centro de Ciências Agrárias
CMISR	Reator Contínuo de Lodo Imobilizado
COT	Carbono Orgânico Total
COV	Carga Orgânica Volumétrica
CSTR	Reator Contínuo de Tanque Agitado
CTEC	Centro de Tecnologia
DHS	Filtro Anaeróbio Submerso
DQO	Demanda Química de Oxigênio
EGSB	Reator Granular de Leito Expandido
EtOH	Etanol
FID	Detector de Ionização de Chama
GC	Cromatógrafo Gasoso
HAc	Ácido acético (Acetato)
HBu	Ácido Butírico (Butirato)
HPr	Ácido Propiônico (Propionato)
HPR	Taxa de Produção de Hidrogênio
HY	Rendimento de Hidrogênio
KH₂PO₄	DiHidrogenofosfato de Potássio Monobásico
LBM	Laboratório de Biologia Molecular
LCA	Laboratório de Controle Ambiental
LSA	Laboratório de Saneamento Ambiental
NH₄HCO₃	Bicarbonato de Amônio
NTK	Nitrogênio Total
PBR	Reator de leito empacotado (Packed Bed Reactor)
PCR-DGGE	Reação de Polimerase em Cadeia-Gel em Gradiente Desnaturante
PET	Politereftalato de Etileno
PFL	Piruvato Formato Liase
PFOR	Piruvato Ferredoxin Óxido Redutase
Q	Vazão volumétrica

RALF	Reator Anaeróbio de Leito Fluidificado
SLR	Taxa de Carregamento Orgânica do Lodo
SMP	Metabólitos Solúveis Totais Produzidos
SSF	Sólidos Suspensos Fixos
SST	Sólidos Suspensos Totais
SSV	Sólidos Suspensos Voláteis
ST	Sólidos Totais
TCO	Taxa de Carregamento Orgânico
TDH	Tempo de Detenção Hidráulica
UASB	Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente de Manta de Lodo
UFAL	Universidade Federal de Alagoas
UMAS	Sistema Ultrassônico de Membrana Anaeróbia
USSB	Reator de Leito de Enchimento
V_{mf}	Velocidade mínima de fluidização

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. OBJETIVOS	10
2.1 Geral	10
2.2 Específicos	10
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
3.1 O Hidrogênio como Fonte Renovável de Energia	11
3.2 Produção de Hidrogênio	12
3.2.1 A partir de combustíveis fósseis	12
3.2.2 A partir da água	12
3.2.3 A partir de biomassa	13
3.3 Digestão Anaeróbia	15
3.3.1 Bactérias fermentativas.....	16
3.3.2 Rotas fermentativas e metabólitos	18
3.4 Reator Anaeróbio de Leito Fluidificado	19
3.4.1 Biohidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidificado.....	20
3.5 Fatores que Influenciam a Produção Anaeróbia de Biohidrogênio	23
3.5.1 Influência do pH	24
3.5.2 Influência da temperatura	25
3.5.3 Influência do tratamento do inóculo	26
3.5.4 Influência do substrato.....	27
3.5.5 Influência do material suporte	29
3.5.6 Influência do tempo de detenção hidráulica	29
3.5.7 Influência da carga orgânica volumétrica	30
3.6 Melaço de Cana-de-Açúcar	31
3.6.1 Biohidrogênio a partir do melaço de cana-de-açúcar	34
3.7 Considerações Finais sobre a Revisão Bibliográfica	40
4. MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1 Substrato	43
4.1.1 Caracterização físico-química do melaço.....	43
4.2 Inóculo	43
4.3 Material Suporte	44
4.4 Configurações do RALF	45

4.5 Operação do RALF	47
4.5.1 Testes operacionais iniciais e partida do RALF	47
4.6 Análises das Amostras de Afluentes e Efluentes do RALF	48
4.6.1 Análise da composição do biogás	49
4.6.2 Análises de metabólitos solúveis pelo método de headspace e análises de H ₂	50
4.6.3 Análise da comunidade microbiana por PCR-DGGE	52
4.7 Equações para os Cálculos dos Principais Parâmetros.....	55
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
5.1 Caracterização Físico-Química do Melaço Puro.	56
5.2 Monitoramento do RALF	57
5.2.1 Temperatura, vazão e pH.....	57
5.3 Remoção da DQO	59
5.4 Conversão de Carboidratos	61
5.5 Determinação de Sólidos Suspensos.....	62
5.6 Produção de Hidrogênio	63
5.6.1 Rendimento de hidrogênio (HY)	63
5.6.2 Produção volumétrica de hidrogênio (HPR) e taxa de produção de energia de hidrogênio (EPR-H ₂).....	66
5.6.3 Composição do biogás produzido no RALF	68
5.6.4 Efeito da COV na produção de H ₂	70
5.7 Composição dos Metabólitos Solúveis no Efluente.....	72
5.8 Balanço de DQO	78
5.9 Avaliação da Diversidade Microbiana por PCR-DGGE	81
5.10 Considerações Finais	84
6. CONCLUSÃO.....	87
7. SUGESTOES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	88
REFERÊNCIAS.....	89

1. INTRODUÇÃO

Cada vez mais a sociedade busca por fontes alternativas de energia, que sejam limpas, renováveis e eficientes. O hidrogênio derivado de matéria prima renovável é uma dessas fontes, visto que o mesmo possui uma combustão limpa, que ao reagir com oxigênio só libera água, tem alto conteúdo energético e pode ser utilizado de várias maneiras, tais como em dispositivos microeletrônicos, veículos de transporte e centrais elétricas (ALBANEZ, 2015; RAHMAN et al., 2016). Este gás pode ser produzido a partir de combustíveis fósseis, biomassa e água, através de processos físicos, químicos ou biológicos (BHARATHIRAJA et al., 2016).

As formas biológicas de produção de hidrogênio podem ocorrer por fotossíntese ou por fermentação (VASCONCELOS et al., 2016). As rotas fermentativas são consideradas bastante atrativas e promissoras, pois envolvem um processo de baixo custo, isento de poluição, com pequeno gasto energético e uma variedade de microrganismos e substratos que podem servir como fonte produtora do gás (SANTOS, 2014; NUALSRI et al., 2016). Dentre os processos fermentativos de obtenção de hidrogênio, destaca-se a digestão anaeróbia de compostos ricos em matéria orgânica, também conhecida como fermentação na ausência de luz. Neste, além de ser amenizado o problema ambiental, com o tratamento de efluentes ricos em carbono, é produzida energia limpa e renovável, o biogás (OTTAVIANO, 2014; LUTPI et al., 2016), que tem como componentes: hidrogênio, metano, dióxido de carbono e nitrogênio, sendo gerado pela decomposição natural do material orgânico (GEHRING, 2014).

A produção biológica de hidrogênio por digestão anaeróbia tem sido realizada em vários tipos de reatores; um desses é o reator anaeróbio de leito fluidificado (RALF), que já foi utilizado por muitos autores com sucesso para este fim (BARROS e SILVA, 2012; ROSA et al., 2014a; SANTOS, 2014; GOMES et al., 2015; REIS et al., 2015; MARTINS e AMORIM, 2016), os quais verificaram que nessa configuração de reator é possível a aplicação de altas cargas orgânicas volumétricas e baixos tempos de detenção hidráulica, devido a vantagem de melhor transferência de massa entre o substrato e os microrganismos, garantindo a adesão de grande quantidade de biomassa ao material suporte. Outros estudiosos verificaram a interferência de inúmeros fatores na capacidade produtiva de biogás por fermentação anaeróbia, tais como: substrato, pH, temperatura, carga orgânica volumétrica (COV), tempo de detenção hidráulica (TDH) e tratamento do inóculo (BARROS et al., 2010; MAINTINGUER et al., 2015; RATTI et al., 2015; NUALSRI et al., 2016; QIU et al., 2016).

Para se obter bons rendimentos de hidrogênio a partir da utilização de um RALF, são necessários substratos com quantidades significativas de matéria orgânica. Neste sentido, muitos resíduos industriais são utilizados como fonte de carbono para produzir hidrogênio (PAWAR e VAN NIEL, 2013; URBANIEC e BAKKER, 2015).

Os resíduos agroindustriais são poluidores ambientais que contem elevadas concentrações de carbono, o que os torna adequados à produção de biogás através da fermentação anaeróbia (LOVATO, 2014; REIS et al., 2015). Seguindo esse contexto, o melaço, subproduto gerado na produção de açúcar na proporção de 40 a 60 quilos por tonelada de cana processada, contem elevadas concentrações de glicose, sacarose e frutose (PIACENTE, 2005). É considerado por vários estudiosos como um substrato apropriado ao processo fermentativo de digestão anaeróbia, e, portanto para a produção biológica de hidrogênio (BEHERA et al., 2012; JIMÉNEZ et al., 2004; PARK et al., 2010; WANG et al., 2013; LEE et al., 2014). É geralmente utilizado para produção de etanol, cachaça, rum, fermentos biológicos e rações animais (JÚNIOR, 2013; SILVA, 2008; WANG et al., 2013).

Alguns pesquisadores utilizaram o melaço para produção de hidrogênio em modo batelada (LI et al., 2007; ALBANEZ, 2015). Outros trabalharam de forma contínua (REN et al., 2006; GUO et al., 2008; PARK et al., 2010; HAN et al., 2012a; WANG et al., 2013), mas nenhum dos autores citados utilizou um RALF em sua produção. Han et al. (2012a) e Wang et al. (2013) investigaram o uso de CSTR com melaço em faixas de DQO e TDH baixas. O estudo de Park et al. (2010), produziu hidrogênio com aplicação de alta DQO utilizando um CSTR. A bioprodução de hidrogênio em RALF a partir de melaço de cana de açúcar alimentado em baixa concentração afluente foi estudada por Rego (2016).

Tendo em vista que nos trabalhos citados houve certa dificuldade em obter elevadas taxas de produção de hidrogênio e levando em conta as vantagens possibilitadas por reatores de leito fluidificado, além da existência de poucos estudos na literatura sobre a produção biológica a partir de melaço de cana-de-açúcar em RALF, o objetivo principal desta pesquisa foi utilizar este substrato para avaliar a produção de hidrogênio nesta configuração de reator, sob condições operacionais diferentes das já utilizadas, visando a obtenção de maiores taxas de produção deste gás. Uma dessas condições é a aplicação de alta concentração de substrato, visto que tem sido verificado que o aumento dessa concentração até um faixa adequada pode ocasionar o aumento da capacidade das bactérias em produzir hidrogênio (AMORIM, 2009).

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a produção de hidrogênio a partir de um reator anaeróbio de leito fluidificado operado continuamente e alimentado com o substrato melaço da cana-de-açúcar.

2.2 Específicos

- Caracterizar físico-quimicamente o melaço de cana-de-açúcar;
- Avaliar a remoção de DQO no reator;
- Avaliar a conversão de carboidratos no reator;
- Avaliar a influência do tempo de detenção hidráulica (TDH) na taxa de produção volumétrica, no rendimento e no conteúdo de hidrogênio no biogás produzido;
- Quantificar a taxa de produção de energia resultante da geração de H₂ a partir do melaço;
- Avaliar a influência da carga orgânica volumétrica (COV) na taxa de produção volumétrica, no rendimento e no conteúdo de hidrogênio no biogás produzido;
- Avaliar a composição do biogás produzido;
- Avaliar a composição dos metabólitos solúveis;
- Avaliar o rendimento de etanol obtido nos metabólitos solúveis;
- Avaliar a dinâmica microbiana por análise de biologia molecular através da técnica de PCR-DGGE;
- Realizar o balanço de DQO no reator.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O Hidrogênio como Fonte Renovável de Energia

De acordo com Rahman et al. (2016) aproximadamente 80% da demanda energética mundial é proveniente de combustíveis fósseis, os quais, além de serem esgotáveis, liberam em suas reações diversos compostos óxidos causadores do efeito estufa, chuva ácida e poluição. Conseqüentemente, a busca e o desenvolvimento de fontes de energia renováveis que causem baixo impacto ambiental, faz-se cada vez mais necessário.

O uso de hidrogênio como fonte de energia é investigado desde 1868. Entretanto as formas de obtenção desse gás eram ambientalmente desfavoráveis, vinham de fontes não renováveis e exigiam alto gasto energético (LOVATO, 2014). Estudos mais recentes destacam a produção biológica de hidrogênio, oferecendo uma alternativa sustentável e limpa na tentativa de atender a enorme demanda energética global.

Vasconcelos et al. (2016) relatam que o hidrogênio apresenta maior capacidade energética do que os combustíveis fósseis, tendo um teor energético por unidade de peso de 142 kJ.g⁻¹, enfatizando também a eficiência (como combustível automotivo) 50 % maior do que a gasolina. Além disso, na sua combustão não são gerados gases causadores do efeito estufa, tendo como subproduto apenas água. Na Tabela 1 é mostrado o poder calorífico de diferentes combustíveis (a 25 °C e 1 atm), sendo notória a superioridade do hidrogênio.

Tabela 1: Poder calorífico de diferentes combustíveis

Combustível	Poder Calorífico Superior (kJ.g⁻¹)	Poder Calorífico Inferior (kJ.g⁻¹)
Hidrogênio	141,86	119,93
Metano	55,53	50,02
Propano	50,36	45,6
Gasolina	47,50	44,5
Etanol	30,57	27,71
Metanol	19,96	18,05

Fonte: Adaptado de Amorim (2012)

Além da geração de eletricidade e calor, o biohidrogênio pode ser ainda purificado para produzir, combustível de transporte e matérias-primas para a produção de plástico. A transformação do biogás em combustível para transporte foi recentemente implementada na Alemanha, Itália e Suécia (NGHIEM et al., 2017).

3.2 Produção de Hidrogênio

De acordo com Bharathiraja et al. (2016), o hidrogênio pode ser obtido por processos físicos, químicos ou biológicos, a partir de combustíveis fósseis, biomassa e água. Na Tabela 2 são apresentados alguns dos principais processos de obtenção deste gás.

Tabela 2: Métodos de produção de hidrogênio

Matérias-Primas	Métodos de Produção
Combustíveis Fósseis	Reforma a vapor do gás natural Oxidação parcial de hidrocarbonetos pesados Gaseificação do carvão
Água	Eletrólise da água Processos foto-eletróquímicos Processos termoquímicos
Biomassa	Processos biológicos Gaseificação da biomassa Reforma a vapor do etanol Reforma em fase líquida

Fonte: Adaptado de Ottaviano (2014)

3.2.1 A partir de combustíveis fósseis

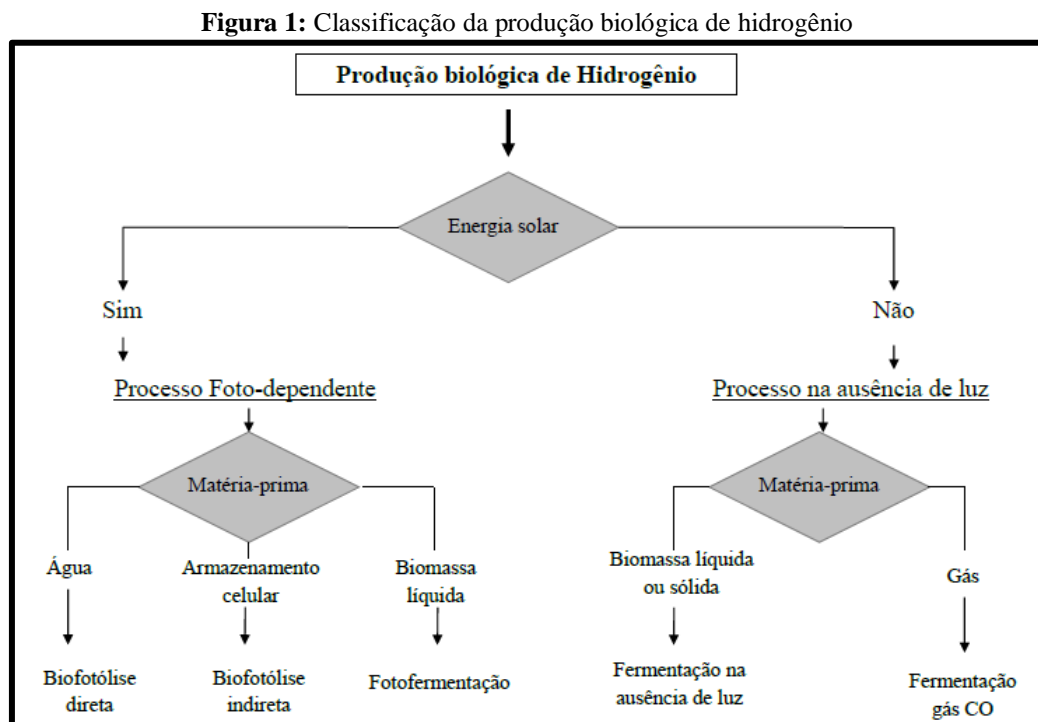
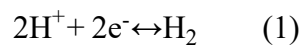
Os principais métodos empregados para produzir hidrogênio a partir de combustíveis fósseis são: reforma a vapor e cracking térmico de gás natural, oxidação parcial de hidrocarbonetos mais pesados do que nafta, gaseificação de carvão e pirólise (VIJAYARAGHAVAN e SOOM, 2004). Segundo Amorim (2012), a obtenção de hidrogênio a partir do gás natural é a forma mais eficiente e barata, entretanto, além de utilizar fonte não renovável, emite gases causadores do efeito estufa.

3.2.2 A partir da água

Os processos mais relevantes que produzem hidrogênio a partir de água são: eletrólise, fotólise, processo termoquímico e decomposição térmica direta ou termólise (VIJAYARAGHAVAN e SOOM, 2004). Amorim (2012), cita que estes métodos utilizam combustíveis fósseis como fonte de energia, e às vezes hidroeletricidade para a quebra das ligações da água, caracterizando a produção de hidrogênio como onerosa e nem sempre favorável ao meio ambiente.

3.2.3 A partir de biomassa

A produção biológica de hidrogênio é uma tecnologia de baixo custo que requer pouca energia para a obtenção de biogás a partir do uso microrganismos. Ocorre principalmente através de três processos, conforme mostrado na Figura 1: fotossíntese (biofotólise e fotodecomposição de compostos orgânicos), fotofermentação e fermentação escura, também conhecida como digestão anaeróbia. Para que estes processos ocorram, conforme citado por Amorim (2009) e Bharathiraja et al. (2016), é necessária a presença de enzimas (nitrogenase, Fe-hidrogenase e Ni-hidrogenase) catalisadoras da reação descrita pela Equação 1:



Fonte: Santos (2014)

Essas tecnologias são classificadas em dois grupos: independentes da luz (fermentação escura) e dependentes da luz (biofotólise e fotofermentação). A biofotólise, realizada por microrganismos foto-autotróficos (cianobactérias e microalgas), promove a divisão de moléculas de água em moléculas de H_2 através do uso de energia solar e CO_2 . A fotofermentação envolve uma série de reações bioquímicas realizadas por bactérias fotossintéticas na presença de luz que fazem com que os compostos orgânicos de resíduos sejam degradados em moléculas menores. A fermentação escura é o bioprocessamento mais benéfico e

rentável porque não necessita de energia luminosa e produz os maiores rendimentos de H₂ (RAHMAN et al., 2016).

Tanto a fotofermentação como a fermentação escura são processos tecnicamente mais simples que podem converter a matéria orgânica presente em águas residuais numa fonte de energia renovável (VASCONCELOS et al., 2016).

Na Tabela 3 é mostrada uma comparação entre a biofotólise, a fotofermentação e a fermentação escura.

Tabela 3: Comparação entre três tecnologias de produção de biohidrogênio

Processo	Reação	Vantagens	Desvantagens	Organismos Representativos
Biofotólise	$2\text{H}_2\text{O} + \text{luz} \rightarrow 2\text{H}_2 + \text{O}_2$	Produção direta de H ₂ a partir do uso de água e luz solar. Água abundante como substrato.	Baixa eficiência da conversão de luz causando baixos rendimentos de H ₂ . Necessidade de fornecer energia luminosa: luz solar ou outras fontes, com custo adicional.	<i>Chlamydomonas-reinhardtii</i>
Foto-fermentação	$\text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{H}_2\text{O} + \text{luz} \rightarrow 4\text{H}_2 + 2\text{CO}_2$	H ₂ pode ser produzido por águas residuais. Os compostos orgânicos são completamente convertidos em H ₂ e CO ₂ .	Baixa eficiência da conversão de luz causando baixos rendimentos de H ₂ . Necessidade de fornecer energia luminosa: luz solar ou outras fontes, com custo adicional.	<i>Rhodobacter-spheroides</i>
Fermentação escura	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{CO}_2 + 4\text{H}_2$	Produz os maiores rendimentos de H ₂ comparado com outros processos biológicos. Sem necessidade de luz, o H ₂ pode ser produzido durante todo o dia. Pode utilizar inúmeras fontes de carbono como substrato.	Custo adicional ao processo devido à unidade de separação da mistura de CO ₂ e H ₂ .	<i>Clostridium sp.</i>

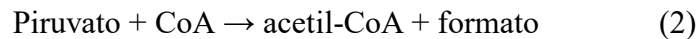
Fonte: Adaptado de Rahman et al. (2016)

3.3 Digestão Anaeróbia

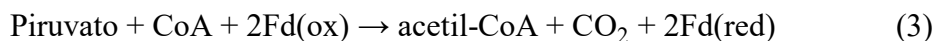
Chernicharo (2007) e Silva (2015) enfatizam que a fermentação no escuro é um processo no qual diferentes microorganismos, na ausência de oxigênio, convertem compostos orgânicos complexos (carboidratos, proteínas e lipídios) em álcoois, ácidos graxos e biogás (metano, hidrogênio e dióxido de carbono), sendo uma importante alternativa de tratamento de resíduos com altas concentrações de matéria orgânica, que além de apresentar baixos custos operacionais oferece uma substituição aos combustíveis fósseis para produção de energia, sem emitir gases causadores do efeito estufa. No entanto, segundo Nualsri et al. (2016), este processo apresenta baixa recuperação energética e baixa eficiência na remoção da demanda química de oxigênio, havendo, geralmente, conversão em hidrogênio de cerca de 20% da DQO de um substrato.

Em geral, a produção de H₂ microbiana é impulsionada pelo metabolismo anaeróbio do piruvato, formado durante o catabolismo de vários substratos e degradado por um dos dois sistemas enzimáticos descritos nas Equações 2 e 3 (RAHMAN et al., 2016).

Piruvato: formato liase (PFL)



Piruvato: ferredoxin óxido redutase (PFOR)

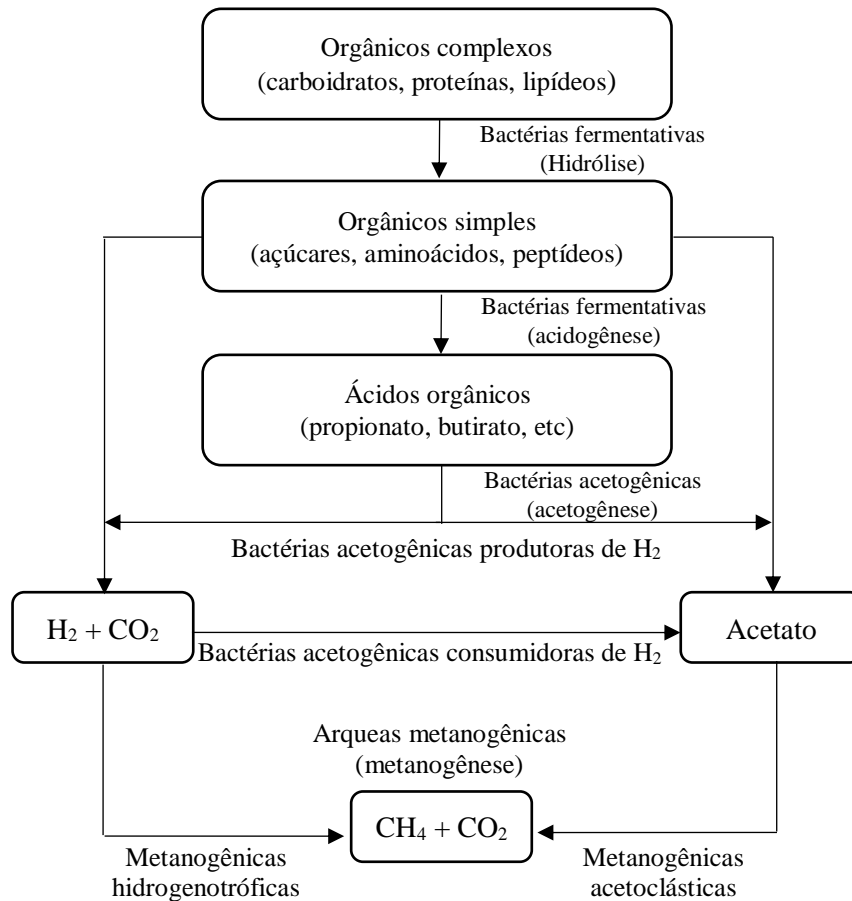


Em ambos sistemas, o piruvato (uma porção do substrato), gerado pela glicólise é utilizado, na ausência de oxigênio, para produzir acetil coenzima A (acetil-CoA), a partir da qual é gerada ATP, que, por sua vez, gera H₂ (VIJAYARAGHAVAN e SOOM, 2004).

A digestão anaeróbia ocorre em quatro etapas, denominadas hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese, que dependem da atividade de diferentes grupos microbianos: bactérias fermentativas hidrolíticas, bactérias acetogênicas e arqueas metanogênicas (Figura 2).

O hidrogênio é produzido tanto na segunda como na terceira etapa, as quais constituem a fermentação, e é consumido na quarta etapa quando as arqueias metanogênicas usam dióxido de carbono e hidrogênio para produzir metano (VASCONCELOS et al., 2016). Para evitar a metanogênese, vários autores citam que o controle do pH entre 5 e 6 e o pré-tratamento do inóculo são uns dos fatores mais eficientes.

Figura 2: Rotas metabólicas e grupos microbianos envolvidos na digestão anaeróbia.



Fonte: Adaptado de Chernicharo (2007).

Na hidrólise os materiais particulados complexos são transformados em materiais dissolvidos mais simples, capazes de atravessar as células das bactérias fermentativas. Na acidogênese esses materiais dissolvidos são convertidos em produtos ainda mais simples, como os ácidos orgânicos e hidrogênio. Na acetogênese os compostos orgânicos intermediários são transformados em acetato, hidrogênio e dióxido de carbono, e, na metanogênese, ocorre a transformação do hidrogênio e do acetato em dióxido de carbono e metano (CHERNICHARO, 2007).

3.3.1 Bactérias fermentativas

Cada grupo microbiano envolvido na produção de biogás por digestão anaeróbia apresenta uma função específica, conforme ilustrado na Tabela 4.

Tabela 4: Microrganismos envolvidos na conversão microbiana de resíduos em biogás.

Via Microbiológicas	Classe Microbiana	Substrato/ Produtos	Processo de Conversão	Exemplos
Hidrólise	Bactérias hidrolíticas	Polímero complexo/ Monômeros	Proteínas para formas inferiores viz. aminoácidos e peptídeos	Algumas espécies de <i>Clostridium</i> e <i>Bacillus</i>
			Carboidratos para produtos inferiores viz. Açúcares	Algumas espécies de <i>Clostridium</i> e <i>Staphylococcus</i>
			Lipídios para ácidos graxos inferiores, componentes e álcool etc.	Algumas espécies de <i>Clostridium</i> e <i>Staphylococcus</i>
Acidogênese	Bactérias fermentativas acidogênicas	Monômeros/ Produtos intermediários	Aminoácidos convertidos em ácidos graxos, acetato	<i>E. coli</i> , algumas espécies de <i>Staphylococcus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Bacillus</i>
			Açúcar para metabolitos menores	Algumas espécies de <i>Clostridium</i>
Acetogênese	Bactérias da acetogênese	Metabólicos intermediários/ metano, dióxido de carbono, acetato etc.	Ácido graxo ou álcool em hidrogênio ou acetato	Espécies de <i>Clostridium</i> e de <i>Syrophomonas</i>
Metanogênese	Metanogênicos de redução de CO ₂	Metano, dióxido de carbono, acetato, etc./ metano, dióxido de carbono, hidrogênio	Hidrogênio e CO ₂ para metano	<i>Methanobacterium</i> , <i>methanoplanus</i>
	Metanogênicos acetoclásticos		Acetato em metano e CO ₂	Metanobactérias (<i>methanococcus</i>)

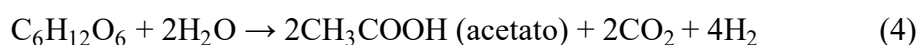
Fonte: Adaptado de Ohimain e Izah (2017)

Conforme descrito em Peixoto (2011), as principais bactérias fermentativas responsáveis pela produção de biohidrogênio são: *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium pasteurianum*, *Desulfovibrio vulgaris*, *Magashaera elsdenii*, *Citrobacter intermedius* e *Escherichia coli*. As espécies de *Clostridium* produzem maiores rendimentos de hidrogênio do que os gerados por bactérias aeróbias facultativas como as *Enterobacter*. Barros (2009) cita que os microrganismos que produzem mais hidrogênio durante a fase de acidogênese são: *Enterobacter*, *Bacillus* e *Clostridium*.

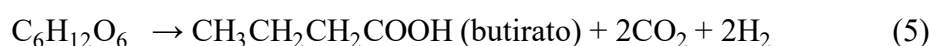
3.3.2 Rotas fermentativas e metabólitos

Teoricamente, o rendimento máximo de H_2 é de $4 \text{ mol}_{H_2} \cdot \text{mol}^{-1}_{\text{glicose}}$ quando a glicose é completamente metabolizada a partir da rota de acetato (Equação 4), gerando 2 moles de acetato e 4 moles de hidrogênio. Outra importante rota seguida durante a produção de H_2 é a rota do butirato (Equação 5), rendendo o máximo de $2 \text{ mol}_{H_2} \cdot \text{mol}^{-1}_{\text{glicose}}$. A rota do etanol (Equação 6) também gera um rendimento teórico de $2 \text{ mol}_{H_2} \cdot \text{mol}^{-1}_{\text{glicose}}$. Bactérias homoacetogênicas que tenham sobrevivido ao pré-tratamento do inóculo, podem consumir H_2 para produzir acetato (Equação 7), diminuindo o rendimento de hidrogênio (HY). Outra rota que provoca a redução do HY é a fermentação do propionato (Equação 8), que consome substrato e H_2 . (BARCA et al., 2015).

Produção de ácido acético:



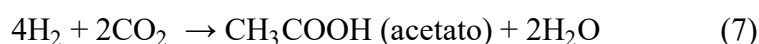
Produção de ácido butírico:



Produção de etanol:



Produção de ácido acético a partir de bactérias homoacetogênicas:



Produção de ácido propiônico:

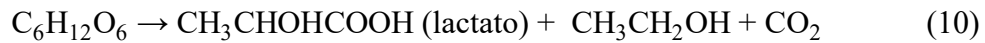


O ácido láctico é produzido a partir da glicose através de três rotas metabólicas, que não consomem nem produzem hidrogênio, conforme descrito nas Equações 9, 10 e 11. A produção de etanol também pode seguir uma rota com saldo zero de hidrogênio (Equação 12) (AMORIM, 2009).

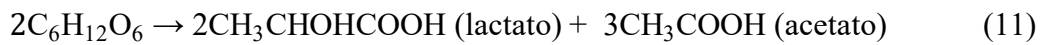
Rota homofermentativa do ácido láctico:



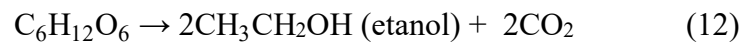
Rota heterofermentativa do ácido lático:



Rota bifidum do ácido lático:

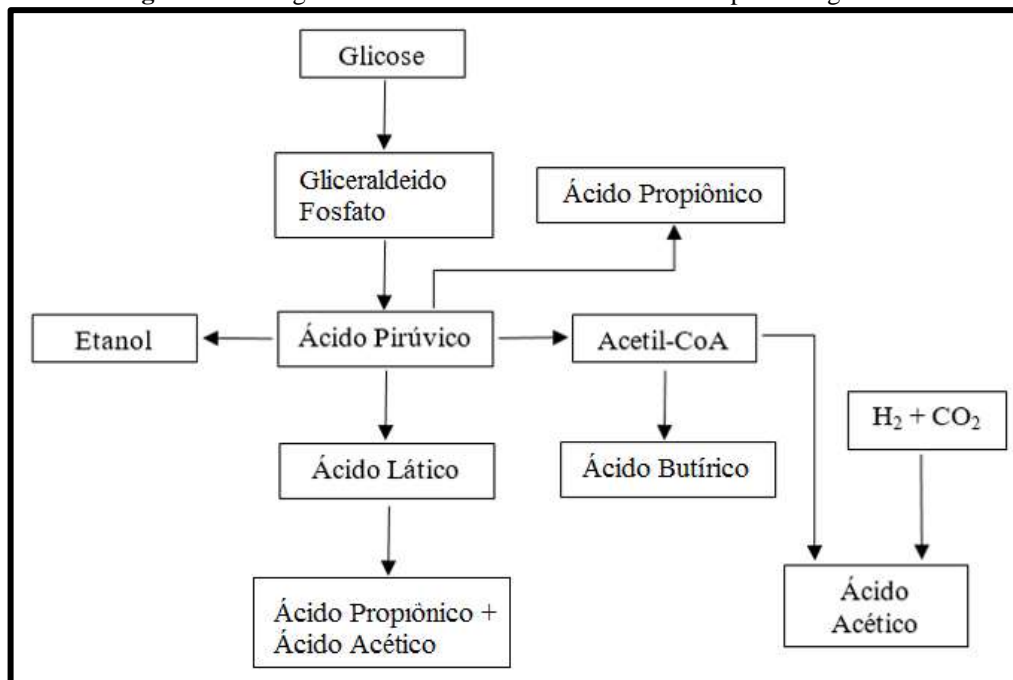


Produção de etanol com saldo zero de hidrogênio:



Na Figura 3 é apresentado o fluxograma das possíveis rotas metabólicas seguidas durante a produção de hidrogênio.

Figura 3: Fluxograma das diferentes rotas metabólicas a partir da glicose.



Fonte: Adaptado de Amorim (2009)

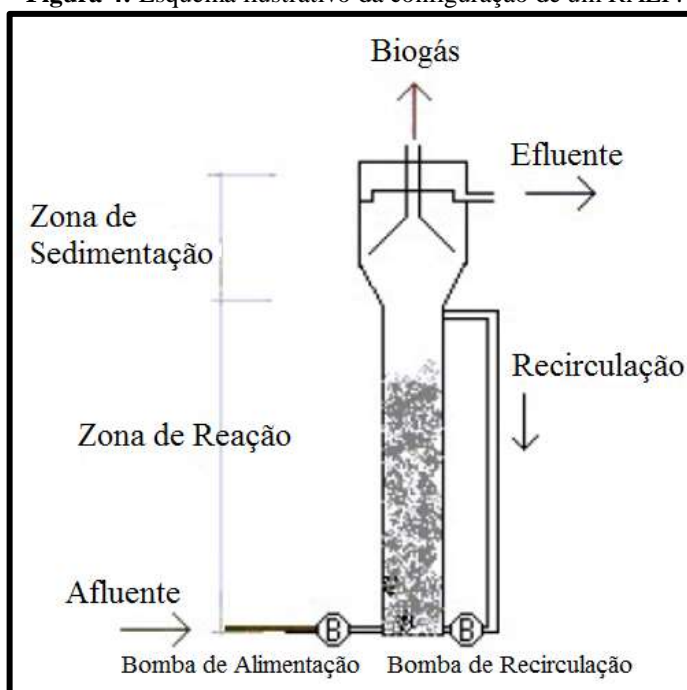
3.4 Reator Anaeróbico de Leito Fluidificado

Alguns dos reatores mais utilizados no processo digestivo anaeróbico são: o reator anaeróbico de leito fluidificado (RALF), o reator anaeróbico de fluxo ascendente de manta de lodo (UASB), o reator de filtração anaeróbia, o reator de digestão anaeróbia de contato, o biorreator anaeróbico com deflexão (ABR), o reator contínuo de tanque agitado (CSTR –

Continuos Stirred Tank Reactor), o reator de leito granular expandido (EGSB – Expanded Granular Sludge Bed) e o sistema ultrassônico de membrana anaeróbia (UMAS) (OHIMAIN e IZAH, 2017).

O RALF é um sistema onde partículas de pequenas dimensões (0,2 a 10 mm), mantidas em leito fluidificado mediante fluxo ascendente, servem de suporte para fixação dos microrganismos que realizam a decomposição do substrato afluente, a medida em que o mesmo atravessa o recheio de partículas, permitindo a degradação biológica dos compostos orgânicos. Estes reatores são constituídos por uma zona de reação, onde ocorre a degradação do material orgânico, a formação do biofilme e a produção do biogás e por uma zona de sedimentação, responsável pela separação das partículas e decantação do efluente na parte superior do reator (NICIURA, 2005). A Figura 4 apresenta um esquema da configuração dos RALFs.

Figura 4: Esquema ilustrativo da configuração de um RALF.



Fonte: Adaptado de Niciura (2005)

3.4.1 Biohidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidificado

Inúmeros autores investigaram a produção biológica de hidrogênio em reatores anaeróbios de leito fluidificado a partir dos mais variados substratos.

No estudo de Amorim et al. (2014) foi utilizado um RALF inoculado com lodo obtido de uma lagoa facultativa derivada do tratamento de efluente de suíno e alimentado com águas

residuais da mandioca a $4 \text{ g}_{\text{DQO}}\cdot\text{L}^{-1}$ para avaliar a produção de biohidrogênio em temperatura ambiente ($28 \text{ }^\circ\text{C}$) e pH 5. O reator foi operado por 164 dias, com variações no TDH (8 a 1 h) e na COV ($28 \text{ a } 161 \text{ kg}_{\text{DQO}}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$), obtendo os valores máximos de $1,91 \text{ mol}_{\text{H}_2}\cdot\text{mol}^{-1}_{\text{glicose}}$ no TDH de 2 h e de $2,04 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$ no TDH de 1 h, para o rendimento (HY) e a taxa de produção de hidrogênio (HPR), respectivamente.

Dois reatores anaeróbios de leitos fluidificados termofílicos ($55 \text{ }^\circ\text{C}$), suportados com argila expandida, R1 ($5 \text{ g}_{\text{DQO}}\cdot\text{L}^{-1}$, TDHs de 8 a 0,5 h) e R2 (TDH fixo de 6 h, DQOs de 3 a $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), foram implementados por Ottaviano (2014) para produzir hidrogênio a partir de água residuária de soro de queijo. Os reatores foram inoculados com lodo granular proveniente de um reator anaeróbio de fluxo ascendente de lodo termofílico usado para o tratamento de vinhaça. Em R1, a máxima HPR obtida foi $2,9 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$ no TDH de 0,5 hora e o valor máximo do HY foi de $3,3 \text{ mol}_{\text{H}_2}\cdot\text{mol}^{-1}_{\text{lactose}}$ no TDH de 4 horas. No R2, obteve-se o valor máximo de HPR de $0,854 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$ na DQO de $7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e para o rendimento de hidrogênio, o maior valor foi de $2,6 \text{ mol}_{\text{H}_2}\cdot\text{mol}^{-1}_{\text{lactose}}$ na DQO de $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Rosa et al. (2014a) avaliaram a performance de dois RALFs produtores de hidrogênio, com volume total de 770 cm^3 , suportados com poliestireno e inoculados com lodos pre-tratados termicamente obtidos de um reator UASB usado no tratamento de efluente de suíno (RALF1) e de um UASB que trata águas residuais de um abatedouro de aves (RALF2), tendo como substrato $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de uma mistura composta por 50% de glicose e 50% de água residuária da mandioca. Os reatores foram operados em cinco fases, durante 142 dias, para verificar o efeito das variações nos tempos de detenção hidráulica (10 a 2 h) e nas fontes de inóculo. Com o lodo utilizado no RALF1 obteve-se $0,65 \text{ mmol}_{\text{H}_2}\cdot\text{g}^{-1}_{\text{DQO}}$ (6 h) de rendimento máximo de hidrogênio; já com o lodo do RAL2 foi alcançado o maior rendimento de $1,0 \text{ mmol}_{\text{H}_2}\cdot\text{g}^{-1}_{\text{DQO}}$ (10 h). As produções máximas de hidrogênio foram: $0,26 \text{ L}_{\text{H}_2}\cdot\text{d}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$ e $2,08 \text{ L}_{\text{H}_2}\cdot\text{d}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$, ambas no TDH de 2 h, para o RALF1 e RALF2, respectivamente.

Santos (2014) investigou a produção de biohidrogênio em cinco reatores anaeróbios de leite fluidificado em temperatura termofílica ($55 \text{ }^\circ\text{C}$), contendo argila expandida como material suporte, alimentados com diferentes concentrações de vinhaça de cana de açúcar, denominados R₅ ($5 \text{ g}_{\text{DQO}}\cdot\text{L}^{-1}$), R₁₀ ($10 \text{ g}_{\text{DQO}}\cdot\text{L}^{-1}$), R₁₅ ($15 \text{ g}_{\text{DQO}}\cdot\text{L}^{-1}$) e R₃₀ ($30 \text{ g}_{\text{DQO}}\cdot\text{L}^{-1}$), com TDHs de 8, 6, 4, 2 e 1 h. A medida em que o TDH ia sendo reduzido, todos os reatores apresentaram aumento na produção volumétrica de hidrogênio e diminuição no rendimento do mesmo. Os valores máximos alcançados foram de $1,96 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$ (R₁₀; TDH de 1 h; COV de $240 \text{ kg}_{\text{DQO}}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$) e $4,62 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}_{\text{DQOadicionada}}$ no TDH de 8 h (R₅), para a produção volumétrica e o rendimento de hidrogênio, respectivamente.

Gomes et al. (2015) verificaram a importância das bactérias homo e heterofermentativas de ácido láctico na produção de hidrogênio em dois reatores anaeróbios de leito fluidificado operados a 30 °C em pH 4 - 4,5, por 160 dias, inoculados com lodo de suinocultura de um UASB e alimentados com água residuária de soro de queijo, denominados RALF1 (5 g_{DQO}.L⁻¹, TDHs de 14 a 8 h) e RALF2 (3 a 10 g_{DQO}.L⁻¹, TDH de 6 h). Os maiores rendimentos de H₂ (1,9 no TDH de 14 h e 2,3 mol_{H₂}.mol⁻¹_{lactose} no TDH de 6 h) foram obtidos durante o crescimento de *Lactococcus spp.* associado com *Leuconostoc pseudomesenteroides* aplicados em uma baixa COV.

No trabalho de Reis et al. (2015), foi analisada a produção de hidrogênio e metano na temperatura de 22 (±3) °C, a partir de duas concentrações diferentes de substrato, constituído por vinhaça de cana-de-açúcar e glicose, em dois RALFs, R5 (5 g_{DQO}.L⁻¹) e R10 (10 g_{DQO}.L⁻¹), ambos com volume total de 1452 mL, suportados com argila expandida, inoculados com lodo proveniente de reator UASB usado no tratamento de efluentes de suinocultura e mantidos no pH entre 4 e 5. Os reatores passaram por sete fases operacionais, iniciando com a glicose como única fonte de carbono, na primeira fase, sendo então adicionada vinhaça de 0 a 100% no TDH de 6 h e depois, foi mudado o TDH para 4, 2 e 1 h. A maior taxa de produção de hidrogênio foi 0,57 L.h⁻¹.L⁻¹ (R5, TDH = 1 h, 100% vinhaça) e o rendimento máximo de hidrogênio foi 3,07 mmol_{H₂}.g⁻¹_{DQOadicionada} (R5, TDH = 6 h, vinhaça:glicose = 1:3).

Um RALF de 4192 cm³ tendo como material suporte argila expandida e como inóculo microrganismos anaeróbios obtidos a partir da fermentação natural de água residuária do processamento do coco foi operado continuamente a temperatura ambiente por Martins e Amorim (2016), durante 186 dias, visando a produção de hidrogênio a partir do resíduo agroindustrial do processamento do coco suplementado com 2 g.L⁻¹ de glicose, totalizando 8 a 10 g.L⁻¹ de DQO. Variou-se o TDH de 7 a 1 h, obtendo o maior rendimento e porcentagem de hidrogênio no biogás (TDH de 2 h) iguais a 2,45 mol_{H₂}.mol⁻¹_{glicose} e 33,82%, respectivamente. A maior produção de hidrogênio foi 0,57 L.h⁻¹.L⁻¹ (TDH de 1 h).

A produção fermentativa de hidrogênio foi avaliada por Rosa et al. (2016) utilizando dois reatores anaeróbios de leito fluidificado de 770 cm³, alimentados com água de processamento de mandioca e operados com diferentes cargas orgânicas volumétricas (COV: 4 a 30 kg_{DQO}.m⁻³.d⁻¹) durante 160 dias em condições mesofílicas. Utilizou-se poliestireno como material de suporte para imobilização de biomassa e lodo de suinocultura como inóculo. Foram conseguidos um rendimento máximo de hidrogênio de 2,0 mmol.g⁻¹_{DQO} e uma taxa máxima de produção de hidrogênio de 2,1 L_{H₂}.d⁻¹.L⁻¹, com COVs de 10 kg_{DQO}.m⁻³.d⁻¹ e 14 kg_{DQO}.m⁻³.d⁻¹, respectivamente.

Na Tabela 5 são apresentados alguns estudos anteriores que utilizaram o RALF para produzir hidrogênio através de digestão anaeróbia. Os bons resultados alcançados por estes autores mostram a viabilidade de utilização de reatores anaeróbios de leito fluidificado para produção de hidrogênio a partir de substratos ricos em matéria orgânica.

Tabela 5: Estudos anteriores que utilizaram RALF para produzir hidrogênio por digestão anaeróbia

Substrato	Inóculo	Material Suporte	DQO aplicada	HPR _{máximo} /(TDH _{ótimo}) HY _{máximo} /(TDH _{ótimo})	Fonte
Manipueira	Lodo de suíno	Argila expandida	4 g.L ⁻¹	2,04 L.h ⁻¹ .L ⁻¹ /(1 h) 1,91 mol _{H2} .mol ⁻¹ _{glicose} /(2 h)	Amorim et al. (2014)
Soro de queijo	Lodo de vinhaça	Argila expandida	R1: 5 g.L ⁻¹ R2: 3 a 10 g.L ⁻¹	R1: 2,9 L.h ⁻¹ .L ⁻¹ /(0,5 h) R2: 0,854 L.h ⁻¹ .L ⁻¹ /(6 h) R1: 3,3 mol _{H2} .mol ⁻¹ _{lactose} /(4 h) R2: 2,6 mol _{H2} .mol ⁻¹ _{glicose} /(6 h)	Ottaviano (2014)
Glicose e Manipueira	RALF1: Lodo de suíno RALF2: Lodo de aves	Poliestireno	RALF1: 5 g.L ⁻¹ RALF2: 5 g.L ⁻¹	RALF1: 0,26 L _{H2} .d ⁻¹ .L ⁻¹ /(2 h) RALF2: 2,08 L _{H2} .d ⁻¹ .L ⁻¹ /(2 h) RALF1: 0,65 mmol _{H2} .g ⁻¹ _{DQO} /(6 h) RALF2: 1,0 mmol _{H2} .g ⁻¹ _{DQO} /(10 h)	Rosa et al. (2014a)
Vinhaça de cana de açúcar	Lodo de vinhaça	Argila expandida	R ₅ : 5 g.L ⁻¹ R ₁₀ : 10 g.L ⁻¹ R ₁₅ : 15 g.L ⁻¹ R ₃₀ : 30 g.L ⁻¹	1,96 L.h ⁻¹ .L ⁻¹ /(1 h) (R10) 4,62 mmol.g ⁻¹ _{DQOadicionada} /(8 h) (R ₅)	Santos (2014)
Soro de queijo	Lodo de suíno	Poliestireno	RALF1: 5 g.L ⁻¹ RALF2: 3 a 10 g.L ⁻¹	RALF1: 1,9 mol _{H2} .mol ⁻¹ _{lactose} /(14h) RALF2: 2,3 mol _{H2} .mol ⁻¹ _{lactose} /(6 h)	Gomes et al. (2015)
Vinhaça de cana de açúcar e glicose	Lodo de suíno	Argila expandida	R ₅ : 5 g.L ⁻¹ R ₁₀ : 10 g.L ⁻¹	0,57 L.h ⁻¹ .L ⁻¹ /(1 h) (R ₅) 3,07 mmol _{H2} .g ⁻¹ _{DQOadicionada} /(6 h)	Reis et al. (2015)
Efluente de coco	Lodo de efluente de coco	Argila expandida	8 a 10 g.L ⁻¹	0,57 L.h ⁻¹ .L ⁻¹ /(1 h) 2,45 mol _{H2} .mol ⁻¹ _{glicose} /(2 h)	Martins e Amorim (2016)
Manipueira	Lodo de suíno	Poliestireno	RALF1: 2 a 5 g.L ⁻¹ RALF2: 7 a 15 g.L ⁻¹	RALF1: 1,7 L _{H2} .d ⁻¹ .L ⁻¹ /(12 h) RALF2: 2,1 L _{H2} .d ⁻¹ .L ⁻¹ /(12 h) RALF1: 2,0 mmol.g ⁻¹ _{DQO} /(12 h) RALF2: 1,5 mmol.g ⁻¹ _{DQO} /(12 h)	Rosa et al. (2016)

Fonte: Autora (2018)

3.5 Fatores que Influenciam a Produção Anaeróbia de Biohidrogênio

Vários fatores influenciam na produção de biogás por digestão anaeróbia, tais como o pH e a temperatura do meio, o tipo de tratamento de inóculo, de substrato e de material suporte, o tempo de detenção hidráulica e a carga orgânica volumétrica.

3.5.1 Influência do pH

A relevância do pH na bioprodução de hidrogênio em reatores anaeróbios é inquestionável, visto que o mesmo afeta a função das enzimas hidrogenases bem como a velocidade de ação dos microrganismos digestores, influenciando nas vias metabólicas e na estrutura microbiana (AMORIM, 2012; LIMA, 2015). As enzimas hidrogenase podem ser reguladas por alterações no pH extracelular, afetando a produção de hidrogênio através da alteração da atividade enzimática por meio da redução no potencial de aminoácidos nos sítios ativos (VASCONCELOS et al., 2016).

De acordo com Nualsri et al. (2016), as bactérias acidogênicas preferem um intervalo de pH entre 5,5 e 6,5. Valores muito abaixo ou acima dessa faixa minimizam a produção de hidrogênio. Segundo Ohimain e Izah, (2017), o pH neutro favorece a metanogênese durante a produção de biogás, e, a maioria das bactérias anaeróbias, especialmente metanogênicas, aumentam a produção de metano em pH de 6,5 a 7,5, diminuindo, por consequência, a produção de H₂. Assim, para evitar a metanogênese, a faixa de pH de 5,5 a 6,5 é relatada como sendo ideal. Em contrapartida, ambientes muito ácidos, com pH abaixo de 4,5, inibem a atividade das enzimas envolvidas na geração de hidrogênio (hidrogenase) (PEIXOTO, 2011; BHARATHIRAJA et al., 2016).

No entanto, não há um pH ótimo fixado para produção de hidrogênio. De acordo com Amorim (2012), alguns autores chegaram a valores que variam entre 4,0 e 9,0, sendo a maioria desses estudos realizados em reatores em batelada, havendo carência de estudos para o caso de reatores operados de forma contínua.

Amorim (2009) investigou reatores anaeróbios de leite fluidificado em baixos pH (3,7 a 6,8), e alcançou resultados satisfatórios quanto a produção de hidrogênio a partir de glicose (1,19-2,49 mol_{H₂}.mol⁻¹_{glicose}).

Ramos et al. (2012) determinaram a interferência do pH inicial (5,5, 6,0 e 7,0) e da concentração de sólidos totais (ST: 1 a 90 g.L⁻¹) na produção de hidrogênio a partir de água residual de cafeteria em reatores batelada a 30 °C, inoculados com lodo de um reator UASB tratando águas residuais de cervejaria. A taxa de produção de hidrogênio mais elevada foi de 2,90 mmol_{H₂}.d⁻¹, obtida em pH de 5,5 a 90 g_{ST}.L⁻¹.

Cappai et al. (2014) realizaram experimentos de fermentação em batelada em resíduos alimentares e águas residuais de lodo ativado para avaliar a ação do pH (4,5 a 8,5) na produção biológica de H₂ e comparar o desempenho do processo com e sem adição de inóculo. O melhor

desempenho em termos de geração de H_2 e cinética de processo foi observado no pH 6,5 para todas as condições experimentais (com inóculo tratado termicamente ou não e sem inóculo).

De Gioannis et al. (2014) analisaram os efeitos do pH (5,5 a 8,5) na produção de hidrogênio a partir de soro de queijo pecorino e soro de queijo muçarela em fermentação batelada a 39 °C. O melhor desempenho em termos de potencial de geração de H_2 (171,3 NL $H_2.kg^{-1}_{COT}$) foi observado com utilização de queijo muçarela em pH 6,0 e inóculo tratado termicamente.

Lutpi et al. (2016) investigaram a influência do pH inicial (5,0, 5,5, 6,0 e 6,5) na produção em batelada de hidrogênio a 60 °C a partir da concentração inicial de 10 g.L⁻¹ de sacarose, utilizando lodo anaeróbico de um planta de tratamento de efluentes de moinho de óleo de palma. O rendimento máximo de hidrogênio (2,8 mol H_2 .mol⁻¹_{hexose}) foi obtido no pH ótimo 5,5, equivalendo a 4,55 mmol H_2 .L⁻¹.h⁻¹ de HPR. No pH inicial 5,0 foi encontrado o menor rendimento de hidrogênio (2,09 mmol H_2 .mmol⁻¹_{hexose}) e HPR de 2,51 mmol H_2 .L⁻¹.h⁻¹.

3.5.2 Influência da temperatura

A temperatura é um parâmetro muito importante na produção de H_2 , pois modifica o crescimento microbiano, as vias metabólicas e a atividade enzimática. As bactérias acidogênicas geralmente crescem em condições mesofílicas (30 a 35 °C) ou termofílicas (50 a 60 °C), mas algumas espécies também sobrevivem a baixas temperaturas (KARADAG et al., 2014). A produção contínua de hidrogênio a partir de resíduos orgânicos tem sido realizada em temperatura ambiente, mesofílica ou termofílica.

Infantes et al. (2011) estudaram a influência da temperatura (26, 33 e 40 °C) em diferentes pHs (4, 5 e 6) na produção de biohidrogênio por fermentação acidogênica, num reator em batelada seqüencial (SBR), utilizando cultura acidogênica mista enriquecida a partir de lama ativada e alimentada com solução de glicose a 9 g.L⁻¹. A maior produção de hidrogênio ocorreu a temperatura ambiente (26 °C) e pH 5,4.

Gadow et al. (2012) produziram hidrogênio em três CSTRs operados a três diferentes temperaturas, mesofílica (37 ±2 °C), termofílica (55 ±2 °C) e hipertermofílica (80 ±2 °C), a partir da celulose a 5 g.L⁻¹ com TDH de 10 dias. O maior rendimento de hidrogênio (19,02 mmol H_2 .g⁻¹_{celulose}) foi obtido na temperatura de 80 (±2) °C. Em 37 (±2) °C, o rendimento máximo foi 0,6 mmol H_2 .g⁻¹_{celulose} e a 55 (±2) °C obteve-se 15,2 mmol H_2 .g⁻¹_{celulose}.

Muñoz-Páez et al. (2013) compararam a produção de hidrogênio em temperatura ambiente e a 35 °C, utilizando dois RALFs alimentados com diferentes cargas orgânicas

volumétricas (5 e 8 $\text{g}_{\text{sacarose}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) e TDH de 1 dia. Na COV de 8 $\text{g}_{\text{sacarose}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, a máxima produção de H_2 no RALF operado à temperatura ambiente ($920 \text{ NmL}_{\text{H}_2} \cdot \text{L}^{-1}_{\text{leito}} \cdot \text{d}^{-1}$) foi 2,2 vezes superior a produzida no RALF mesofílico ($427 \text{ NmL}_{\text{H}_2} \cdot \text{L}^{-1}_{\text{leito}} \cdot \text{d}^{-1}$).

Qiu et al. (2016) analisaram a influência da temperatura, mesofílica (35 °C) e termofílica (55 °C), na produção biológica de hidrogênio em reator batelada a partir de várias concentrações de xilose (2,5 a 12,5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) e sob vários pHs iniciais (5 a 10), alcançando o maior HY (1,24 $\text{mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}^{-1}_{\text{xilose}}$) na temperatura de 35 °C, com 7.5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ de substrato e pH 7.0.

Ramos e Silva (2016) investigaram o efeito da temperatura, termofílica (55 °C) e hipertermofílica (75 °C) com TDHs de 8 a 0,5 h, em dois RALFs para produção de hidrogênio a partir de soro de queijo (RALF1) e vinhaça (RALF2), ambos com concentração de 10 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. As condições ótimas de produção foram obtidas no RALF1 a 65 °C e TDH de 4 h, com HY máximo de $5,51 \pm 0,37 \text{ mmol}_{\text{H}_2} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DQO}}$. No RALF2, o máximo HY (55 °C e TDH de 4 h), foi $1,64 \pm 0,22 \text{ mmol}_{\text{H}_2} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DQO}}$.

3.5.3 Influência do tratamento do inóculo

A produção anaeróbia de biohidrogênio é bastante influenciada pelo tipo de inóculo, uma vez que os produtos finais da fermentação dependem da cultura microbiana, que inclui: misturas de bactérias anaeróbias obtidas a partir de digestores anaeróbios de lamas, pilhas de compostagem e culturas puras de espécies de bactérias acidogênicas (ELSHARNOUBY et al., 2013).

A utilização de uma cultura mista de microrganismos (lama anaeróbia), exige a inibição das bactérias consumidoras de H_2 , por isso, é necessário o pré-tratamento do inóculo usado no biorreator, de forma a reduzir essas espécies (LAMAISON et al., 2014). Os tratamentos mais utilizados são o pré-tratamento ácido (pH 3 durante 24 h) e o pré-tratamento térmico (90-105 °C durante 10-120 min), isto porque as bactérias produtoras de H_2 são geralmente formadoras de esporos, sobrevivendo sob condições adversas de temperatura e pH em comparação com as consumidores de H_2 , que geralmente não formam esporos (BARCA et al., 2015).

Lamaison et al. (2014) aplicaram três pré-tratamentos no lodo anaeróbio (pré-tratamento térmico a 98°C por 15 minutos, pré-tratamento térmico seguido por lavagem do lodo em um reator contínuo de mistura completa e lavagem do lodo) proveniente de um UASB de tratamento de suinocultura para posterior utilização na produção de H_2 em reatores em batelada alimentados com água residuária do processamento da mandioca. O lodo pré-tratado termicamente e o lodo submetido ao tratamento térmico seguido de lavagem apresentaram

produção de hidrogênio cerca de quatro vezes maior que o lodo não tratado; já o lodo que sofreu apenas lavagem gerou dez vezes mais H_2 que o lodo sem tratamento.

Rosa et al. (2014b) avaliaram o efeito da fonte de inóculo tratado termicamente (lodo de suínos e lodo de aves de capoeira) na produção de hidrogênio a partir de $5 \text{ g}_{\text{DQO}} \cdot \text{L}^{-1}$ de soro de queijo realizada em dois RALFs suportados com poliestireno, a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, em diferentes TDHs (4, 2 e 1 h), obtendo o maior HY de $1,33 \text{ mol} \cdot \text{mol}^{-1}_{\text{lactose}}$ com o uso de lodo de suinocultura no TDH de 4 h.

3.5.4 Influência do substrato

Para um bom rendimento de hidrogênio, são necessários substratos com quantidades significativas de matéria orgânica. Neste sentido, muitos resíduos industriais são utilizados como fonte de carbono para produzir hidrogênio e, cada material, exige a seleção individual de condições de processamento ótimas na fermentação anaeróbia. (PAWAR e VAN NIEL, 2013; URBANIEC e BAKKER, 2015).

Dentre os vários substratos já utilizados para produção anaeróbia de biohidrogênio, temos os listados na Tabela 6.

Kim e Kim (2012) aplicaram várias fontes de carbono (xilose, glicose, galactose, sacarose, celobiose e amido para produção termofílica ($60 \text{ }^\circ\text{C}$) de hidrogênio utilizando cultura mista anaeróbia de um CSTR alimentado com resíduos de processamento de tofu. A ordem crescente das capacidades de produção de H_2 foi: sacarose > galactose > glicose > celobiose > amido > xilose. O máximo HY ($3,17 \text{ mol}_{H_2} \cdot \text{mol}^{-1}_{\text{hexose}}$) foi conseguido a partir de sacarose.

Martins e Pereira (2013) testaram três substratos (lactato de sódio, formiato de sódio e etanol) na produção de hidrogênio em batelada por meio de bactérias redutoras de sulfato em um reator anaeróbio de tanque agitado (ASTR) a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, sendo observada a maior produção a partir de formiato ($320 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}_{\text{meio}}$ de H_2). Com o uso de lactato e etanol foram originados 21 e $5 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}_{\text{meio}}$ de H_2 , respectivamente.

Tabela 6: Substratos utilizados para a produção biológica de hidrogênio.

Substrato	Referência
Amido	Lee et al. (2008)
	Lin et al. (2008)
	Oztekin et al. (2008)
	Akutsu et al. (2009)
Águas residuais de refinaria	Mohan et al. (2007)
	Fernández et al. (2008)
	Won et al. (2013)
Glicose	Amorim et al. (2009)
	Ding et al. (2009)
	Amorim et al. (2012)
Celulose	Liu et al. (2008)
Efluente de coco	Martins e Amorim (2016)
Glicerina	Seifert et al. (2009)
	Lovato (2014)
Manipueira	Sreethawong et al. (2010)
	Niu et al. (2011)
	O-Thong et al., 2011
	Wang et al. (2011)
	Amorim et al. (2014)
	Intanoo et al. (2014)
	Lamaison et al. (2014)
Soro de queijo	Yang et al. (2007)
	Azbar et al. (2009)
	Castelló et al. (2009)
	Davila-Vazquez et al. (2009)
	Ottaviano (2014)
	Lima (2015)
Vinhaça de cana-de-açúcar	Espinoza-Escalante et al. (2009)
	Júnior (2013)
	Lee et al. (2014)
	Santos (2014)
Xilose	Reis et al. (2015)
	Lo et al. (2007)
Xarope de cana-de-açúcar	Qiu et al. (2016)
Óleo de palma	Nualsri et al. (2016)
Resíduos alimentícios	Ohimain e Izah (2017)
	Jo et al. (2008)
Sacarose	Shi et al. (2009)
	Lutpi et al. (2016)
Bagaço de cana-de-açúcar	Ratti et al. (2015)

Fonte: Autora (2018)

3.5.5 Influência do material suporte

O tipo de material suporte utilizado para garantir a adesão dos microrganismos em reatores anaeróbios durante a produção biológica de hidrogênio afeta consideravelmente o rendimento e a produção a serem obtidas (GOKFILIZ e KARAPINAR, 2017).

Diferentes suportes têm sido avaliados na produção de hidrogênio. Barros e Silva (2012), em seu trabalho sobre a produção de hidrogênio e etanol em três RALFs contendo glicose (4 g.L^{-1}) como substrato em pH 5 e a $23 \text{ }^\circ\text{C}$, avaliaram a performance de três materiais suportes (poliestireno, pneu triturado e politereftalato de etileno- PET), observando que o melhor desempenho para a produção de hidrogênio ($2,11 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}^{-1}_{\text{glicose}}$) foi alcançado com uso de pneu triturado.

Júnior et al. (2015) testaram quatro materiais suporte (argila expandida, carvão vegetal, cerâmica porosa e polietileno de baixa densidade) quanto a produção de hidrogênio a partir de vinhaça de cana de açúcar em reator anaeróbio de leito empacotado (APBR - anaerobic up-flow packed-bed reactor) a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, com TDH de 24 h e COV de $36,2 \text{ kg}_{\text{DQO}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$, verificando que o polietileno foi o material mais apropriado para a produção de hidrogênio, com máxima HPR de $509,5 \text{ mL}_{\text{H}_2} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}_{\text{reator}}$ e HY máximo de $3,2 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}^{-1}_{\text{carboidrato total}}$.

Gokfiliz e Karapinar (2017) analisaram o efeito de vários materiais suporte (esponjas de aço inoxidável, pedra vulcânica, tule, fibra de poliéster, esponja de esponja, esponja de banho de plástico, esponja do mar e esponjas biológicas de aquário) na produção de hidrogênio imobilizada por digestão anaeróbia em batelada a $55 \text{ }^\circ\text{C}$, a partir de solução de trigo residual em diferentes concentrações e com lodo anaeróbio termicamente tratado. O maior HY ($1,96 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}^{-1}_{\text{glicose}}$) e a máxima HPR ($7,39 \text{ mL}_{\text{H}_2} \cdot \text{h}^{-1}$) foram obtidos com partículas de fibra de poliéster com concentração inicial de açúcares totais de $13 \pm 1 \text{ g.L}^{-1}$.

3.5.6 Influência do tempo de detenção hidráulica

O TDH é o tempo em que o líquido fermentativo permanece no reator e, portanto, afeta a eficiência da absorção do substrato, a população microbiana e as vias metabólicas (NUALSRI et al., 2016). Conforme relatado por Bharathiraja et al. (2016), o uso de TDHs baixos ajuda a restringir o crescimento de arqueas metanogênicas, beneficiando a produção de hidrogênio.

Amorim et al. (2014) analisaram a influência do TDH (8 a 1 h) e da COV (28 a $161 \text{ kg}_{\text{DQO}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$) na produção biológica de hidrogênio a partir de água residuária da mandioca com DQO de 4 g.L^{-1} em um RALF inoculado com lodo de suinocultura em pH 5. O HY

aumentou de 0,13 para 1,91 mol_{H₂}.mol⁻¹_{glicose} quando o TDH foi reduzido de 8 para 2 h e a HPR aumentou de 0,20 para 2,04 L.h⁻¹.L⁻¹ com a diminuição do TDH de 8 para 1 h.

Ottaviano et al. (2016) avaliaram o efeito do TDH (8, 6, 4, 2, 1 e 0,5 h) na produção de hidrogênio em dois RALFs operados à 55 °C a partir de diferentes concentrações de solução de soro de queijo (2,8 a 14,6 g_{lactose}.L⁻¹). No RALF1, alimentado com concentração fixa de 4,9 g_{lactose}.L⁻¹, a máxima HPR foi 4,1 ± 0,2 L_{H₂}.h⁻¹.L⁻¹ no TDH de 0,5 h e o maior HY foi 3,67 ± 0,59 mol_{H₂}.mol⁻¹_{lactose} no TDH de 4 h.

3.5.7 Influência da carga orgânica volumétrica

A carga orgânica volumétrica é um fator importantíssimo na produção de hidrogênio, pois a mesma relaciona a concentração do substrato com o TDH utilizado no reator, os quais são dois outros parâmetros que, separadamente, também influenciam nesta produção (AMORIM, 2012). A relação é demonstrada na Equação 13.

$$\text{COV} = \frac{\text{DQO}_{\text{afluente}}}{\text{TDH}} \quad (13)$$

Vários pesquisadores que trabalharam com RALF verificaram que com o aumento da COV são produzidos maiores rendimentos de hidrogênio e que este comportamento ocorre até certo ponto, a partir do qual, o incremento da COV começa a provocar uma redução desse rendimento (AMORIM, 2009; AMORIM, 2012; BARROS, 2009, SHIDA et al., 2012, SANTOS et al., 2014). Segundo os mesmos, esse fato pode ser explicado pelo fato de que COVs muito elevadas podem sobrecarregar o reator ou até por limitações cinéticas.

Barros (2009) ao analisar a produção de hidrogênio em três reatores anaeróbios de leito fluidificados com diferentes materiais suporte e com glicose como fonte de substrato, observou um aumento linear da COV com a produção volumétrica de hidrogênio do TDH de 8 h até o TDH de 1 h em todos os reatores. Também constataram que o rendimento de hidrogênio aumentou com o aumento da COV quando o TDH foi reduzido de 8 h para 2 h; já no TDH de 1 h e 0,5 h, o rendimento de hidrogênio reduziu.

Amorim (2012) observou que ao aumentar a COV de 28 kg.m⁻³.d⁻¹ para 161 kg.m⁻³.d⁻¹, a HPR passou de 0,20 para 2,04 L.h⁻¹.L⁻¹. Já o HY teve um pequeno aumento quando a COV passou de 28 kg.m⁻³.d⁻¹ (0,31 mol_{H₂}.mol⁻¹_{glicose}) para 126 kg.m⁻³.d⁻¹ (1,91 mol_{H₂}.mol⁻¹_{glicose}) e ao aumentar a COV para 161 kg.m⁻³.d⁻¹, o rendimento diminuiu para 1,20 mol_{H₂}.mol⁻¹_{glicose}.

Shida et al. (2012) avaliaram o efeito da COV, entre 19 e 140,6 kg_{DQO}.m⁻³.d⁻¹, em dois RALFs operados a 30 °C, alimentados com glicose. Foram obtidos rendimentos máximos de 2,45 e 1,90 mol_{H₂}.mol⁻¹_{glicose} nos reatores na COV de 84,3 kg_{DQO}.m⁻³.d⁻¹. As maiores HPR foram 0,95 e 0,76 L.h⁻¹.L⁻¹ na COV de 140,6 g_{DQO}.m⁻³.d⁻¹.

Santos et al. (2014) verificaram o aumento da produção de hidrogênio a partir da vinhaça ao aumentar a COV através da diminuição do TDH de 6 a 1 h, obtendo os valores de 0,45 a 1,49 L_{H₂}.h⁻¹.L⁻¹ (17,5 a 58,5 mmol_{H₂}.h⁻¹.L⁻¹) e 0,54 a 1,20 L_{H₂}.h⁻¹.L⁻¹ (21,4 a 47,3 mmol_{H₂}.h⁻¹.L⁻¹) nos reatores, RALF1 com 15 g_{DQO}.L⁻¹ e RALF2 com 20 g_{DQO}.L⁻¹, respectivamente.

3.6 Melaço de Cana-de-Açúcar

O melaço, também denominado “mel”, é um líquido escuro, viscoso e adocicado, gerado em grande quantidade durante a fabricação de açúcar, na etapa de centrifugação, sendo geralmente destinado a produção de álcool. A Figura 5 ilustra um fluxograma do processo produtivo de açúcar com a geração de melaço e outros subprodutos.

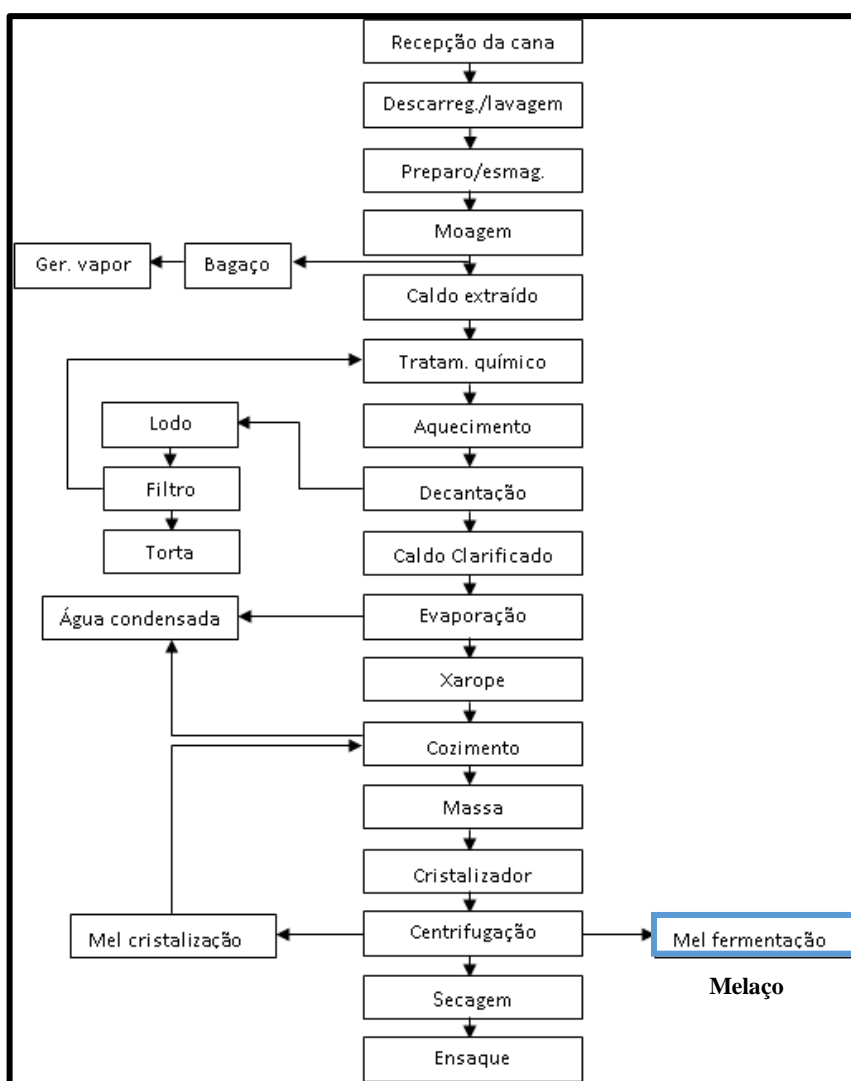
Segundo Piacente (2005) cada tonelada de cana processada gera de 40 a 60 quilos de melaço. Sua composição depende de vários fatores, como por exemplo, do tipo e do grau de maturação da cana de açúcar utilizada e do clima. Em Faria (2014) é apresentada a constituição geral do melaço (Tabela 7).

Tabela 7: Composição do melaço de cana de açúcar

Componentes (Teor)		Minerais (%)		Minerais traço		Vitaminas (mg/kg)	
Concentração de sólidos	79,5 ° Brix	Potássio	2,4	Ferro	249	Colina	745
Sólidos totais	75,0 %	Cloro	1,4	Cobre	36	Ácido pantotênico	21
Extrato livre de nitrogênio	63,0 %	Cálcio	0,8	Manganês	35	Riboflavina	1,8
Açúcares totais	46,0 %	Enxofre	0,5	Zinco	13	Tiamina	0,9
Cinzas	8,1 %	Sódio	0,2			Biotina	0,36
Proteínas	3,0 %	Fósforo	0,08				

Fonte: Adaptado de Faria (2014)

Figura 5: Fluxograma do processo de produção de açúcar, com geração de melaço e outros subprodutos.



Fonte: Autora (2018)

O melaço de cana de açúcar é um substrato adequado a fermentação devido ao fato de possuir em média 90 °Brix (teor de sólidos solúveis), dos quais cerca de 60% corresponde a açúcares redutores (glicose e frutose) que são facilmente degradados durante a digestão anaeróbia (SILVA, 2008). Considerando essa característica, alguns autores investigam a sua utilização para variados fins. Guilman et al. (2000) investigaram a produção de etanol por *Zymomonas mobilis* em melaço de cana de açúcar puro e pré-tratado com invertase. Silva (2008) estudou a produção enzimática de frutooligossacarídeos a partir de melaço de cana de açúcar. Behera et al. (2012) utilizaram esta mesma matéria-prima para a produção de bio-etanol usando a bactéria *Zymomonas mobilis*.

Onodera et al. (2013), em seu estudo sobre o sistema de tratamento para águas residuais do melaço, verificaram que os efeitos da inibição de cátions presentes nos processos de degradação anaeróbia não são reduzidos por meio da recirculação do efluente, mas são

minimizados através da diluição do melão em água. Visando avaliar o efeito do uso de processos de pós-tratamento nas concentrações de íons potássio e sódio em reatores anaeróbios, os autores promoveram um sistema de tratamento de águas residuais de melão de cana de açúcar com até $120 \text{ g}_{\text{DQO}} \cdot \text{L}^{-1}$, constituído pela combinação sequencial de um reator de acidificação com volume de 23,6 L alimentado pelo melão, um reator de leito de enchimento (USSB – Upflow Staged Sludged Bed) de 13,4 L, um reator UASB de 8,8 L e um reator de dois estágios contendo filtro aeróbio submerso (DHS: down-flow hanging sponge), com volume de 6,7 L. Os três primeiros foram operados a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ e o último a temperatura ambiente. No USSB a COV alcançou $11 \text{ kg}_{\text{DQO}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ com recuperação de 62,4% de metano na DQO de $120 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. O efluente final apresentou $4,52 \text{ g}_{\text{DQO}} \cdot \text{L}^{-1}$. O sistema foi eficiente quanto a remoção de enxofre e a nitrificação. Os cátions inibidores da degradação anaeróbia reduziram a performance do reator USSB.

No trabalho de Barros (2013) foi analisada a produção biológica de metano em dois reatores UASB mesófilicos, R1(40,5 L) e R2 (21,5 L), a partir de melão e vinhaça de cana de açúcar diluídos e suplementados com fósforo e nitrogênio, operados separadamente por 350 dias, com TDHs de 2,8 e 1,8 d, COVs com aumento gradual até 7,5 e $11,5 \text{ g}_{\text{DQO}_{\text{total}}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, respectivamente, e inoculados com lodo granulado de reatores UASB que tratavam águas residuais de suinocultura. Nos primeiros 230 dias utilizou-se a vinhaça como afluente, obtendo produção volumétrica de metano crescente com o aumento da COV, atingindo valores de até $0,8 \text{ L}_{\text{CH}_4} \cdot (\text{L d})^{-1}$ no R1 e de $1,3 \text{ L}_{\text{CH}_4} \cdot (\text{L d})^{-1}$ no R2. As eficiências de remoção de $\text{DQO}_{\text{total}}$ variaram de 49 a 82%. Nos dias 231 a 308 trabalhou-se com o melão de cana-de-açúcar, ocasionando a diminuição da produção volumétrica de metano nos reatores R1 e R2 para 0,294 e $0,163 \text{ L}_{\text{CH}_4} \cdot (\text{L d})^{-1}$, respectivamente. De 309 a 350 dias empregou-se novamente a vinhaça.

Júnior (2013), descreveu a produção de metano a partir de vinhaça e melão em dois reatores UASB termofílicos em série, R1 e R2, com volumes de 13,7 e 10,6 L, mantidos em cabine com sistema de aquecimento controlado para 55°C por 387 dias. Inicialmente foi utilizada a vinhaça como substrato dos reatores, a qual, na entressafra, foi substituída pelo melão, e, após esse período, empregou-se novamente a vinhaça. Variou-se as COVs de 0,15 a $12,50 \text{ g}_{\text{DQO}_{\text{total}}} \cdot (\text{L d})^{-1}$. As melhores eficiências de remoção de $\text{DQO}_{\text{total}}$ e DQO_{diss} foram observadas com a aplicação de COV de 0,15 a 3,50 e 3,50 a $7,0 \text{ g}_{\text{DQO}_{\text{total}}} \cdot (\text{L d})^{-1}$, com a utilização da vinhaça como afluente, e foram de 55 e 51%, respectivamente, para o sistema (R1 + R2). Os maiores valores de produção volumétrica de metano foram de 0,205 e $0,365 \text{ L}_{\text{CH}_4} \cdot (\text{L d})^{-1}$ e ocorreram com a aplicação de COV de 7,5 a 12,5 e de 6,5 a $11,3 \text{ g}_{\text{DQO}_{\text{total}}} \cdot (\text{L d})^{-1}$ utilizando como afluente a vinhaça, no R1 e R2, respectivamente.

O desempenho de três reatores UASB bioprodutores de metano a partir de melão de cana de açúcar foi avaliado por Faria (2014). O primeiro reator, construído em PVC e com volume de 105 L, operado em temperatura mesofílica, tinha como afluente o melão diluído (suplementado com diHidrogenofosfato de Potássio Monobásico (KH_2PO_4) e bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3)) e inóculo proveniente de um reator UASB termofílico que tratava vinhaça; trabalhou com TDH de 24 h e COV de até $15 \text{ g}_{\text{DQOtotal}} \cdot (\text{L} \cdot \text{d})^{-1}$, obtendo os máximos de $0,97 \text{ L}_{\text{CH}_4} \cdot (\text{L} \cdot \text{d})^{-1}$ e $0,194 \text{ L}_{\text{CH}_4} \text{ g}^{-1}_{\text{DQOtotal removida}}$ para as produções volumétrica e específica de metano, respectivamente. A remoção de DQO variou entre 64% a 72%. Os outros dois reatores, termofílicos, com volumes de 12,1 e 5,6 L, operavam em série e tinham a vinhaça como substrato. Um recebia vinhaça diluída (substrato) e o melão tratado no primeiro UASB (inóculo) e o outro utilizava o efluente do primeiro como seu afluente. Neste caso, os TDHs foram 16 e 7,5 h, equivalentes as COVs de 20 e $35 \text{ g}_{\text{DQOtotal}} \cdot (\text{L} \cdot \text{d})^{-1}$, os valores máximos das produções volumétrica e específica de metano foram $0,46 \text{ L}_{\text{CH}_4} \cdot (\text{L} \cdot \text{d})^{-1}$ e $0,16 \text{ L}_{\text{CH}_4} \text{ g}^{-1}_{\text{DQOtotal removida}}$.

3.6.1 Biohidrogênio a partir do melão de cana-de-açúcar

Diversos resíduos industriais são estudados como fonte produtora de biogás. Vários estudiosos utilizaram o melão como substrato para produção biológica de hidrogênio, sob diversas condições operacionais.

Quando o melão é utilizado para a produção de etanol, apresenta como subproduto a vinhaça, uma água residuária com carga poluente de grande impacto ambiental (SEARMSIRIMONGKOL et al., 2011), logo, uma alternativa para a sua utilização, que gera energia renovável e não agride o meio ambiente, é o uso para produção de hidrogênio em reatores anaeróbios.

Ren et al. (2006) monitoraram a produção biológica de hidrogênio num estudo em escala-piloto realizado em um reator contínuo de fermentação anaeróbia (volume de 2 m^3), a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ e pH entre 5 e 6,5. O sistema foi operado sob diferentes cargas orgânicas volumétricas ($3,11$ a $85,57 \text{ kg}_{\text{DQO}} \cdot \text{m}^{-3}_{\text{reator}} \cdot \text{d}^{-1}$), com variação no TDH de 10,57 para 3,9 h e teve melão coletado em uma refinaria de açúcar da China como fonte de matéria orgânica. A razão DQO:N:P do afluente foi mantida em 200-300:5:1 através da adição de fertilizante sintético, utilizando substrato a $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. O rendimento de hidrogênio aumentou quando a COV mudou de 3,11 para $68,21 \text{ kg}_{\text{DQO}} \cdot \text{m}^{-3}_{\text{reator}} \cdot \text{d}^{-1}$, mas diminuiu quando a COV foi elevada de $68,21 \text{ kg}_{\text{DQO}} \cdot \text{m}^{-3}_{\text{reator}} \cdot \text{d}^{-1}$ para $85,57 \text{ kg}_{\text{DQO}} \cdot \text{m}^{-3}_{\text{reator}} \cdot \text{d}^{-1}$. A máxima produção volumétrica de hidrogênio foi $5,57 \text{ m}^3_{\text{H}_2} \cdot \text{m}^{-3}_{\text{reator}} \cdot \text{d}^{-1}$ (COV: $27,98 \text{ kg}_{\text{DQO}} \cdot \text{m}^{-3}_{\text{reator}} \cdot \text{d}^{-1}$) e o rendimento máximo foi $8,25 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$ ou

(COV: $68.21 \text{ kg}_{\text{DQO}} \cdot \text{m}^{-3}_{\text{reator}} \cdot \text{d}^{-1}$). O conteúdo de hidrogênio no biogás variou de 40% a 52%. Os principais metabólitos verificados foram o etanol e o ácido acético, com percentagem total representando 80% dos SMPs e a eficiência de remoção de DQO variou de 20% a 30%.

Li et al. (2007) produziram hidrogênio a partir de melão de açúcar de beterraba por fermentação em um reator anaeróbio com compartimentos (ABR), constituído de três partes e com 27,48 L de volume efetivo, operado a 35 °C e pH entre 3,5 e 6,8 por 55 dias, com estabilização registrada após 26 dias de operação. Utilizaram lodo ativado aeróbio proveniente de uma ETE de cerveja como inóculo. O melão foi diluído em água para obter DQO de $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ e por meio da adição de fertilizante sintético manteve a proporção DQO:N:P de 300-500:5:1. O ABR foi operado com TDH de 13,5 h e COV de $8,89 \text{ kg}_{\text{DQO}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$. Os compartimentos apresentaram rendimentos máximos e conteúdos de hidrogênio diferentes. O HY total chegou a $32,51 \text{ L} \cdot \text{d}^{-1}$. Foram atingidos 51%, 60% e 51% de conteúdo de H_2 , no primeiro, segundo e terceiro compartimentos, respectivamente. No estado estacionário, o etanol e o ácido acético foram os principais produtos fermentativos, chegando a representar 70% dos metabólitos totais produzidos (SMPs) no primeiro compartimento, com indícios de fermentação tipo etanol. A eficiência média de remoção de DQO no reator foi 9,4%.

Guo et al. (2008) estudaram a produção de biohidrogênio a partir da fermentação tipo-etanol do melão em um reator granular de leite expandido de 3,35 L suportado com carbono granular ativado e inoculado com lodo de efluente doméstico. O melão de açúcar de beterrada chinês foi utilizado diluído em água e suplementado com fertilizante sintético para manter a razão DQO:N:P em torno de 500-1000:5:1. O EGSB foi operado a temperatura de 35 °C e pH entre 3,88 e 5,33, com variações na DQO e no TDH, iniciando com uma COV de $8 \text{ kg}_{\text{DQO}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$, equivalente a $2 \text{ g}_{\text{DQO}} \cdot \text{L}^{-1}$ e TDH de 6 h. A DQO variou de $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ a $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ e o TDH de 6 a 1 h, obtendo $0,71 \text{ L} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ de taxa máxima de produção de hidrogênio e $3,47 \text{ mol} \cdot \text{mol}^{-1}_{\text{sacarose}}$ de rendimento de hidrogênio na COV de $120 \text{ kg}_{\text{DQO}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ (TDH: 2 h e $10 \text{ g}_{\text{DQO}} \cdot \text{L}^{-1}$). Etanol e ácido acético foram os principais metabólitos produzidos, representando, após estabilização, 89,1% dos produtos líquidos totais. O conteúdo de hidrogênio no biogás variou de 30% a 53%.

Wang e Jin (2009) avaliaram a produção de H_2 em um biorreator em escala laboratorial (BioFlo 110) de 1,5 L, sob modo batelada, a partir de variadas condições, utilizando melão de uma indústria australiana como fonte de matéria orgânica e uma cultura pura como inóculo, a *Clostridium butyricum* W5. Eles estudaram a concentração inicial do substrato (20, 40, 60, 80, 100 e $120 \text{ g}_{\text{DQO}} \cdot \text{L}^{-1}$) a temperatura (30 a 45 °C) e o pH do meio (5,5 a 7,5), obtendo os melhores rendimento e produção de H_2 nas condições de $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de melão, a 39 °C e pH 6,5, equivalentes a um HY de $1,85 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}^{-1}_{\text{hexose}}$ e HPR de $17,38 \text{ mmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$. A eficiência de

conversão de açúcar variou entre 90,97% e 96,06%. Os ácidos acético, butírico e láctico foram os principais ácidos graxos encontrados nos produtos líquidos da fermentação e nenhum solvente foi detectado.

No estudo de Han et al. (2010) foi analisada a bioprodução de H_2 em um CSTR de 12,5 L a 35 °C contendo carbono ativado, lodo de ETE e melão de uma refinaria de açúcar de beterraba da China, em TDH de 6 h, sob concentrações afluentes de 4, 2 e 6 $g_{DQO} \cdot L^{-1}$, equivalente às COVs de 16 $kg_{DQO} \cdot m^{-3} \cdot d^{-1}$, 8 $kg_{DQO} \cdot m^{-3} \cdot d^{-1}$ e 24 $kg_{DQO} \cdot m^{-3} \cdot d^{-1}$ e as remoções de DQO em torno de 30%, 23% e 12%, respectivamente. O HY máximo foi alcançado na COV de 24 $kg_{DQO} \cdot m^{-3} \cdot d^{-1}$, com valor de 6,06 $L_{H_2} \cdot d^{-1}$. Após estabilização, os produtos líquidos foram compostos principalmente por acetato e etanol, com somatório de 89% em relação ao total de metabólitos.

Lay et al. (2010) implementaram a produção de hidrogênio em um CSTR de 4 L, a 35 °C, inoculado com lodo de ETE e alimentado com melão a 40 $g_{DQO} \cdot L^{-1}$, em TDHs de 24, 12, 8, 6, 4 e 3 h. O pH foi mantido em torno de 5,5. A HPR aumentou com o aumento da COV, tendo ápice de 390 $mmol_{H_2} \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$ (TDH de 3 h e COV de 320 $g_{DQO} \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$); já o HY aumentou entre as COVs de 40 e 80 $g_{DQO} \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$, onde alcançou o máximo de 2.1 $mol_{H_2} \cdot mol^{-1}_{hexose}$ (TDH de 12 h) e reduziu a partir da COV de 120 $g_{DQO} \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$ até um rendimento mínimo de 0,9 $mol_{H_2} \cdot mol^{-1}_{hexose}$ (TDH de 3 h). O conteúdo de hidrogênio no biogás gerado aumentou de 35,9% (TDH 24 h) a 51,7% (TDH 3 h). Houve maiores produções de butirato, acetato, propionato, valerato e etanol nos SMPs, nesta ordem. A degradação do açúcar variou entre 60,2% e 74,9%.

Park et al. (2010) utilizaram o melão de cana de açúcar de uma refinaria da Coreia do Sul para produzir hidrogênio e metano por meio de digestão anaeróbia em dois estágios. O processo consistiu de dois reatores de leito empacotado (PBR): um reator hidrogênico de primeiro estágio operado a 35 °C com pH 5,5 que produziu hidrogênio a partir de melão diluído com taxa máxima de 2,8 ($\pm 0,22$) $L_{H_2} \cdot L^{-1} \cdot reactor \cdot d^{-1}$ no TDH ótimo de 6h, e um reator metanogênico de segundo estágio em pH 7 e a 35 °C com uma taxa de produção de 1,48 ($\pm 0,09$) $L_{CH_4} \cdot L^{-1} \cdot reactor \cdot d^{-1}$ no TDH ótimo de 6 d e eficiência de remoção de DQO de 79,8%. O melão foi diluído com água destilada na proporção de 1/40, apresentando 28 $g \cdot L^{-1}$ de DQO, 900 $mg \cdot L^{-1}$ de nitrogênio total e 15 $mg \cdot L^{-1}$ de fosfato. O inóculo utilizado foi obtido de uma planta de tratamento de efluente doméstico. Os reatores eram de acrílico e tinham um volume de 2,5 L, suportados com partículas de poliuretano, dos quais, 1,5 L foram inoculados e o restante consistia de melão diluído. O primeiro reator operou com TDHs de 24, 12, 8, 6 e 5 h; já o segundo trabalhou com uma variação de 15, 8, 7, 6, 5 e 4 dias. Os principais metabólitos encontrados foram acetato, butirato, lactato e propionato.

Chang et al. (2011) realizaram a produção biológica de H_2 a partir de melaço proveniente uma refinaria de açúcar da China em um reator anaeróbio de contato (ACR) de 12 L a 35 °C, sob TDH de 6 h e COVs de 20, 28, 36 e 44 $kg_{DQO}.m^{-3}.d^{-1}$, correspondentes as DQOs de 5, 7, 9 e 11 $g.L^{-1}$, por um período de 95 dias. O pH oscilou entre 4,7 e 6,2 e o inóculo consistiu de lodo de ETE. A produção volumétrica e o rendimento de hidrogênio alcançaram valores máximos de 3,51 $L_{H_2}.L^{-1}.d^{-1}$ e 1,40 $mol_{H_2}.mol^{-1}_{\text{glicose-consumida}}$, respectivamente, na COV de 44 $kg_{DQO}.m^{-3}.d^{-1}$. A percentagem de hidrogênio no biogás variou de 12 % a 46%. A degradação do açúcar manteve-se entre 72% e 85%. Foi constatada a fermentação tipo etanol, com o etanol e o ácido acético contribuindo com 80,7% dos produtos líquidos totais.

No trabalho de Han et al. (2012a) foi implementado um CSTR de 12,5 L para produzir hidrogênio e etanol a partir de melaço em diferentes COVs (8, 16, 24 e 32 $kg.m^{-3}.d^{-1}$), obtidas a partir da variação da DQO do substrato (2, 4, 6 e 8 $g.L^{-1}$). O reator foi operado na temperatura de 35 °C e inoculado com lodo de tratamento de águas residuais da China. As taxas de produção de hidrogênio e etanol aumentaram com o incremento da COV de 8 a 24 $kg.m^{-3}.d^{-1}$, atingindo os valores máximos de 12,4 $mmol_{H_2}.h^{-1}.L^{-1}$ e 20,27 $mmol^{-1}_{EtOH}.h^{-1}.L^{-1}$ na COV de 24 $kg.m^{-3}.d^{-1}$ (6 $g_{DQO}.L^{-1}$), representando um total de taxa de conversão de energia de 31,23 $kJ.h^{-1}.L^{-1}$. Com a aplicação da COV de 32 $kg.m^{-3}.d^{-1}$ houve o decréscimo dessas taxas, devido a possível inibição das produções H_2 e EtOH sob altas COVs. Na COV ótima (24 $kg.m^{-3}.d^{-1}$) o etanol e o ácido acético representaram 82% dos metabólitos produzidos na fermentação.

Han et al. (2012b) avaliaram o efeito da COV (8, 16, 24 e 32 $kg.m^{-3}.d^{-1}$) na produção de H_2 a partir de melaço em um reator contínuo de lodo imobilizado (CMISR), de 17 L, suportado com carvão ativado, sob DQOs afluentes de 2 a 6 $g.L^{-1}$, TDH de 6 h e temperatura de 35 °C. O reator foi inoculado com lodo de ETE e estabilizou com características de fermentação tipo etanol, em pH em torno de 4,06 e 4,28 com o acetato e o etanol representando 89,3% dos SMPs. O conteúdo de H_2 no biogás gerado e a remoção de DQO chegaram a 46,6% e 13%, respectivamente. Os valores máximos da HPR e do HY foram, 12,51 $mmol_{H_2}.h^{-1}.L^{-1}$ ou 1,09 $m^3_{H_2}.m^{-3}.d^{-1}$ (COV de 32 $kg.m^{-3}.d^{-1}$) e 130,57 $mmol_{H_2}.mol^{-1}_{DQO\text{ consumida}}$ (COV de 16 $kg.m^{-3}.d^{-1}$), respectivamente.

Li et al. (2013), a partir de fermentação tipo etanol, verificaram o efeito da carga orgânica volumétrica do lodo (SLR) inicial na produção de hidrogênio em um CSTR de 17 L a 35 °C alimentado com melaço a 2 $g_{DQO}.L^{-1}$, coletado de uma refinaria de açúcar de beterraba chinesa. A fonte de microrganismos foi proveniente de uma ETE. O pH do afluente e a COV foram mantidos em 6,5 e 6 $kg_{DQO}.m^{-3}_{Reactor}.d^{-1}$ (TDH de 8 h e DQO de 2 $g.L^{-1}$). Na condição ótima, com SLR inicial de 1,47 $kg_{DQO}.kg^{-1}_{MLVSS}.d^{-1}$, após estabilização, o etanol e o ácido

acético representaram 71,5% dos produtos solúveis totais, o pH do efluente manteve-se em torno de 4,57, o HY maximizou em 4,77 $L_{H_2}.d^{-1}$ e o conteúdo de H_2 no biogás representou 55,91%.

Wang et al. (2013) analisaram a produção de biohidrogênio em um reator contínuo de tanque agitado de 6 L, em fermentação tipo-etanol, utilizando melão como substrato numa faixa de pH entre 4,3 e 4,4 e temperatura mesofílica de 35 °C. O melão foi diluído em água apresentando 8 $g_{DQO}.L^{-1}$ e recebeu a adição de fertilizante sintético para manter a razão DQO:N:P em 1000:5:1. O inóculo foi obtido de uma planta de tratamento de efluente municipal local. Foi examinado o efeito de cinco TDHs, variando de 10 a 4 h. A taxa máxima de produção de hidrogênio (12,27 $mmol.L^{-1}.h^{-1}$) foi alcançada no TDH de 5 h, correspondendo a uma taxa de produção de energia de 15,50 $kJ.L^{-1}.h^{-1}$. A eficiência de remoção de DQO variou entre 31,6% e 39,2%.

Zhu et al. (2013) realizaram a produção de hidrogênio por meio de fermentação tipo etanol, a partir de melão de açúcar de beterraba em um CSTR de 16 L. O reator foi operado a 35 °C, em TDH de 8 h e COVs de 12 e 18 $kg_{DQO}.m^{-3}.d^{-1}$, equivalentes a 4 e 6 $g_{DQO}.L^{-1}$, respectivamente. O inóculo consistiu de lodo proveniente de uma estação de tratamento de águas residuais de cerveja da China e o pH do efluente variou entre 4,1 e 4,5. Foi alcançada 45% de eficiência de remoção de DQO. O HY variou entre 4,5 e 6,0 $L_{H_2}.d^{-1}$ na COV de 12 $kg_{DQO}.m^{-3}.d^{-1}$ e alcançou o valor máximo de 10,8 $L_{H_2}.d^{-1}$ na COV de 18 $kg_{DQO}.m^{-3}.d^{-1}$. O etanol e o ácido acético representaram, após estado estacionário, de 69 a 73% do total de produtos líquidos da fermentação.

Em seu relato sobre o processo biológico de produção de hidrogênio a partir da codigestão de vinhaça e melão realizado em biorreator anaeróbio operado em bateladas sequenciais com imobilização da biomassa (AnSBBR), Albanez (2015) avaliou a influência da composição e concentração do afluente (DQO: 3, 4, 6 e 9 $g.L^{-1}$, COV: 5,1, 6,9, 13,7, e 20,6 $g_{DQO}.L^{-1}.d^{-1}$), do tempo de ciclo (3 e 4 h), da suplementação de micronutrientes, do tipo de alimentação e da necessidade do tratamento de inóculo. Os melhores resultados, obtidos na condição de operação em batelada (tempo de alimentação 5% do tempo de ciclo), com concentração do afluente de 6 $g_{DQO}.L^{-1}$ (67% vinhaça e 33% melão), tempo de ciclo de 3 horas, ausência da suplementação de micronutrientes e inóculo pré-tratado termicamente, apresentaram produtividade molar de hidrogênio de 13,5 $mol_{H_2}.m^{-3}.d^{-1}$, sem produção de metano. As demais condições estudadas mostraram que a produção de hidrogênio foi prejudicada pelo aumento da porcentagem de vinhaça no afluente e pela operação em batelada alimentada. A produtividade e rendimento molares de hidrogênio foram favorecidos pelo

aumento da concentração da matéria orgânica do afluente, pela diminuição do tempo de ciclo, pela ausência da suplementação de micronutrientes e pela realização do tratamento térmico do inóculo.

Rego (2016) investigou a produção de hidrogênio em RALF mesofílico (30 °C) de 0,743 L, a partir de três resíduos agroindustriais provenientes da cana de açúcar (o xarope, o melaço e a vinhaça) e um quarto substrato, sintético, a sacarose. O inóculo foi proveniente de um abatedouro de aves e o suporte de biomassa foi a argila expandida. Ele avaliou os TDHs de 8, 6, 4, 3 e 1 h sob DQO de 5 g.L⁻¹, representando as COVs de 15, 20, 30, 40 e 120 kg_{DQO}.m⁻³.d⁻¹. Para o reator de melaço, a conversão de carboidratos variou entre 85% (TDH 1 h) e 96% (TDH 6 h), a remoção de DQO apresentou-se entre 16% (TDH 2 h) e 29% (TDH 8 h) e o conteúdo de H₂ no biogás esteve entre 23% (TDH 6 h) e 33% (TDH 8 h). A PVH aumentou ao longo da diminuição do TDH de 6 h a 2 h, com valor máximo de 4,8 L_{H2}.L⁻¹.d⁻¹ (TDH 2 h) e diminuiu no TDH de 1 h. Já o HY teve acréscimos entre os TDHs 6 h e 4 h, atingindo o ápice de 1,4 mol_{H2}.mol⁻¹_{sacarose} (TDH de 4 h). Os metabólitos solúveis presentes em maiores quantidades nesse reator foram os ácidos acético, butírico, isobutírico, propiônico e succínico.

Na Tabela 8 seguem resumidas as características dos principais trabalhos que empregaram o melaço de cana de açúcar como substrato para produção biológica de hidrogênio por digestão anaeróbia.

Os resultados demonstram que o melaço de cana de açúcar pode ser utilizado como substrato para a produção de hidrogênio, significando que novas pesquisas devem ser estimuladas a fim de buscar tecnologias que aumentem a produção de hidrogênio a partir do melaço.

Tabela 8: Estudos anteriores que utilizaram o melaço de cana de açúcar para produção de hidrogênio.

Referência	Reator/Volume Temperatura	pH DQO (g.L ⁻¹)	TDH COV	^(a) HPR _{máxima} HY _{máximo}
Ren et al. (2006)	Contínuo/2 m ³ 35 °C	5 a 6,5 3	10,57 a 3,9 h 3,11 a 85,57 kg _{DQO} .m ⁻³ .reator.d ⁻¹	0,23 L _{H2} .L ⁻¹ .Reator.h ⁻¹ 8,25 m ³ .d ⁻¹
Li et al. (2007)	ABR/27,48 L 35 °C	3,5 a 6,8 5	13,5 h 8,89 kg _{DQO} .m ⁻³ .d ⁻¹	----- 32,51 L.d ⁻¹
Guo et al. (2008)	EGSB/3,35 L 35 °C	3,88 a 5,33 2 a 10	6 a 1 h 8 a 192 kg _{DQO} .m ⁻³ .d ⁻¹	0,71 L _{H2} .L ⁻¹ .Reator.h ⁻¹ 3,47 mol.mol ⁻¹ _{sacarose}
Wang e Jin (2009)	Batelada/ 1,5 L 30 a 45 °C	5,5 a 7,5 20 a 120	----- -----	0,44 L _{H2} .L ⁻¹ .Reator.h ⁻¹ 1,85 mol _{H2} .mol ⁻¹ _{hexose}
Han et al. (2010)	CSTR/12,5 L 35 °C	----- 2, 4 e 6	6 h 8, 16 e 24 kg _{DQO} .m ⁻³ .reator.d ⁻¹	----- 6,06 L _{H2} .d ⁻¹
Lay et al. (2010)	CSTR/ 4 L 35 °C	5,5 40	3 a 24 h 40 a 320 g _{DQO} .L ⁻¹ .d ⁻¹	0,41 L _{H2} .L ⁻¹ .Reator.h ⁻¹ 2,1 mol _{H2} .mol ⁻¹ _{hexose}
Park et al. (2010)	PBR/2,5 L 35 °C	5,5 28	24, 12, 8, 6 e 5 h 28 a 134,4 kg.m ⁻³ .d ⁻¹	0,12 L _{H2} .L ⁻¹ .Reator.h ⁻¹ -----
Chang et al. (2011)	ACR/ 12 L 35 °C	4,7 a 6,2 5 a 11	6 h 20 a 44 kg.m ⁻³ .d ⁻¹	0,15 L _{H2} .L ⁻¹ .Reator.h ⁻¹ 1,4 mol _{H2} .mol ⁻¹ _{glicose}
Han et al. (2012a)	CSTR/12,5 L 35 °C	----- 2 a 8	6 h 8 a 32 kg.m ⁻³ .d ⁻¹	0,31 L _{H2} .L ⁻¹ .Reator.h ⁻¹ -----
Han et al. (2012b)	CMISR/17 L 35 °C	4,06 a 4,28 2 a 6	6 h 8 a 32 kg.m ⁻³ .d ⁻¹	0,32 L _{H2} .L ⁻¹ .Reator.h ⁻¹ 130,57 mmol.mol ⁻¹ _{DQO}
Li et al. (2013)	CSTR/17 L 35 °C	6,5 2	8 h 6 kg.m ⁻³ .d ⁻¹	----- 4,77 L _{H2} .d ⁻¹
Wang et al. (2013)	CSTR/6 L 35 °C	4,3 a 4,4 8	10 a 4 h 19,2 a 48 kg.m ⁻³ .d ⁻¹	0,31 L _{H2} .L ⁻¹ .Reator.h ⁻¹ -----
Zhu et al. (2013)	CSTR/17 L 35 °C	4,1 a 4,5 4 e 6	8 h 12 e 18 kg.m ⁻³ .d ⁻¹	----- 10,8 L.d ⁻¹
Albanez (2015)	AnSBBR/6 L 30 °C	----- 3 a 9	3 e 4 h 5,1 a 20,6 g _{DQO} .L ⁻¹ .d ⁻¹	0,014 L _{H2} .L ⁻¹ .Reator.h ⁻¹ -----
Rego (2016)	RALF/ 0,743 L 30 °C	----- 5	8, 6, 4, 3 e 1 h 15 a 120 kg _{DQO} .m ⁻³ .d ⁻¹	0,2 L _{H2} .L ⁻¹ .Reator.h ⁻¹ 1,4 mol _{H2} .mol ⁻¹ _{sacarose}

(a) Convertido para L_{H2}.L⁻¹.Reator.h⁻¹ a partir dos dados originais.

HPR_{máxima} = Taxa de produção de hidrogênio máxima.

HY_{máximo} = Rendimento de hidrogênio máximo.

Fonte: Autora (2018)

3.7 Considerações Finais sobre a Revisão Bibliográfica

Esta revisão bibliográfica apresentou uma ideia geral sobre a produção biológica de hidrogênio, resumiu os métodos bioprodutivos mais conhecidos com suas principais características, dando ênfase ao processo da digestão anaeróbia utilizado na pesquisa, com a apresentação dos principais fatores que influenciam e dos reatores mais utilizados nesse processo. Foram citados vários autores que já estudaram a produção de biohidrogênio a partir

de diferentes configurações de reatores, empregando variados substratos, materiais suporte e inóculos, sendo destacada a produção de hidrogênio em reatores anaeróbios de leito fluidificado. Também foi feita uma descrição das características do substrato empregado neste trabalho para produzir hidrogênio e dos estudos que já o utilizaram para o mesmo fim.

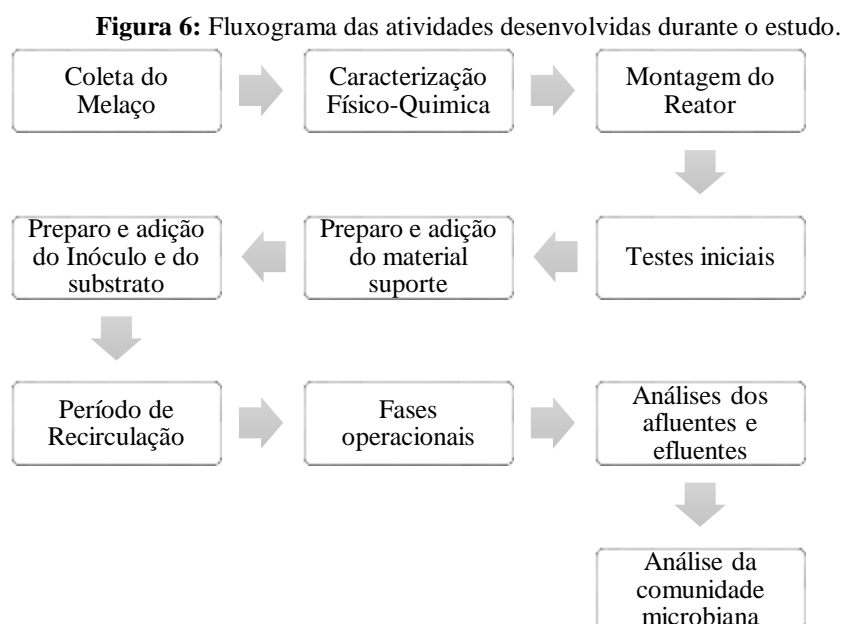
Com esta revisão foi possível entender as variáveis envolvidas na produção de hidrogênio em RALF, ajudando na resolução de problemas ocorridos durante a operação do reator; além disso, foi essencial, para a correta discussão dos resultados obtidos na pesquisa.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste item são apresentados a fonte de substrato usada como matéria-prima para a produção de H₂ e a metodologia para a sua caracterização físico-química, a fonte de inóculo e o tratamento pelo qual passou antes de ser utilizado, o material suporte empregado para adesão de biomassa, bem como as principais configurações, modo operacional, testes operacionais iniciais e partida do RALF. Também são descritas as análises físico-químicas, cromatográficas e biológicas realizadas nas amostras de afluentes e efluentes e a frequência com que essas análises eram feitas, além das equações para os cálculos dos principais parâmetros envolvidos na pesquisa.

O reator anaeróbio de leito fluidificado utilizado para produzir hidrogênio a partir de melaço de cana de açúcar foi instalado e operado dentro do espaço físico conhecido popularmente como “Casinha”, localizado na Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Campus A/C Simões, no Centro de Tecnologia (CTEC). Para o desenvolvimento da pesquisa foram utilizados três laboratórios, todos situados no CTEC da UFAL, Campus A/C Simões, com a seguinte divisão: as análises físico-químicas foram realizadas no Laboratório de Saneamento Ambiental (LSA), as análises cromatográficas e as de biologia molecular ocorreram no Laboratório de Controle Ambiental (LCA) e no Laboratório de Biologia Molecular (LBM), respectivamente.

O Fluxograma apresentado na Figura 6 resume as atividades que foram desenvolvidas.



Fonte: Autora (2018)

4.1 Substrato

O melaço de cana de açúcar foi coletado no dia 21 de outubro de 2016, na usina Caeté S/A, unidade Cachoeira, produtora de açúcar e álcool, localizada no Bairro do Benedito Bentes, em Maceió, Alagoas e ficou armazenado sob temperatura ambiente em dois recipientes plásticos de 25 L cada, totalizando 50 L de melaço.

4.1.1 Caracterização físico-química do melaço

A caracterização físico-química do substrato consistiu nas seguintes análises: pH, demanda química de oxigênio, carboidratos totais, alcalinidade, acidez, sólidos suspensos (totais, fixos e voláteis) e concentrações de nitrogênio e fósforo. Todas as análises foram feitas de acordo com o APHA: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (1998). O teor de carboidrato total foi analisado através do método de Dubois et al. (1956).

4.2 Inóculo

O reator foi inoculado com lodo coletado de um reator UASB de uma Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) de um conjunto residencial localizado no bairro Tabuleiro dos Martins, da cidade de Maceió/AL. Antes da sua utilização o inóculo passou por um pré-tratamento térmico, evitando assim o crescimento de microrganismos consumidores de hidrogênio. Esse tratamento (Figura 7) consistiu inicialmente no aquecimento do lodo, monitorado com termômetro, a 90°C por cerca de 10 min, seguido pelo seu resfriamento em banho de gelo até atingir a temperatura de 25°C, conforme a metodologia descrita por Maintinguer et al. (2008).

Figura 7: Tratamento do inóculo: a) aquecimento a 90 °C e b) resfriamento a 25 °C.



Fonte: Autora (2018)

4.3 Material Suporte

Como material suporte para adesão microbiana foi utilizado o pneu inservível triturado (Figura 8), o qual possui as características físicas apresentadas na Tabela 9.

Figura 8: Partículas de pneu triturado utilizado como material suporte na pesquisa.



Fonte: Autora (2018)

Tabela 9: Características físicas do pneu triturado de acordo com Barros (2009).

Característica	Valor
Dimensão (mm)	2,8 – 3,35
Densidade (g.cm ⁻³)	1,14
Rugosidade (%)	18

Fonte: Adaptado de Barros (2009).

A escolha do pneu inservível foi devido ao seu bom desempenho verificado em trabalhos anteriores (NICIURA, 2005; BARROS, 2009; BARROS et al., 2011; BARROS e SILVA, 2012; SILVA, 2015), além da facilidade de acesso e do baixo custo. No estudo de Barros (2009), as partículas de pneu triturado, por apresentarem alta rugosidade, permitiram o acúmulo de grande quantidade de biomassa e de bactérias acidogênicas produtoras de H₂.

Os pneus utilizados no reator foram cedidos por uma empresa recauchutadora de pneus localizada no município de Maceió – AL. Os mesmos foram cortados com tesoura para apresentarem a dimensão de aproximadamente 3 a 5 mm e depois foram tratados conforme o procedimento descrito em Barros (2009). As partículas de pneu triturado foram mergulhadas em solução de hidróxido de sódio 7,5.10⁻³ M por 30 minutos e então passaram por lavagem com água e secagem em estufa a 40 °C. Este tratamento, repetido por três vezes, garantiu a retirada de resíduos de óleo e outras impurezas contidas nos pneus. Após o tratamento, o pneu

triturado foi submetido ao teste de seleção de partículas, sendo colocado em um recipiente com água, onde as partículas que apresentaram densidade maior que a da água, e, portanto, ficaram no fundo do recipiente, foram utilizadas no reator, descartando-se as que flutuaram.

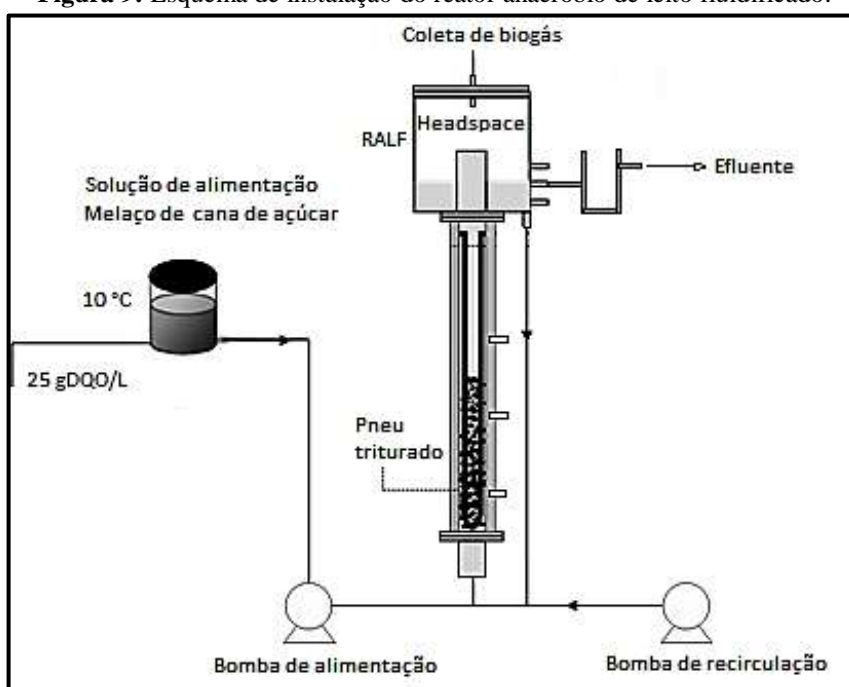
As condições fluidodinâmicas do RALF foram determinadas a partir do estudo de Barros (2009), que baseado em dados experimentais de velocidade superficial e perda de carga determinou a velocidade mínima de fluidificação de partículas de pneu triturado (V_{mf}) como sendo $1,18 \text{ cm.s}^{-1}$.

4.4 Configurações do RALF

A unidade experimental foi constituída por um reator anaeróbio de leito fluidificado, construído com material acrílico transparente, com altura de 115 cm, diâmetro interno de 5,0 cm, diâmetro externo de 11 cm e volume total de 1,2 L.

Ao reator foram acoplados um barrilete armazenador de solução de alimentação (afluente), uma bomba de alimentação, uma bomba de recirculação, um ponto de coleta de efluente e três saídas laterais para coleta de biomassa, conforme ilustrado na Figura 9. Além disso, contou com um separador gás-líquido (headspace) para permitir a realização das análises das frações gasosas e líquidas, coletadas separadamente, sendo o biogás coletado por uma porta de saída superior no headspace.

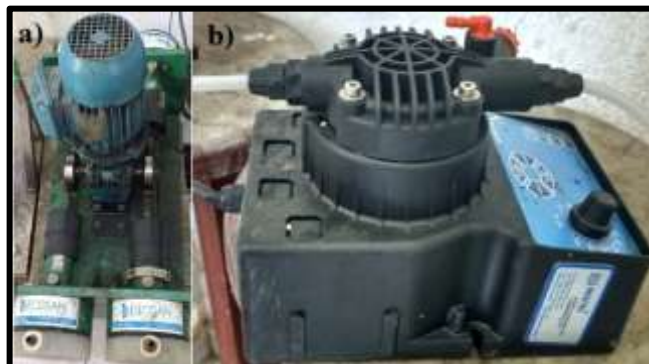
Figura 9: Esquema de instalação do reator anaeróbio de leito fluidificado.



Fonte: Adaptado de Santos (2014).

Nas Figuras 10 e 11 são mostradas fotografias das bombas e do RALF utilizado. A recirculação do melão foi garantida pelo uso de uma bomba dosadora Ecosan (Figura 10.a). A alimentação do afluente no RALF foi realizada por meio de uma bomba Dositec (Figura 10.b).

Figura 10: a) bomba de recirculação e b) bomba de alimentação utilizadas para operação do RALF.



Fonte: Autora (2018)

Figura 11: Foto do RALF utilizado na pesquisa.



Fonte: Autora (2018)

O reator foi operado a temperatura ambiente e sua variação de temperatura foi acompanhada por um termômetro.

4.5 Operação do RALF

O reator foi operado em modo contínuo sob quatro diferentes tempos de detenção hidráulica (TDH: 12, 6, 4 e 3 h), equivalendo a quatro variações na vazão e na carga orgânica volumétrica. Cada vazão é dada pela razão entre o volume útil (920 mL) do reator e o correspondente TDH; já as COVs são calculadas pela divisão entre a DQO do afluente (melaço diluído a 25 g.L⁻¹) e o respectivo TDH. Cada faixa de TDH representa uma fase anaeróbia de operação do reator, conforme descrito na Tabela 10, totalizando 136 dias de operação do RALF.

Os valores teóricos do TDH e da DQO deste trabalho foram escolhidos com base no trabalho de Nualsri et al. (2016), que obteve bom desempenho em dois reatores ligados em série para produzir hidrogênio (CSTR) e metano (UASB) a partir de xarope de cana de açúcar a 25 g_{DQO}.L⁻¹ em TDHs de 12, 6, 4, 3 e 2 h. Como o melaço equivale ao xarope obtido após a centrifugação, ambos, são resíduos agroindustriais com características semelhantes, sugerindo que em mesmas aplicações de DQO e TDH os resultados sejam próximos e que seja repetido com o melaço a boa produção alcançada com o xarope.

Tabela 10: Fases experimentais de operação do RALF

Fase experimental	Tempo de operação (dias)	TDH _{teórico} (horas)	DQO _{teórica} (g.L ⁻¹)	Vazão _{teórica} (mL.h ⁻¹) / (mL.min ⁻¹)	COV _{teórica} (g.L ⁻¹ .h ⁻¹) / (kg.m ⁻³ .d ⁻¹)
1	44	12	25	76,7 / 1,3	2,1 / 50
2	34	6	25	153,3 / 2,6	4,2 / 100
3	33	4	25	230 / 3,8	6,3 / 150
4	25	3	25	306,7 / 5,1	8,3 / 200

Fonte: Autora (2018)

4.5.1 Testes operacionais iniciais e partida do RALF

Após montagem do reator realizou-se o teste de estanqueidade com água para detectar possíveis vazamentos. Em seguida o RALF foi preenchido com 267,89 g de pneu triturado devidamente tratado, de forma a ocupar 33 cm da altura da zona de reação do reator, conforme metodologia utilizada por Amorim (2009), deixando-o com um volume útil de 920 mL. A inoculação foi feita em um barrilete de 15 L contendo 5 L de solução constituída por 10% de

lodo tratado (500 mL) e o restante de melação diluído com água da torneira (diluição 1:44, 25 g_{DQO}.L⁻¹).

O próximo passo foi o ajuste das condições fluidodinâmicas do reator. Para isso, foram utilizados os dados experimentais de velocidade de mínima fluidificação para partículas de pneu triturado ($V_{mf} = 1,18 \text{ cm.s}^{-1}$). De acordo com Amorim 2009, a velocidade de recirculação do inóculo foi determinada experimentalmente como sendo 30% maior que a velocidade de mínima fluidificação do pneu, logo, o valor da velocidade utilizada para atingir as condições de fluidificação no RALF foi $1,534 \text{ cm.s}^{-1}$ (1,3 vezes V_{mf}). Assim, a vazão de recirculação, obtida através da multiplicação da área do reator pela velocidade de recirculação do inóculo, foi determinada como sendo $1,8 \text{ L.min}^{-1}$, a qual foi ajustada na bomba dosadora ECOSAN, iniciando uma recirculação a partir do barrilete para o reator durante 48 h, em modo batelada, garantindo um melhor contato entre o material suporte e os microrganismos.

Após esse período, o reator foi alimentado com melação diluída a $25 \text{ g}_{\text{DQO}}.\text{L}^{-1}$ de forma contínua, com recirculação, sendo regulado para operar no primeiro TDH (12 h), a partir do devido ajuste na vazão de alimentação ($1,3 \text{ mL.min}^{-1}$). Depois de atingido o estado estacionário, ou seja, quando a variação da produção de biogás foi menor que 15%, foi efetuada a mudança de fase para o próximo TDH. Dessa forma, o RALF foi operado nas demais fases referentes aos TDHs 6 h ($2,6 \text{ mL.min}^{-1}$), 4 h ($3,8 \text{ mL.min}^{-1}$) e 3 h ($5,1 \text{ mL.min}^{-1}$).

O substrato foi mantido sob refrigeração a $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante a alimentação, para evitar a fermentação do mesmo antes de entrar no reator. Com o objetivo de estudar o comportamento mais natural possível do sistema, não foi adicionado nenhum controlador de pH.

4.6 Análises das Amostras de Afluentes e Efluentes do RALF

Em cada fase experimental foram feitas coletas periódicas de amostras do afluente e do efluente do reator anaeróbio, bem como do biogás produzido, para serem realizadas as devidas análises físico-químicas, cromatográficas e de biologia molecular, conforme a frequência mostrada na Tabela 11.

As análises físico-químicas (pH, DQO, carboidratos totais, SST, SSV e SSF) foram realizadas de acordo com os procedimentos detalhados no APHA: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (1998).

Os gráficos por meio dos quais foram apresentados os resultados das análises físico-químicas dos afluentes e efluentes foram elaborados no Microsoft Office Excell 2016.

Tabela 11: Frequência das análises das amostras coletadas no reator anaeróbio.

Análises	Amostra	Frequência	Método
Vazão	Efluente	5 vezes/semana	Cronômetro
pH	Afluente e Efluente	5 vezes/semana	Standard Methods (1998)
DQO		2 vezes/semana	
SSF, SST e SSV			
Carboidratos totais	Afluente e Efluente	2 vezes/semana	Dubois et al. (1956)
Ácidos voláteis	Efluente	2 vezes/semana	Cromatografia Gasosa/ Amostragem automática
Álcoois e acetona			
Composição do biogás	Saída de biogás	2 vezes/semana	Cromatografia Gasosa
Comunidade microbiana	Biomassa	1 vez/fase	PCR-DGGE

Fonte: Autora (2018)

4.6.1 Análise da composição do biogás

Estas análises detectaram e quantificaram os gases H_2 , CO_2 e CH_4 . Foram feitas por cromatografia gasosa, de acordo com a metodologia aplicada por Maintinguer et al. (2008), utilizando-se um cromatógrafo gasoso de alta resolução, da marca Shimadzu, modelo GC 2010, munido de detector de condutividade térmica (TCD), com as seguintes configurações:

- ✓ Coluna CarboxenTM 1010 PLOT com capilar de sílica fundida (30m x 0,53mm);
- ✓ Temperaturas do injetor, detector e coluna = 30, 200 e 230 °C, respectivamente;
- ✓ Fluxo do gás de arraste (argônio): 21,9 cm.s⁻¹;
- ✓ Tempo total de análise: 6,87 min.

Nestas condições, os gases H_2 , CO_2 e CH_4 , eram detectados nos tempos aproximados de 0,8, 1,3 e 1,8 minutos, respectivamente. Para as análises foram retiradas amostras de 1 mL da fase gasosa do headspace do reator com o uso de seringa gastigh com trava da marca Hamilton, as quais eram injetadas no cromatógrafo para a leitura da área dos gases produzidos. Desta forma, a área de hidrogênio foi relacionada com a sua curva, resultando na quantidade de mols produzida. Para sabermos o conteúdo de hidrogênio no biogás, divide-se o número de moles de H_2 produzido pelo total de moles produzido no biogás (H_2 , CO_2 e CH_4).

4.6.2 Análises de metabólitos solúveis pelo método de headspace e análises de H₂

Nesta etapa foram identificados os subprodutos da digestão anaeróbia produzidos no RALF, que são conhecidos como metabólitos solúveis e consistem de ácidos orgânicos voláteis, acetona e álcoois. A determinação foi executada pelo método de extração por headspace de acordo com metodologia adaptada de Adorno et al. (2014), com o uso de um amostrador automático HS-20 acoplado a um cromatógrafo gasoso GC 2010, ambos da marca Shimadzu (Software LabSolutions). O cromatógrafo gasoso foi o mesmo utilizado na análise de composição do biogás, havendo apenas a troca da sua coluna CarboxenTM 1010 PLOT por uma coluna SUPELCOWAXTM 10, também com capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm x 0,25µm), com hidrogênio como gás de arraste e detector de ionização de chama (FID).

As amostras líquidas de efluente para determinação de acetona, álcoois e ácidos foram preparadas pelo efeito salting-out, em tubos de 10 mL com tampa rosqueável e septo de silicone branco e azul, com a adição de 1 g de NaCl, 2 mL de amostra, 70 µL de solução de isobutanol a 1 g/L, 100 µL de ácido crotônico a 700 mg/L e 200 µL de ácido sulfúrico 2 M, de acordo com Adorno et al. (2014). As mesmas foram quantificadas usando-se as seguintes condições:

➤ Para o cromatógrafo GC 2010 - Adaptado de Adorno et al. (2014)

- ✓ Rampa de temperatura: 35 °C (0'), 2 °C/min 38 °C (0'), 10 °C/min 75 °C (0'), 35 °C/min 120 °C (1'), 10 °C/min 170 °C 2 °C/min;
- ✓ Temperaturas do injetor, do detector (FID) e da coluna: 250, 280 e 35 °C, respectivamente;
- ✓ Razão de Split: 16,3;
- ✓ Fluxo do gás de arraste (H₂), do make-up ou gás auxiliar (N₂) e do gás de chama (ar sintético): 30, 30 e 300 mL/min, respectivamente;
- ✓ Velocidade linear constante: 41,8 cm/s;
- ✓ Fluxo da coluna: 1,56 mL/min.dia;
- ✓ Tempo total de análise: 14,49 min.

➤ Para o amostrador automático HS-20 –Baseado em Frink e Armstrong (2017).

- ✓ Pressão do gás de pressurização (Argônio): 100 kPa;
- ✓ Nível de agitação: 2;

- ✓ Temperaturas do forno, da linha de amostra e da linha de transferência: 105,3; 150 e 118 °C, respectivamente;
- ✓ Tempos de equilíbrio, de pressurização e de equilíbrio da pressão: 5; 0,5 e 0,10 minutos, respectivamente;
- ✓ Tempos de carregamento, de equilíbrio do carregamento e de injeção: 0,5; 0,10 e 0,5 minutos, respectivamente;
- ✓ Tempo de ciclo do GC: 14,99 minutos.

A partir destas condições, foi possível avaliar a produção de acetona, metanol, etanol, n-butanol e de seis ácidos (acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico e caproico).

A quantificação dos metabólitos foi baseada na concentração molar, através da relação molar de cada metabólito com os metabólitos totais produzidos (SMP), assim, por exemplo, temos: relação molar do etanol com os SMP = EtOH/SMP; relação molar do acetato com os SMP = Hac/SMP; relação molar do butirato com os SMP = HBut/SMP e relação molar do propionato com os SMP = HPr/SMP.

Os rendimentos e as produções volumétricas de hidrogênio foram calculados com base nas produções de etanol e de ácidos acético, butírico e propiônico obtidas nos SMPs, por meio das relações estequiométricas entre o hidrogênio e cada um desses metabólitos estabelecidas a partir das respectivas rotas fermentativas, conforme descrito nas Equações 4 a 8, na seção 3.3.2 “Rotas Fermentativas e Metabólitos”, resultando em:

- ✓ Produção de 4 mols de H₂ para cada 2 mols de ácido acético produzido: 2/1;
- ✓ Produção de 2 mols de H₂ para cada mol de ácido butírico produzido: 2/1;
- ✓ Produção de 2 mol de H₂ para cada mol de etanol produzido: 2/1;
- ✓ Consumo de 2 mol de H₂ para cada 2 mols de ácido propionico produzido: -1:1.

Assim, o total de mols de hidrogênio, obtido pelo somatório das quatro rotas descritas acima, representa o numerador da Equação 14, por meio da qual determinou-se o rendimento de hidrogênio (HY) neste trabalho.

$$HY (\text{mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{glicose}}^{-1}) = \frac{\text{Quantidade de H}_2 \text{ produzido (mol)}}{\text{Quantidade de glicose consumida (mol)}} \quad (14)$$

O volume de hidrogênio foi calculado a partir da equação dos gases ideais ($PV = nRT$), sendo P a pressão atmosférica = 1 atm, T = temperatura ambiente monitorada por termômetro, R = constante universal dos gases = $0,082 \text{ atm}\cdot\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ e n = número de moles de H_2 obtido pelos metabólitos. Através da Equação 15 foi relacionado o volume de H_2 produzido, o tempo de detenção hidráulica e o volume útil do reator para obter a taxa de produção de hidrogênio (HPR).

$$\text{HPR (L}_{\text{H}_2}\cdot\text{L}_{\text{Reator}}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}) = \frac{\text{Quantidade de H}_2 \text{ produzido (L)}}{\text{TDH (h)} * \text{Volume útil do reator (L)}} \quad (15)$$

A taxa de produção volumétrica de hidrogênio (HPR) foi convertida para taxa de produção de energia de hidrogênio (EPR- H_2) em unidades $\text{kJ}\cdot\text{L}_{\text{reator}}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, através da multiplicação da HPR em $\text{L}_{\text{H}_2}\cdot\text{L}_{\text{Reator}}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ pelo conteúdo energético de hidrogênio ($121 \text{ kJ}\cdot\text{g}^{-1}\text{H}_2 = 10,8 \text{ kJ/L}$), conforme a Equação 16.

$$\text{EPR-}\text{H}_2 \text{ (kJ}\cdot\text{L}_{\text{Reator}}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}) = \text{HPR (L}_{\text{H}_2}\cdot\text{L}_{\text{Reator}}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}) * 10,8 \text{ kJ}\cdot\text{L}^{-1}\text{H}_2 \quad (16)$$

A análise de metabólitos também possibilitou a identificação da rota principal seguida pelos microrganismos presentes no reator para produzir hidrogênio.

4.6.3 Análise da comunidade microbiana por PCR-DGGE

Com o objetivo de analisar a dinâmica da comunidade microbiana presente no reator, ao término de cada uma das quatro fases operacionais foram coletadas amostras da biomassa aderida as partículas de pneu triturado; essas amostras foram retiradas de uma das saídas laterais do mesmo, para que pudéssemos ter um exemplar que melhor caracterizasse os consórcios bacterianos.

As amostras coletadas do reator ficaram incubadas a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ até o devido uso, quando foram descongeladas, descartando-se parte do sobrenadante, de forma a ficar com o máximo de sólidos, para então serem analisadas por meio da técnica de reação de polimerase em cadeia seguida de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (PCR-DGGE : Polymerase Chain Reaction - Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), que consiste das etapas sequenciais de extração de DNA, amplificação pela reação em cadeia da polimerase – PCR, visualização em gel de agarose e eletroforese em gel de gradiente desnaturante – DGGE.

Para realizar a extração de DNA das amostras foi utilizado o Kit “PowerSoil®DNA Isolation Kit” da MO BIO Laboratories, Inc, de acordo com o protocolo que vem detalhado no próprio kit. Bianco (2015) utilizou um kit semelhante em seu trabalho de caracterização de uma comunidade de microrganismos.

Após extraído, o DNA foi amplificado pela técnica de PCR, adaptando a metodologia aplicada por Santos (2014) e Bianco (2015). Na reação de amplificação com volume final de 50 μL , usou-se 2 μL do DNA extraído e 48 μL de um Mix de PCR formado pelas soluções: Platinum GC Enhancer, Platinum de PCR 2X MM (que contem enzima Taq polimerase, dNTPs e tampão), água ultrapurificada e o *set de primer* específicos para o Domínio Bacteria, 968 FGC e 1401 R (NUBEL et al.,1996), na concentração 25 μM , conforme as quantificações descritas na Tabela 12.

As amplificações foram realizadas no aparelho de amplificação “T100 Thermal Cycler” da BIO-RAD, programado de acordo com a configuração para primers Bacteria, composta por 35 ciclos, com as etapas de desnaturação inicial a 94 °C por 7 minutos, desnaturação a 94 °C por 45 segundos, anelamento a 56 °C por 45 segundos, extensão a 72 °C por 1 minuto, final da extensão a 72 °C por 10 minutos e resfriamento até 4 °C.

Tabela 12: Reagentes usados na amplificação dos fragmentos de DNA por PCR.

Reagentes		01 Amostra	n Amostras
Mix de PCR	Platinum GC Enhancer	10 μL	10n μL
	Platinum de PCR 2X MM	25 μL	25n μL
	H ₂ O ultrapurificada (sem nuclease)	11 μL	11n μL
	Primer 968 FGC (25 μM)	1 μL	1n μL
	Primer 1401 R (25 μM)	1 μL	1n μL
	Total	48 μL	48n μL
Template (DNA extraído)		2 μL	

Fonte: Autora (2018)

Após a amplificação dos genes de DNA foi feita a visualização do produto de PCR para verificar a qualidade e dimensão do mesmo por meio da eletroforese do gel de agarose 1,2% (m/v) em tampão TBE 1X e com o marcador *Low DNA mass ladder* fabricado pela Invitrogen. Para isto, adaptou-se os procedimentos seguidos por Santos (2014) e Bianco (2015). A amostra foi preparada com 5,0 μL de produto de PCR e 5,0 μL de corante de DNA (Blue Green Loading Dye) diluído 2 vezes com água ultrapurificada, para então ser transferida para os “poços” do gel, sendo que a amostra a ser colocada no primeiro poço foi preparada usando 5,0 μL de *Low*

DNA mass ladder (no lugar do produto do PCR) com 5,0 μ L de corante. Os demais poços foram preenchidos com produto de PCR e corante.

Depois da aplicação das amostras, utilizou-se para a corrida eletroforética o aparelho “PowerPac HV Basic” da BIO-RAD com programação de 75 V constante por 30 minutos. Terminada a corrida, colocou-se o gel para corar por 20 minutos no escuro em um recipiente contendo 200 mL de solução tampão TBE 1X e 20 μ L de corante SYBR Safe DNA gel Stain 10.000 X; em seguida o gel foi acomodado na câmara do aparelho de visualização de imagem sob luz UV (Molecular Imager GelDoc **XR+**) da BIO-RAD, conectado a um computador contendo o software LabImager, onde foi feita a leitura e visualização dos padrões de bandas obtidas na PCR.

Estando verificada a qualidade do produto da PCR, iniciou-se a DGGE, com uso das soluções de gel gradiente desnaturante nas concentrações 0, 45 e 65 % (Tabela 13). Toda a etapa de DGGE foi realizada com base no procedimento descrito em Sakamoto (2001), com auxílio do sistema DGGE DCodeTM – Universal Mutation. Detection System da BIO-RAD. O gel 0% foi utilizado apenas para cobrir os poços.

Tabela 13: Quantidades dos componentes usados no preparo das soluções do gel gradiente desnaturante.

Componentes	Concentração		
	0%	45%	65%
Bis-acrilamida 40% (mL)	20	20	20
TAE 50X (mL)	2	2	2
Formamida (mL)	0	18	26
Uréia (g)	0	18,5	27,3

Fonte: Autora (2018)

A câmara eletroforética do sistema DCode foi preparada com 7 L de solução tampão TAE 1X. A amostra, composta por 20 μ L de produto de PCR e 5,0 μ L de corante de DNA (Blue Green Loading Dye) diluído 2 vezes com água ultrapurificada, foi transferida para os “poços” do gel com a câmara a 65°C. Utilizou-se para a corrida da eletroforese o aparelho “PowerPac HV Power Supply” da BIO-RAD com programação de 75 V constante por 16 horas.

O gel foi corado por 20 minutos em um recipiente contendo 200 mL de solução tampão TAE 1X e 20 μ L de corante SYBR Safe DNA gel Stain 10.000 X, depois foi lavado com água ultrapurificada e então foi colocado no aparelho de visualização de imagem (Molecular Imager GelDoc **XR+**) da BIO-RAD, conectado a um computador contendo o software LabImager, onde foi feita a leitura e visualização dos padrões de bandas obtidas na DGGE. Por fim, para análise dos perfis de DGGE foi elaborado o dendograma utilizando o software Bionumerics 2.5

e os índices de diversidade de Shannon-Wiener (H) e de similaridade de Pearson (Correlação de Pearson).

4.7 Equações para os Cálculos dos Principais Parâmetros

O objetivo deste item é apresentar as equações usadas para calcular os principais parâmetros envolvidos na operação do reator que são o HY, a PVH, a conversão de carboidrato, a vazão teórica, o TDH real, a COV teórica e real aplicada, bem como a real removida.

$$HY (\text{mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{glicose}}^{-1}) = \frac{\text{H}_2 \text{ produzido (mol)}}{\text{glicose consumida (mol)}} \quad (14)$$

$$\text{HPR} (\text{L}_{\text{H}_2} \cdot \text{L}_{\text{Reator}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}) = \frac{\text{H}_2 \text{ produzido (L)}}{\text{TDH (h)} * \text{Volume útil do reator (L)}} = \frac{\text{H}_2 \text{ produzido (mol)}}{\text{TDH (h)} * \text{Volume útil do reator (L)}} * \frac{RT}{P} \quad (15)$$

$$\text{EPR-H}_2 (\text{kJ} \cdot \text{L}_{\text{Reator}}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}) = \text{HPR} (\text{L}_{\text{H}_2} \cdot \text{L}_{\text{Reator}}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}) * 10,8 \text{ kJ} \cdot \text{L}^{-1}_{\text{H}_2} \quad (16)$$

$$\text{Conversão de carboidrato (\%)} = \frac{100 * (\text{carboidrato}_{\text{afluente}} - \text{carboidrato}_{\text{efluente}})}{\text{carboidrato}_{\text{afluente}}} \quad (17)$$

$$\text{Vazão}_{\text{Teórica}} (\text{mL} \cdot \text{h}^{-1}) = \frac{\text{Volume útil do reator (mL)}}{\text{TDH}_{\text{Teórico}} (\text{h})} \quad (18)$$

$$\text{COV}_{\text{Teórica Aplicada}} (\text{kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}) = \frac{\text{DQO}_{\text{Teórica Afluente}} (\text{g} \cdot \text{L}^{-1})}{\text{TDH}_{\text{Teórico}} (\text{d})} \quad (19)$$

$$\text{COV}_{\text{Real Aplicada}} (\text{kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}) = \frac{\text{DQO}_{\text{Real Afluente}} (\text{g} \cdot \text{L}^{-1})}{\text{TDH}_{\text{Real}} (\text{d})} \quad (20)$$

$$\text{TDH}_{\text{Real}} (\text{h}) = \frac{\text{Volume útil do reator (mL)}}{\text{Vazão}_{\text{Real}} (\text{mL} \cdot \text{h}^{-1})} \quad (21)$$

$$\text{COV}_{\text{Real Removida}} (\text{kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}) = \frac{[\text{DQO}_{\text{Real Afluente}} - \text{DQO}_{\text{Efluente}}] (\text{g} \cdot \text{L}^{-1})}{\text{TDH}_{\text{Real}} (\text{d})} \quad (22)$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este item apresenta os resultados obtidos e a discussão dos fatores analisados no desempenho do RALF alimentado com melaço de cana-de-açúcar que se empregou na presente pesquisa. São descritos os dados de temperatura, pH e vazão mantidos no reator e a caracterização físico-química do melaço. Os resultados de remoções de DQO e carboidratos totais, concentrações de sólidos suspensos, rendimento, produção volumétrica e conteúdo de H_2 , além das concentrações de ácidos orgânicos, acetona e álcoois, serão apresentados por meio de gráficos em função do tempo operacional, das COVs e dos TDHs aplicados e/ou tabelas contendo os valores médios sob condição de estado estacionário equivalentes a cada TDH aplicado. Também é apresentado o balanço de DQO para o sistema operacional, e, por fim, será avaliada a estrutura da comunidade microbiana durante as fases operacionais por meio das análises de PCR-DGGE, e, essa diversidade será relacionada aos dados experimentais.

5.1 Caracterização Físico-Química do Melaço Puro.

O melaço de cana-de-açúcar, coletado em outubro de 2016, em quantidade suficiente para o funcionamento do reator durante toda a pesquisa (50 L), foi devidamente caracterizado. Os resultados são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14: Características do melaço utilizado neste estudo.

Parâmetros		Valores
pH		5,63
Alcalinidade (a $CaCO_3$)	Parcial	0,45 $g.L^{-1}$
	Intermediária	6 $g.L^{-1}$
	Total	6,45 $g.L^{-1}$
Acidez		17,37 $g_{HAc}.L^{-1}$
DQO		1088,8 $g.L^{-1}$
Carboidrato (glicose)		970, 1 $g.L^{-1}$
Sólidos Suspensos	SST	10,05 $g.L^{-1}$
	SSF	1,40 $g.L^{-1}$
	SSV	8,65 $g.L^{-1}$
NTK		31,4 $g.L^{-1}$
Fósforo		0,46 $g.L^{-1}$

Fonte: Autora (2018)

De acordo com a literatura, o melaço de cana-de-açúcar possui cerca de 1000 g_{DQO}.L⁻¹. Faria (2014) e Albanez (2015) obtiveram concentrações de 1090 e 1104 g_{DQO}.L⁻¹, respectivamente. No melaço utilizado nesta pesquisa foi obtida uma DQO de 1088,8 g.L⁻¹. A elevada concentração de carboidrato deste substrato (970,1 g.L⁻¹), comprova a sua enorme capacidade para produzir hidrogênio. Albanez (2015) encontrou o valor de 964,8 g.L⁻¹ de carboidrato.

Quanto ao pH, em torno de 5,63, mesmo não havendo ainda um valor definido de pH ótimo para produção de H₂ em modo contínuo, este valor encontra-se dentro da faixa de pH considerada ideal (5 a 6) segundo vários estudiosos (AMORIM, 2009; PEIXOTO, 2011; BHARATHIRAJA et al., 2016).

A acidez obtida no melaço (17,37 g_{HAc}.L⁻¹) indica a provável formação de ácidos voláteis (acético, butírico, propiônico e outros) durante a fermentação do substrato, o que irá interferir positivamente ou negativamente na produção de hidrogênio.

No trabalho de Park et al. (2010) foi utilizado melaço de cana de açúcar diluído em água (28 g_{DQO}.L⁻¹) para produção sequencial de hidrogênio e metano através de digestão anaeróbia. O substrato *in natura* tinha as seguintes características: pH 4,3, alcalinidade total de 5,9 g.L⁻¹, DQO de 1082,2 g.L⁻¹, 614 g.L⁻¹ de carboidrato, 11,6 g.L⁻¹ de SST, 4,4 g.L⁻¹ de SSF, 7,2 g.L⁻¹ de SSV, 37,8 g.L⁻¹ de nitrogênio total e 0,59 g.L⁻¹ de fósforo. O referido estudo apresentou boa produção de hidrogênio. As características do melaço utilizado por Park et al. (2010) são relativamente similares as apresentadas na tabela 14, sugerindo uma produção significativa de hidrogênio.

5.2 Monitoramento do RALF

Os resultados a seguir referem-se ao monitoramento das condições operacionais do reator: temperatura, vazão e pH, sendo apresentados os maiores e menores valores registrados para esses parâmetros durante o tempo operacional e também os dados médios equivalentes a cada TDH, acompanhados dos respectivos desvios padrões.

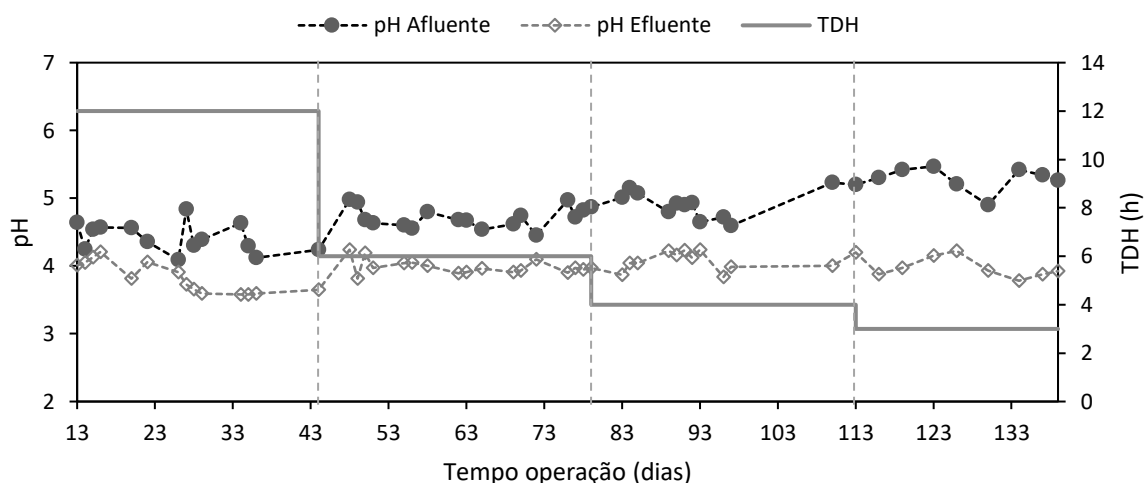
5.2.1 Temperatura, vazão e pH

A Tabela 15 apresenta as vazões teóricas e reais médias aplicadas em cada TDH e os valores médios do pH afluente e efluente registrados, bem como da temperatura. A variação de pH ao longo da operação do RALF é mostrada na Figura 12.

Tabela 15: Condições operacionais médias do RALF durante as quatro fases operacionais.

TDH (h)	Vazão (mL.min ⁻¹)		pH		T (°C)
	Teórica	Aplicada	Afluente	Efluente	
12	1,28	1,38 ± 0,23	4,42 ± 0,22	3,83 ± 0,23	29,71 ± 1,10
6	2,56	2,58 ± 0,13	4,72 ± 0,16	3,99 ± 0,11	26,76 ± 0,60
4	3,83	3,76 ± 0,13	4,93 ± 0,18	4,08 ± 0,15	26,23 ± 0,75
3	5,11	5,13 ± 0,09	5,29 ± 0,18	3,97 ± 0,15	28,55 ± 0,35

Fonte: Autora (2018)

Figura 12: Perfil de dependência do pH afluente e efluente nos diferentes TDHs ao longo da operação do RALF.

Fonte: Autora (2018)

As vazões aplicadas no reator em cada fase conseguiram ser mantidas bem próximas aos valores desejados, visto que houve pouquíssima variação entre os valores aplicados e os valores teóricos; A temperatura ambiente, acompanhada por termômetro, variou entre $26,23 \pm 0,75$ °C (TDH 4 h) e $29,71 \pm 1,10$ °C (TDH 12 h) durante a aplicação dos diferentes TDHs ao longo da operação do reator, mantendo-se, portanto, um pouco abaixo da faixa de temperatura mesofílica (30 a 40°) que é mais utilizada nesses tipos de trabalhos. Ren et al. (2006), Wang e Jin (2009), Lay et al (2010) e Chang et al. (2011), que também utilizaram melão para produzir H₂, em diferentes configurações de reatores, mantiveram a temperatura controlada de 35°C, e mesmo assim, obtiveram rendimentos e produções volumétricas menores do que os atingidos nesta pesquisa.

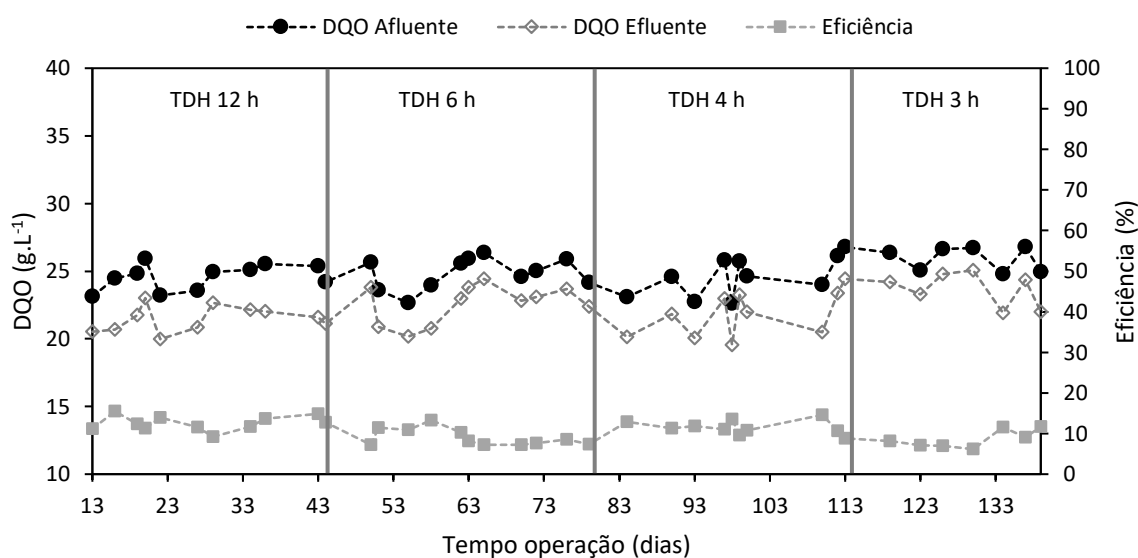
Os pHs afluente e efluente não sofreram alterações muito bruscas ao decorrer das fases experimentais, conforme mostrado pelos pequenos valores de desvio padrão correspondentes, e mantiveram-se dentro da faixa já aplicada por muitos autores para a produção de hidrogênio ($3,5 \leq \text{pH} \leq 5,5$). O pH do afluente mantido refrigerado a 10 °C durante a alimentação, sem a adição de agentes alcalinizantes e/ou acidificantes, apresentou-se entre $4,42 \pm 0,22$ (TDH 12 h)

e $5,29 \pm 0,18$ (TDH 3 h); já o pH do efluente manteve-se entre $3,83 \pm 0,23$ (TDH 12 h) e $4,08 \pm 0,15$ (TDH 4 h). Li et al. (2007) observaram pH efluente de 3,5 a 6,8 e em Guo et al. (2008), estes valores oscilaram entre 3,88 e 5,33. Esses autores utilizaram o mesmo substrato investigado no presente trabalho.

5.3 Remoção da DQO

Neste trabalho foi adotada a DQO afluente do melaço em $25 \text{ g}_{\text{DQO}}\cdot\text{L}^{-1}$. Na Figura 13 é mostrado o perfil de dependência da DQO contida no afluente e efluente e da sua eficiência de remoção ao longo dos TDHs aplicados. Na Tabela 16 constam os valores médios da DQO afluente e efluente e da eficiência de remoção de DQO com os correspondes desvios padrões.

Figura 13: Perfil de dependência do TDH com a variação de DQO e a sua eficiência de remoção no RALF.



Fonte: Autora (2018)

Tabela 16: Médias de DQO afluente e efluente e de eficiência de remoção nos TDHs aplicados, com seus respectivos desvios padrões.

TDH (h)	DQOAfluente ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	DQOEfluente ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Eficiência (%)
12	$24,6 \pm 0,9$	$21,5 \pm 0,9$	$12,6 \pm 1,8$
6	$24,9 \pm 1,2$	$22,6 \pm 1,4$	$9,0 \pm 2,1$
4	$24,6 \pm 1,5$	$21,8 \pm 1,7$	$11,5 \pm 1,8$
3	$25,8 \pm 0,9$	$23,6 \pm 1,2$	$8,8 \pm 2,1$

Fonte: Autora (2018)

A DQO afluente oscilou entre $24,6 \pm 0,9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (TDH 12 h) e $25,8 \pm 0,9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (TDH 3 h) com média de $25,00 \pm 1,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ entre os TDHs; Observa-se que houve certa dificuldade em

manter a DQO afluente no valor adotado de 25 g.L^{-1} ; isto é devido ao fato de se utilizar um efluente real, o melaço, que, mesmo passando por todos os cuidados na caracterização e no armazenamento, tem características ímpares, como rápida fermentação e acidificação, fazendo com que, após ser diluído, a sua DQO mude consideravelmente, dificultando a manutenção da DQO inicial.

Quanto ao efluente, a DQO apresentou-se entre $21,5 \pm 0,9 \text{ g.L}^{-1}$ (TDH 12 h) e $23,6 \pm 1,2 \text{ g.L}^{-1}$ (TDH 3 h). A eficiência de remoção de DQO foi diminuindo gradualmente ao longo do decréscimo do TDH, com exceção do TDH de 6 h, indo de $12,6 \pm 1,8\%$ no TDH 12 h a $8,8 \pm 2,1\%$ no TDH 3 h. O desvio observado no TDH de 6 h em relação as demais fases, pode ser explicado pela maior quantidade de sólidos suspensos voláteis no efluente ($1.394,6 \pm 592,9 \text{ mg.L}^{-1}$) detectado nesse TDH, equivalendo a uma maior DQO da biomassa ($2.469,7 \pm 1048,4 \text{ mg}_{\text{DQO}}.\text{L}^{-1}$) na forma de sólidos suspensos voláteis efluente, e conseqüentemente, a uma menor eficiência de remoção, conforme valores mostrados nas Tabelas 27 e 28 da seção 5.8 “Balanço de DQO”.

De acordo com Nualsri et al. (2016), a conversão de DQO em hidrogênio é de cerca de 20%, logo as conversões médias de DQO obtidas no reator (8,8 a 12,6%) está dentro de uma aceitável. Li et al. (2007), utilizando melaço de açúcar de beterraba em um reator anaeróbio com compartimentos (ABR), relacionou as baixas remoções de DQO alcançadas em seu trabalho sobre produção de H_2 (9,4% de eficiência média de remoção), com as grandes quantidades de intermediários líquidos produzidos na fermentação, visto que quanto maior a quantidade desses metabólitos, mais DQO estará presente no sistema; segundo o mesmo, na digestão anaeróbia, a remoção de DQO é possibilitada pela transformação de ácidos orgânicos em metano e, portanto, quando não há presença de arqueas metanogênicas, essa remoção é garantida pela liberação de H_2 e CO_2 enquanto uma parte da DQO é convertida em metabólitos solúveis que permanecem no sistema. A observação de Li et al. (2007), pode ser equiparada aos resultados encontrados no presente trabalho, uma vez que as concentrações dos SMPs alcançados aqui, principalmente etanol e acetato, conforme mostrado nas seções 5.7 e 5.8, foram bastante significativas, contribuindo para uma alta DQO efluente e, conseqüentemente, para baixas remoções de DQO.

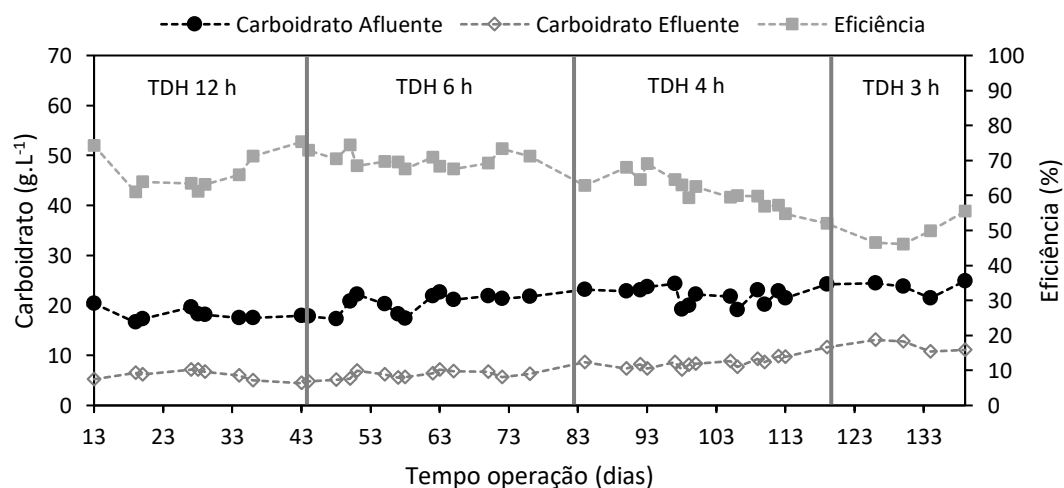
Park et al. (2010), ao trabalhar com melaço de cana de açúcar a $28 \text{ g}_{\text{DQO}}.\text{L}^{-1}$ em um reator contínuo PBR para produzir H_2 , obtiveram remoções de DQO com eficiências entre 8% (TDH 5 h) e 23% (TDH 12 h). Han et al. (2012b) utilizando um reator contínuo de lodo imobilizado alimentado com melaço registraram remoções de DQO em torno de 13%.

Outros autores, que também utilizaram o melaço para avaliar a produção de H₂, conseguiram eficiências de remoção de DQO superiores às registradas neste trabalho (REN et al., 2006; WANG et al., 2013; ZHU et al., 2013; REGO, 2016). Ren et al. (2006), ao monitorar a produção de H₂ em um reator contínuo de fermentação anaeróbia a partir de melaço alimentado em concentração inferior (3 g_{DQO}.L⁻¹) obteve eficiência de remoção de DQO variando de 20% a 30%. No estudo de Wang et al. (2013) esse parâmetro permaneceu entre 31,6% e 39,2%. Zhu et al. (2013) e Rego (2016) alcançaram 45% e 29% de eficiência, respectivamente.

5.4 Conversão de Carboidratos

A Figura 14 e a Tabela 17 apresentam a variação de carboidratos totais na forma de glicose afluente e efluente e a eficiência de conversão de carboidratos ao longo do tempo de operação do reator para cada fase.

Figura 14: Perfil de dependência do TDH no RALF com a variação de carboidrato na forma de glicose afluente e efluente e com a eficiência de conversão de carboidrato.



Fonte: Autora (2018)

Tabela 17: Médias de Carboidrato na forma de glicose afluente e efluente e eficiência de conversão para os TDHs aplicados, com seus respectivos desvios padrões.

TDH (h)	Carboidrato _{Afluente} (g.L ⁻¹)	Carboidrato _{Efluente} (g.L ⁻¹)	Eficiência (%)
12	18,1 ± 1,1	5,9 ± 1,0	67,2 ± 5,6
6	20,6 ± 1,9	6,2 ± 0,7	70,1 ± 2,2
4	21,9 ± 1,7	8,4 ± 0,8	61,5 ± 4,1
3	23,8 ± 1,4	11,9 ± 1,1	50,0 ± 3,9

Fonte: Autora (2018)

O afluente apresentou concentração de carboidratos totais entre $18,1 \pm 1,1 \text{ g.L}^{-1}$ (TDH 12 h) e $23,8 \pm 1,4 \text{ g.L}^{-1}$ (TDH 3 h) e o efluente teve concentração mínima de $5,9 \pm 1,0 \text{ g.L}^{-1}$ (TDH 12 h) e máxima de $11,9 \pm 1,1 \text{ g.L}^{-1}$ (TDH 3 h). A eficiência de conversão de carboidratos foi diminuindo ao longo do decréscimo do TDH, a exceção do TDH de 6 h, com variação entre $67,2 \pm 5,6\%$ no TDH de 12 h a $50,0 \pm 3,9\%$, no TDH de 3 h. Este comportamento pode ser associado ao fato de que quanto menor é o TDH, menos tempo é disponibilizado para que haja a quebra dos açúcares, resultando em maiores sobras de glicose, logo, em menores conversões de carboidrato.

Estudos anteriores que utilizaram o melaço para produção de hidrogênio, comprovam a elevada eficiência de conversão de carboidrato do referido substrato (LAY et al., 2010; WANG e JIN, 2009, CHANG et al., 2011; REGO, 2016). Lay et al. (2010) constataram conversões de açúcar entre 60,2% e 74,9% em um CSTR. Wang e Jin (2009), utilizando um biorreator em escala laboratorial (BioFlo 110) obtiveram consumos superiores de carboidrato, resultando em eficiências de conversão entre 90,97% e 96,06%. Chang et al. (2011), em um reator anaeróbio de contato (ACR), atingiram de 72% a 85%. Rego (2016), em um RALF mesofílico, alcançou remoções entre 85% e 96%.

5.5 Determinação de Sólidos Suspensos

A Tabela 18 apresenta a concentração média de sólidos suspensos totais (SST), sólidos suspensos fixos (SSF) e sólidos suspensos voláteis (SSV) obtidas nas amostras de afluentes e efluentes durante a operação do RALF. Na Figura 15 são mostradas as porcentagens dos SSF e SSV em relação aos SST contidos nos efluentes em cada TDH. Em todos os TDHs os SSV representaram a maior parte dos SST, com porcentagens entre 79% e 92%.

Tabela 18: Variação da concentração de SST, SSF e SSV no afluente e no efluente durante os TDHs aplicados.

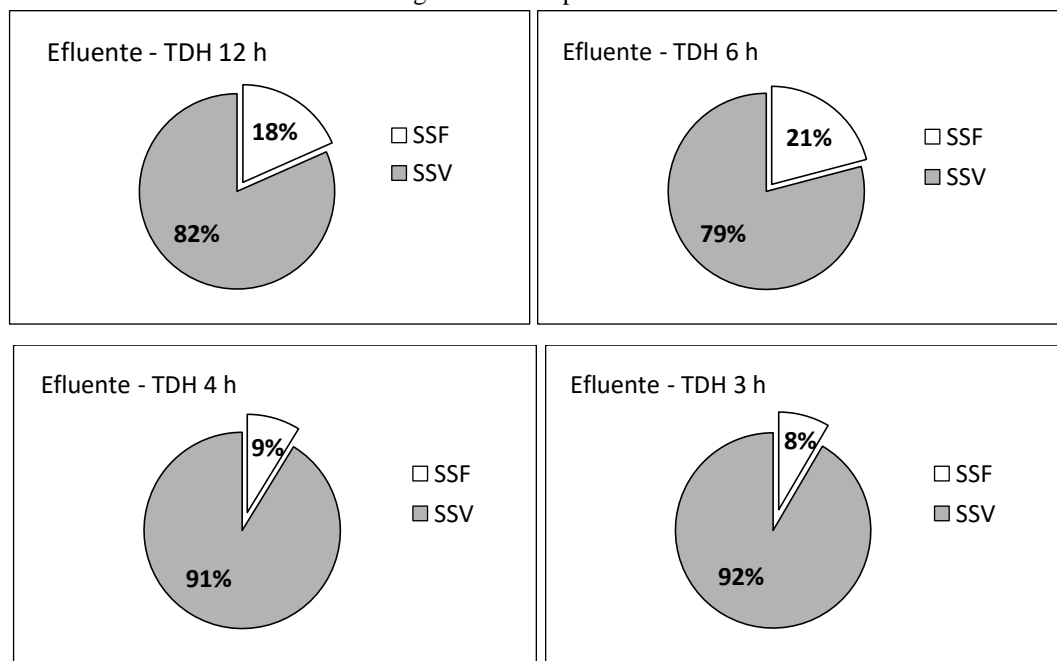
TDH (h)	Sólidos Suspensos (mg.L^{-1})						SSV _E -SSV _A
	Afluente			Efluente			
	SST _A	SSF _A	SSV _A	SST _E	SSF _E	SSV _E	
12	207,5	72,7	134,8	1073,2	197,1	876,1	741,3
6	533,0	149,0	384,0	1763,2	368,6	1394,6	1010,6
4	193,3	32,2	161,1	339,3	29,7	309,6	148,5
3	202,7	33,4	169,3	315,1	26,6	288,6	119,3

Fonte: Autora (2018)

A concentração de SST no afluente variou entre $193,3 \text{ mg.L}^{-1}$ (TDH 4 h) e $533,0 \text{ mg.L}^{-1}$ (TDH 6 h), enquanto que no efluente o valor mínimo foi $315,1 \text{ g.L}^{-1}$ (TDH 3 h) e o máximo

foi $1763,2 \text{ g.L}^{-1}$ (TDH 6 h) g.L^{-1} . Segundo Martins e Amorim (2016), através da concentração de SSV é possível estimar a quantidade de biomassa desprendida das partículas de material suporte, que é liberada do reator junto ao efluente, logo, as diferenças obtidas entre as quantidades de SSV no efluente e afluente, entre $119,3$ e $1010,6 \text{ mg.L}^{-1}$, indica que houve grande perda de biomassa saindo do RALF junto ao efluente, com destaque para o TDH 6 h.

Figura 15: Porcentagens médias de sólidos suspensos fixos e voláteis nos efluentes do RALF verificados ao longo das fases operacionais.



Fonte: Autora (2018)

5.6 Produção de Hidrogênio

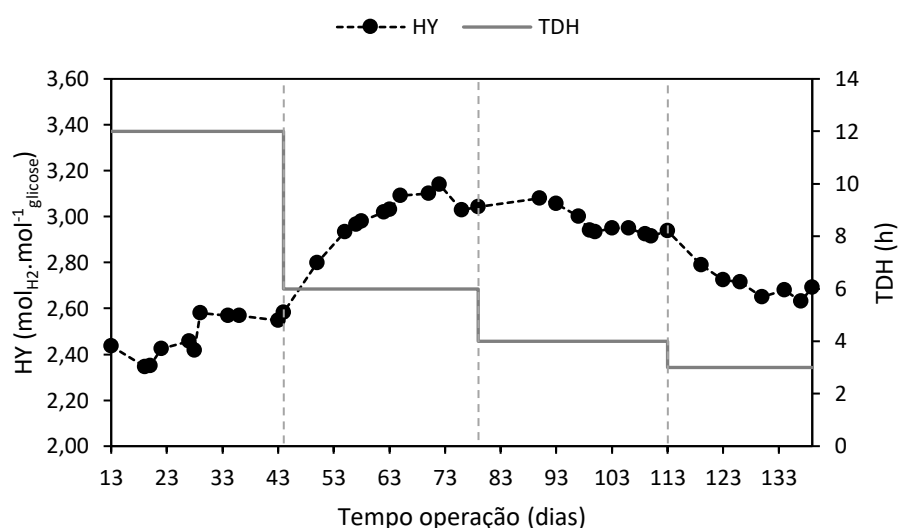
Aqui são apresentados os rendimentos, as produções volumétricas e o conteúdo de H_2 no biogás produzido ao longo das fases operacionais, além da taxa de produção de energia (EPR) de H_2 .

5.6.1 Rendimento de hidrogênio (HY)

Na Figura 16 é mostrado o perfil de dependência do rendimento de hidrogênio (HY) ao longo da operação do RALF com as devidas variações de TDH. As médias dos dados experimentais em condição de estado estacionário são apresentadas na Figura 17 e na Tabela

19. No geral, o reator produziu altos rendimentos de hidrogênio em todas as fases, o qual aumentou de $2,57 \pm 0,01$ para $3,07 \pm 0,05 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}^{-1}_{\text{glicose}}$ quando o TDH foi diminuído de 12 para 6 h. Ao diminuir ainda mais o TDH para 4 e 3 h, os rendimentos caíram, respectivamente, para $2,94 \pm 0,01$ e $2,66 \pm 0,03 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}^{-1}_{\text{glicose}}$. Logo, o TDH de 6 h foi considerado o TDH ótimo para o alcance do rendimento máximo de hidrogênio através da produção contínua em RALF a partir do melaço de cana de açúcar.

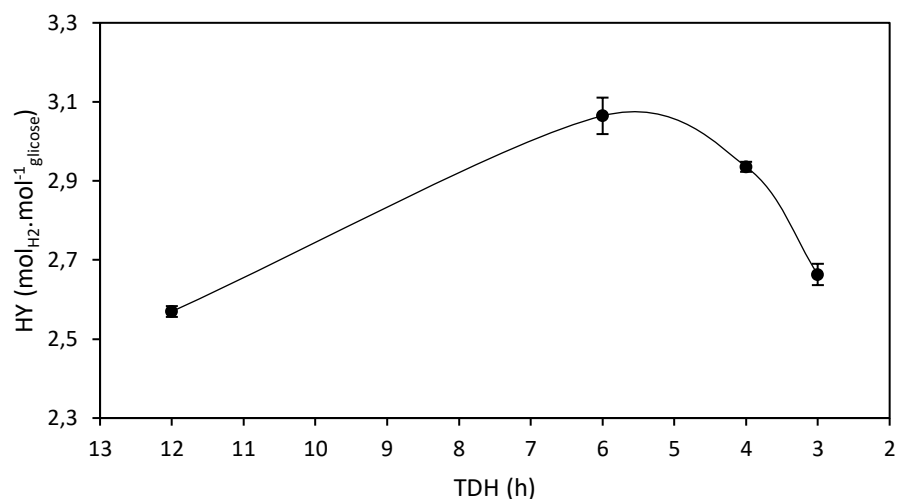
Figura 16: Perfil de dependência do rendimento de hidrogênio (HY) com o TDH ao longo do tempo de operação do RALF.



Fonte: Autor (2018)

O aumento do HY ao longo da diminuição do TDH, é devido ao favorecimento do crescimento de microrganismos produtores de H_2 nesses TDHs, significando que a partir do TDH de 4 h, a presença desses microrganismos foi diminuindo, conforme registrado pela diminuição do HY. Os rendimentos de hidrogênio obtidos neste experimento estão relacionados diretamente com os metabólitos solúveis totais produzidos no RALF, conforme está discutido na seção 5.7 (Composição dos Metabólitos Solúveis no Efluente).

Na Tabela 19 também são apresentadas as eficiências de conversão do melaço em hidrogênio em cada TDH. Esse parâmetro é bastante utilizado para avaliar o potencial dos substratos quanto a produção de hidrogênio; consiste na relação entre o rendimento de hidrogênio obtido a partir do substrato e o rendimento máximo teórico de $4 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}^{-1}_{\text{glicose}}$ que pode ser obtido, com base na rota do ácido acético, considerando conversão completa da glicose. Observa-se que a eficiência de conversão do melaço em H_2 foi bastante atraente e significativa, variando entre 64,24% (TDH 12 h) e 76,62% (TDH 6 h), o que comprova a sua elevada capacidade de produção de H_2 .

Figura 17: Rendimento de hidrogênio no RALF ao longo da diminuição do TDH.

Fonte: Autora (2018)

Tabela 19: Valores médios do rendimento de hidrogênio (HY) e da eficiência de conversão do melão em hidrogênio, com seus respectivos desvios padrões, para cada faixa de TDH aplicado no RALF.

TDH (h)	HY (mol _{H2} .mol _{glicose} ⁻¹)	Eficiência de Conversão (%)
12	2,57 ± 0,01	64,24
6	3,07 ± 0,05	76,62
4	2,94 ± 0,01	73,39
3	2,66 ± 0,03	66,58

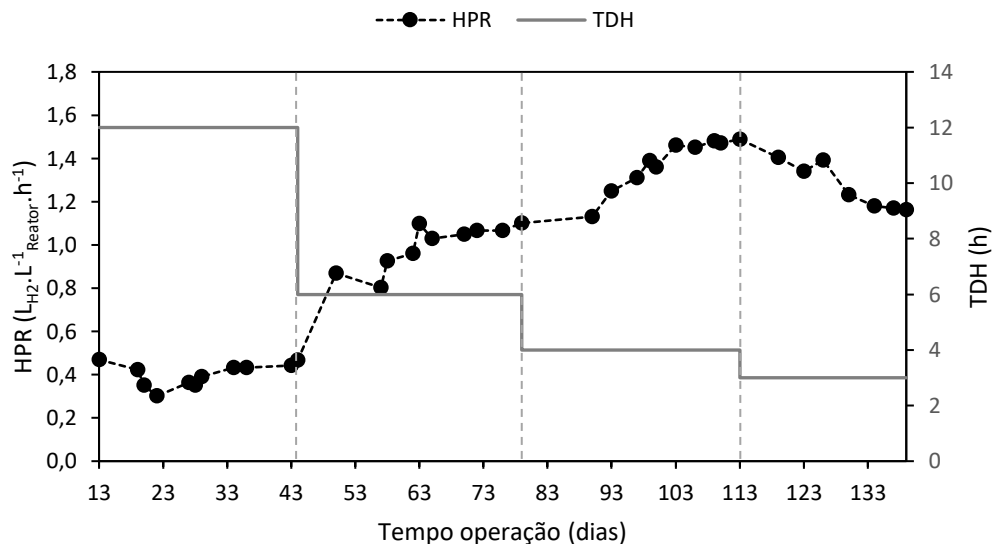
Fonte: Autora (2018)

O HY máximo alcançado (3,07 mol_{H2}.mol_{glicose}⁻¹ – TDH 6 h), foi superior ao encontrado por vários autores que aplicaram o melão para o mesmo fim (WANG E JIN, 2009; LAY et al., 2010; CHANG et al.; 2011; REGO, 2016). Wang e Jin (2009) obtiveram HY máximo de 1,85 mol_{H2}.mol⁻¹_{hexose} ao empregarem um reator batelada a 39 °C alimentado a 100 g_{DQO}.L⁻¹. Lay et al. (2010), por meio de um CSTR com 40 g_{DQO}.L⁻¹ de substrato atingiram o ápice de 2,1 mol_{H2}.mol⁻¹_{hexose} no TDH de 12 h. Chang et al. (2011) chegaram ao pico de 1,4 mol_{H2}.mol⁻¹_{glicose} sob carregamento de 11g.L⁻¹ de DQO em TDH de 6 h num reator anaeróbio de contato. Rego (2016) em um RALF mantido a 5 g_{DQO}.L⁻¹ conseguiu o melhor rendimento de 1,4 mol_{H2}.mol⁻¹_{sacarose} no TDH de 4 h. Já Guo et al. (2008), a partir de um EGSB alimentado também por melão, a 10 g_{DQO}.L⁻¹, alcançaram no TDH de 2 h, um rendimento superior, equivalente a 3,47 mol_{H2}.mol⁻¹_{glicose}.

5.6.2 Produção volumétrica de hidrogênio (HPR) e taxa de produção de energia de hidrogênio (EPR-H₂)

A Figura 18 apresenta o comportamento da produção volumétrica de hidrogênio (HPR) ao decorrer do tempo de operação do RALF nas fases aplicadas. Na Figura 19 e na Tabela 20 são expostos os valores médios calculados sob condições de estado estacionário. Percebe-se que a medida em que o TDH foi diminuído de 12 h para 6 h, a HPR aumentou em mais de 100%, de $0,43 \pm 0,03 \text{ L}_{\text{H}_2} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Reator} \cdot \text{h}^{-1}$ para $1,07 \pm 0,03 \text{ L}_{\text{H}_2} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Reator} \cdot \text{h}^{-1}$. Ao diminuir ainda mais o TDH, para 4 h, a HPR apresentou um aumento em torno de 34%, chegando a $1,44 \pm 0,05 \text{ L}_{\text{H}_2} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Reator} \cdot \text{h}^{-1}$. Entretanto, ao aplicar o TDH de 3 h, houve uma diminuição de aproximadamente 17% na HPR, passando a $1,19 \pm 0,03 \text{ L}_{\text{H}_2} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Reator} \cdot \text{h}^{-1}$.

Figura 18: Perfil de dependência da produção volumétrica de hidrogênio (HPR) com o TDH ao longo do tempo de operação do RALF.



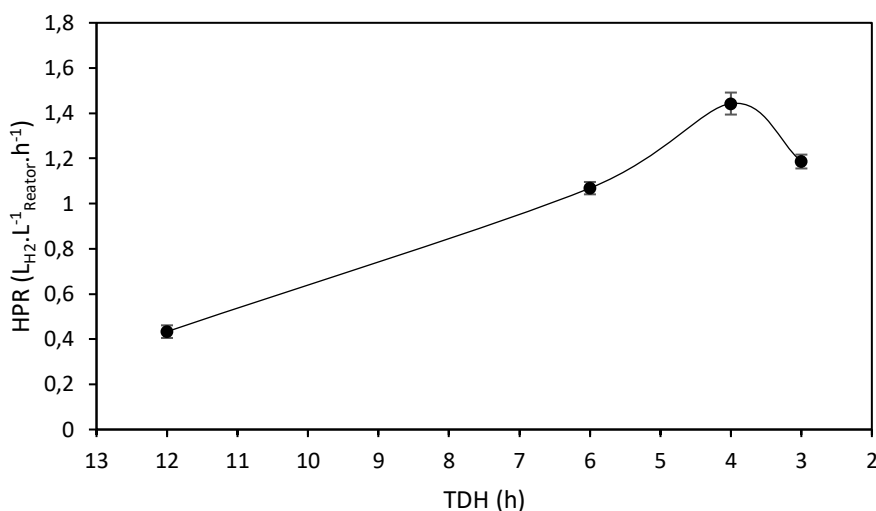
Fonte: Autora (2018)

O aumento da HPR com a diminuição do TDH é explicado pelo fato de que baixos TDHs correspondem a altas vazões, as quais promovem condições favoráveis ao crescimento de bactérias acidogênicas, que são microrganismos de crescimento rápido, e desfavoráveis ao crescimento de arqueas metanogênicas, que apresentam crescimento lento, sendo carregadas do sistema.

O decréscimo da HPR observado com aplicação do TDH 3 h pode ser devido ao fato de os microrganismos não terem tido tempo suficiente para hidrolisar o açúcar contido no melaço nesse pequeno TDH de 3 h, o que pode ser confirmado pelo menor consumo de carboidrato

registrado nesse TDH, com uma eficiência de conversão de carboidrato de apenas $50,0 \pm 3,9\%$ (Tabela 17). Os resultados encontrados indicam que o TDH afetou significativamente a produção de hidrogênio no reator e que o TDH de 4 h pode ser escolhido como o TDH ideal para a produção de hidrogênio a partir de melão de cana de açúcar no RALF.

Figura 19: Produção volumétrica de hidrogênio no RALF ao longo da diminuição do TDH.



Fonte: Autora (2018)

Tabela 20: Valores médios da produção volumétrica de hidrogênio (HPR) e da taxa de produção de energia de H_2 (EPR - H_2) para cada TDH aplicado no RALF.

TDH (h)	HPR ($L_{H_2} \cdot L^{-1}_{Reator} \cdot h^{-1}$)	EPR- H_2 ($kJ \cdot L^{-1}_{Reator} \cdot d^{-1}$)
12	$0,43 \pm 0,03$	111,36
6	$1,07 \pm 0,03$	277,44
4	$1,44 \pm 0,05$	373,25
3	$1,19 \pm 0,03$	308,45

Fonte: Autora (2018)

Uma comparação entre os valores de HPR observados por outros pesquisadores que utilizaram o mesmo substrato deste trabalho, mostra que a produção volumétrica alcançada aqui é excedente aos valores atingidos por esses autores. Ren et al. (2006), Guo et al. (2008), Wang e Jin (2009), Park et al. (2010), Wang et al. 2013 e Rego (2016), atingiram, respectivamente, 0,23, 0,71, 0,44, 0,12, 0,31 e 0,2 $L_{H_2} \cdot L^{-1}_{Reator} \cdot h^{-1}$.

Na Tabela 20 também são expostas as taxas de produção de energia de hidrogênio (EPR- H_2) referentes aos TDHs analisados. Foi obtida uma EPR máxima de $373,25 \text{ kJ} \cdot L^{-1}_{Reator} \cdot d^{-1}$ no TDH de 4 h, a partir da fermentação do melão de cana de açúcar no RALF.

A Tabela 21 compara valores de HPR e EPR de alguns trabalhos que utilizaram diferentes substratos ricos em carboidratos para produzir hidrogênio. Dependendo do substrato

aplicado, as EPRs são diferentes, mas a nível comparativo, percebe-se que este estudo alcançou valores de HPR e EPR dentro das faixas encontradas na literatura.

Tabela 21: Comparação entre valores máximos de HPR e EPR-H₂ obtidas a partir de alguns estudos utilizados para produzir H₂.

Substrato	Reator	TDH (h)	HPR (L _{H2} ·L ⁻¹ _{Reator} ·d ⁻¹)	EPR-H ₂ (kJ·L ⁻¹ _{Reator} ·d ⁻¹)	Fonte
Manipueira	RALF	1	^(b) 48,96	^(a) 528,77	Amorim et al. (2014)
Vinhaça de cana de açúcar	RALF	1	^(b) 47,04	^(a) 508,03	Santos et al. (2014)
Vinhaça de cana de açúcar e glicose	RALF	1	^(a) 13,68	^(b) 147,74	Reis et al. (2015)
Xarope de cana de açúcar	CSTR	3	17,50	189,00	Nualsri et al. (2016)
Soro de queijo	RALF	0,5	^(b) 98,4	^(a) 1062,72	Ottaviano et al. (2016)
Manipueira	RALF	12	2,10	^(a) 22,68	Rosa et al. (2016)
Melaço de cana de açúcar	RALF	4	34,56	373,25	Este estudo

^(a) calculado a partir dos dados originais.

^(b) convertido em L_{H2}·L⁻¹_{Reator}·d⁻¹ a partir dos dados originais.

Fonte: Autora (2018)

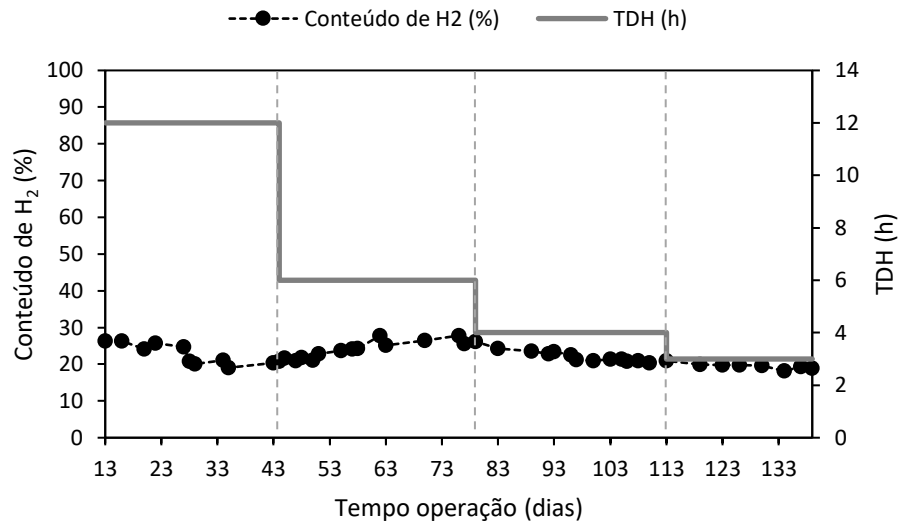
5.6.3 Composição do biogás produzido no RALF

O biogás foi avaliado quanto a produção de hidrogênio, dióxido de carbono e metano; O gás metano não foi detectado em nenhuma das fases operacionais, comprovando a eficiência do tratamento térmico do lodo. Houve apenas produção dos gases H₂ e CO₂, os quais não apresentaram variações significativas em relação a composição percentual do biogás. Na Figura 20 é mostrado o perfil do conteúdo de hidrogênio durante o tempo de operação do reator em cada TDH. Este comportamento sugere que a diminuição do TDH, e conseqüentemente, o aumento da COV não afetaram significativamente o conteúdo do H₂ no biogás.

A Tabela 22 e a Figura 21 apresentam os valores médios da composição do biogás referentes ao estado estacionário. O biogás foi representado, em todos os TDHs, por quantidades elevadas de CO₂, entre 74,05 ± 1,39% (TDH 6 h) e 80,85 ± 0,63% (TDH 3 h). O conteúdo de hidrogênio aumentou de 20,35 ± 0,72% para 25,95 ± 1,39% ao diminuir o TDH de 12 h para 6 h, mas ao aplicar os TDHs de 4 h e 3 h, estes conteúdos sofreram decréscimos, para 21,01 ± 0,37% e 19,15 ± 0,63%, respectivamente. Portanto, o conteúdo de hidrogênio, seguiu

o mesmo comportamento do HY em relação as mudanças de TDH, porém de forma menos acentuada, sendo de acréscimo entre os TDHs de 12 h e 6 h, e decréscimo entre 4 h e 3 h.

Figura 20: Perfil de dependência do conteúdo de H₂ com o TDH ao longo do tempo de operação do RALF.



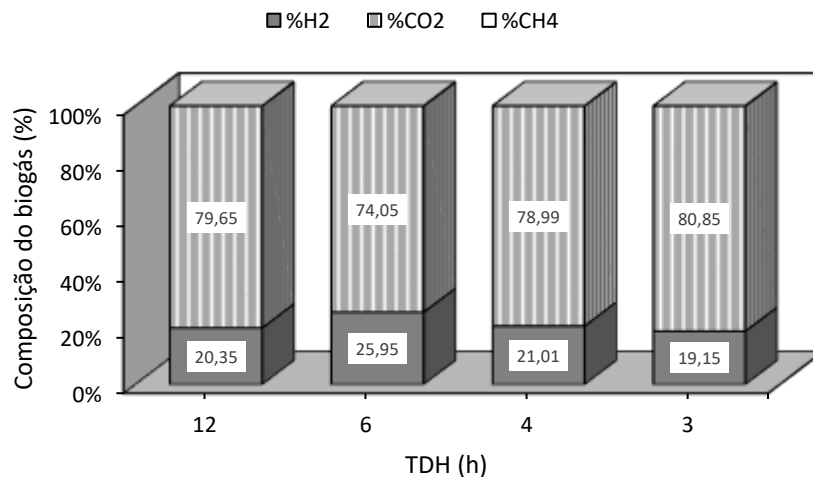
Fonte: Autora (2018)

Tabela 22: Valores médios e desvios padrões da composição percentual do biogás produzido no RALF para cada tempo de detenção hidráulica (TDH) aplicado.

TDH (h)	H ₂ (%)	CO ₂ (%)	CH ₄ (%)
12	20,35 ± 0,72	79,65 ± 0,72	0,00 ± 0,00
6	25,95 ± 1,39	74,05 ± 1,39	0,00 ± 0,00
4	21,01 ± 0,37	78,99 ± 0,37	0,00 ± 0,00
3	19,15 ± 0,63	80,85 ± 0,63	0,00 ± 0,00

Fonte: Autora (2018)

Figura 21: Conteúdo do biogás produzido no RALF ao longo da diminuição do tempo de detenção hidráulica (TDH).



Fonte: Autora (2018)

As baixas porcentagens de H₂ verificadas no biogás produzido no RALF podem estar associadas as elevadas produções de ácido acético obtidas neste trabalho, conforme descrito na seção 5.7 sobre os metabólitos solúveis produzidos, visto que, quando em demasia, esse ácido favorece a ocorrência da homoacetogênese, que acontece com saldo zero de H₂, beneficiando a ocorrência de altas porcentagens de CO₂.

Em seu estudo sobre a produção de hidrogênio a partir de diferentes fontes de carbono, Rego (2016) observou o mesmo comportamento quanto a porcentagem de H₂ no biogás produzido com a utilização de vinhaça de cana de açúcar; o autor obteve o máximo de 13% de H₂, associando a baixa porcentagem a elevada produção de ácido acético, devido a possível ocorrência de uma homoacetogênese com consequente inibição de H₂.

Observa-se que mesmo havendo altos HY e HPR no RALF, o conteúdo de H₂ foi baixo, quando comparado com outros trabalhos que estudaram a produção de H₂ a partir de melaço. Ren et al. (2006), Lay et al. (2010), Chang et al. (2011), Li et al. (2013) e Rego (2016) alcançaram, respectivamente, 52%, 51,7%, 46%, 55,91% e 33%, de conteúdo máximo de H₂ no biogás produzido a partir deste substrato.

Outra possível explicação para os baixos conteúdos de H₂ obtidos no RALF é a probabilidade de que a maior parte do H₂ produzido no reator estivesse dissolvido no líquido e não na forma de gás, o que justificaria os altos HY e HPR, que foram calculados com base nos metabólitos solúveis, enquanto que a porcentagem de H₂ foi calculada com base no biogás.

5.6.4 Efeito da COV na produção de H₂

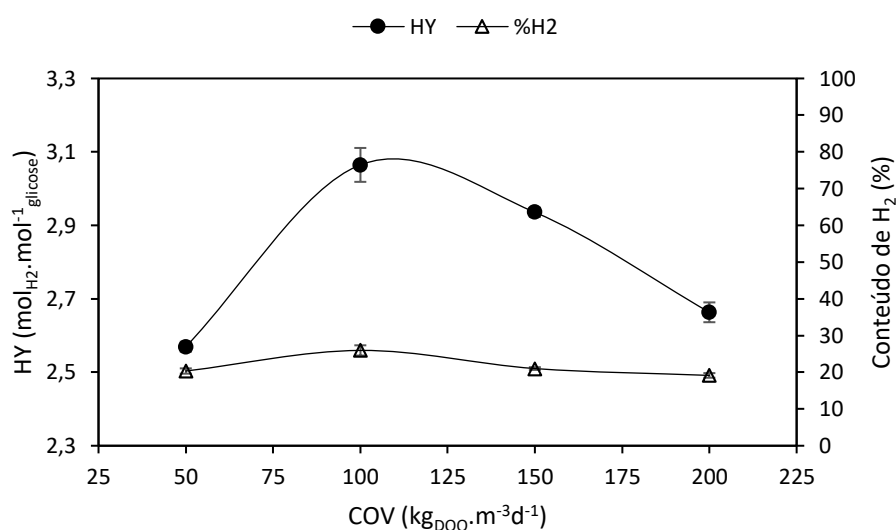
A Tabela 23 e as Figuras 22 e 23 apresentam os rendimentos, as produções volumétricas e os conteúdos de hidrogênio ao longo do aumento da carga orgânica volumétrica. O rendimento e o conteúdo de hidrogênio tiveram o mesmo comportamento e aumentaram com a COV na faixa de 50 kg_{DQO}.m⁻³_{Reator}.d⁻¹ a 100 kg_{DQO}.m⁻³_{Reator}.d⁻¹, atingindo os valores máximos de 3,07 ± 0,05 mol_{H2}.mol_{glicose}⁻¹ e 25,95 ± 1,39% de H₂, respectivamente. No entanto, com o aumento adicional na COV, esses valores começaram a diminuir, caindo para 2,66 ± 0,03 mol_{H2}.mol_{glicose}⁻¹ e 19,15 ± 0,63% de H₂, respectivamente, na COV mais alta (200 kg_{DQO}.m⁻³_{Reator}.d⁻¹). Já a HPR aumentou até a COV de 150 kg_{DQO}.m⁻³_{Reator}.d⁻¹, com ápice de 1,44 ± 0,05 L_{H2}.L_{Reator}⁻¹.h⁻¹, diminuindo para 1,19 ± 0,03 L_{H2}.L_{Reator}⁻¹.h⁻¹ na COV de 200 kg_{DQO}.m⁻³_{Reator}.d⁻¹. Isto significa que a aplicação de alta COV inibiu a produção de hidrogênio, provavelmente devido a sobrecarga do sistema e a limitações cinéticas.

Tabela 23: Valores médios do rendimento de hidrogênio (HY), da produção volumétrica de hidrogênio (HPR) e do conteúdo de hidrogênio (%) para as diferentes cargas orgânicas volumétricas (COV) aplicadas no RALF. (\pm desvios padrões).

COV ($\text{kg}_{\text{DQO}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$)	HY ($\text{mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{glicose}}^{-1}$)	HPR ($\text{L}_{\text{H}_2} \cdot \text{L}_{\text{Reator}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	Conteúdo de H_2 (%)
50	$2,57 \pm 0,01$	$0,43 \pm 0,03$	$20,35 \pm 0,72$
100	$3,07 \pm 0,05$	$1,07 \pm 0,03$	$25,95 \pm 1,39$
150	$2,94 \pm 0,01$	$1,44 \pm 0,05$	$21,01 \pm 0,37$
200	$2,66 \pm 0,03$	$1,19 \pm 0,03$	$19,15 \pm 0,63$

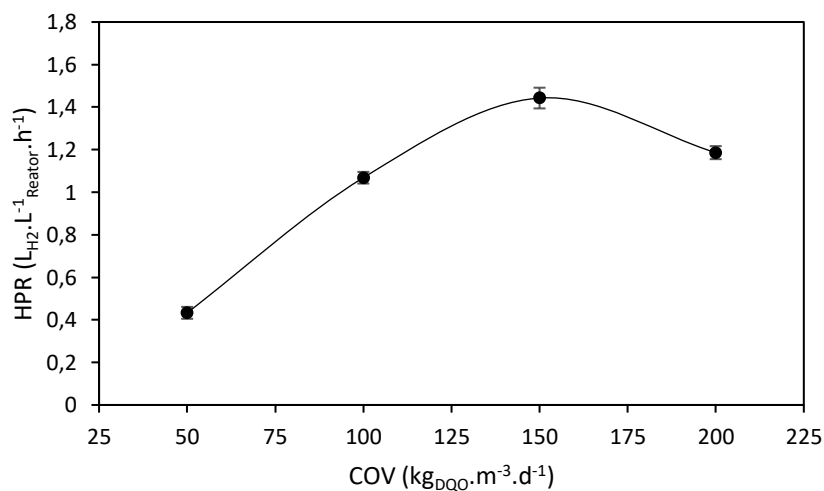
Fonte: Autora (2018)

Figura 22: Rendimento e conteúdo de hidrogênio no RALF ao longo do aumento da carga orgânica volumétrica (COV).



Fonte: Autora (2018)

Figura 23: Produção volumétrica de hidrogênio (HPR) no RALF ao longo do aumento da carga orgânica volumétrica (COV).



Fonte: Autora (2018)

Foi constatado neste estudo o aumento da HPR até a COV de $150 \text{ kg}_{\text{DQO}} \cdot \text{m}^{-3}_{\text{Reator}} \cdot \text{d}^{-1}$ e o aumento do HY até a COV de $100 \text{ kg}_{\text{DQO}} \cdot \text{m}^{-3}_{\text{Reator}} \cdot \text{d}^{-1}$. Vários estudos anteriores já detectaram que altas cargas orgânicas volumétricas podem inibir a produção de hidrogênio. Neste trabalho a inibição ocorreu em COV de $200 \text{ kg}_{\text{DQO}} \cdot \text{m}^{-3}_{\text{Reator}} \cdot \text{d}^{-1}$ para o HY e de $150 \text{ kg}_{\text{DQO}} \cdot \text{m}^{-3}_{\text{Reator}} \cdot \text{d}^{-1}$ para a HPR. Ren et al. (2006) verificaram a diminuição do HY e da HPR ao aplicarem COVs de $85,57 \text{ kg}_{\text{DQO}} \cdot \text{m}^{-3}_{\text{reator}} \cdot \text{d}^{-1}$ e $49,64 \text{ kg}_{\text{DQO}} \cdot \text{m}^{-3}_{\text{reator}} \cdot \text{d}^{-1}$, respectivamente. Guo et al. (2008) verificaram a ocorrência de redução de HY e HPR em COV de $192 \text{ kg}_{\text{DQO}} \cdot \text{m}^{-3}_{\text{Reator}} \cdot \text{d}^{-1}$. No estudo de Lay et al. (2010), a redução do rendimento foi observada com aplicação de $120 \text{ kg}_{\text{DQO}} \cdot \text{m}^{-3}_{\text{Reator}} \cdot \text{d}^{-1}$ e a HPR foi crescente até a COV máxima aplicada ($320 \text{ kg}_{\text{DQO}} \cdot \text{m}^{-3}_{\text{Reator}} \cdot \text{d}^{-1}$). Estes autores também utilizaram o melão como fonte de matéria orgânica.

Vários pesquisadores, ao utilizarem um RALF, a partir de diferentes substratos, também detectaram o efeito da inibição de altas COVs na produção de H_2 . Amorim et al. (2014), ao implementarem um RALF nutrido por água residuária de mandioca (manipueira) a $4 \text{ g}_{\text{DQO}} \cdot \text{L}^{-1}$ observaram que a aplicação de $161 \text{ kg}_{\text{DQO}} \cdot \text{m}^{-3}_{\text{Reator}} \cdot \text{d}^{-1}$ (TDH 1 h) ocasionou a diminuição do HY, de $1,91 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}^{-1}_{\text{glicose}}$ para $1,2 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}^{-1}_{\text{glicose}}$; mas a HPR alcançou o seu máximo, $2,04 \text{ L}_{\text{H}_2} \cdot \text{L}^{-1}_{\text{Reator}} \cdot \text{h}^{-1}$, nesta COV. Shida et al. (2012) verificaram que COVs superiores a $84,3 \text{ kg}_{\text{DQO}} \cdot \text{m}^{-3}_{\text{Reator}} \cdot \text{d}^{-1}$ provocaram o decréscimo do HY obtido a partir de glicose sem adição de alcalinizante e que a HPR aumentou até a COV máxima aplicada ($140,6 \text{ kg}_{\text{DQO}} \cdot \text{m}^{-3}_{\text{Reator}} \cdot \text{d}^{-1}$).

5.7 Composição dos Metabólitos Solúveis no Efluente

Durante a acidogênese dos açúcares, vários metabólitos foram produzidos junto com o hidrogênio, em diferentes concentrações. Na Tabela 24 são expostas as concentrações médias em $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ dos metabólitos solúveis produzidos no RALF referentes aos TDHs aplicados. Todas as fases tiveram a presença de acetona, metanol, etanol, n-butanol, ácido acético, ácido propiônico e ácido butírico, com o etanol e o ácido acético em maiores quantidades. Os ácidos isobutírico, isovalérico, valérico e caproíco não foram detectados no reator.

As concentrações de acetona e n-butanol mantiveram-se quase constantes ao longo dos TDHs, com valores entre $11,3 \pm 0,4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ e $12,6 \pm 1,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ para a acetona e entre $12,1 \pm 0,3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ e $18,0 \pm 5,5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ para o n-butanol. O metanol variou razoavelmente, de $29,6 \pm 0,5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ até $45,1 \pm 0,9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Já o etanol e os ácidos acético, butírico e propiônico foram influenciados significativamente pelas mudanças de TDH.

Tabela 24: Concentrações médias, em mg/L, dos metabólitos solúveis produzidos no RALF em cada TDH aplicado e seus respectivos desvios padrões.

Metabólito mg.L ⁻¹	TDH (h)			
	12	6	4	3
^(a) Acetona	12,6 ± 1,0	11,3 ± 0,4	11,5 ± 0,2	11,4 ± 0,3
^(b) Metanol	29,9 ± 0,4	29,6 ± 0,5	40,9 ± 8,0	45,1 ± 0,9
^(c) Etanol	2.119,6 ± 807,7	3.170,1 ± 779,6	3.786,6 ± 499,7	2.870,4 ± 596,8
^(d) n-Butanol	18,0 ± 5,5	16,4 ± 2,9	14,4 ± 2,4	12,1 ± 0,3
^(e) Ácido Acético	2.329,3 ± 639,6	1.941,1 ± 397,8	1.319,5 ± 248,0	1.110,8 ± 114,0
^(f) Ácido Propiônico	195,9 ± 86,7	324,1 ± 61,9	465,5 ± 279,7	363,7 ± 44,5
^(g) Ácido Isobutírico	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
^(h) Ácido Butírico	1.198,6 ± 816,0	1.941,8 ± 687,5	844,6 ± 352,1	531,8 ± 142,0
⁽ⁱ⁾ Ácido Isovalérico	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
^(j) Ácido Valérico	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
^(k) Ácido Caproico	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

^(a)LD₁ – Limite de detecção da acetona = 14,9 mg/L; ^(b)LD₂ – Limite de detecção do metanol = 19,3 mg/L; ^(c)LD₃ – Limite de detecção do etanol = 15,6 mg/L; ^(d)LD₄ – Limite de detecção do n-butanol = 12,0 mg/L; ^(e)LD₅ – Limite de detecção do ácido acético = 63,8 mg/L; ^(f)LD₆ – Limite de detecção do ácido propiônico = 49,3 mg/L; ^(g)LD₇ – Limite de detecção do ácido isobutírico = 54,6 mg/L; ^(h)LD₈ – Limite de detecção do ácido butírico = 51,9 mg/L; ⁽ⁱ⁾LD₉ – Limite de detecção do ácido isovalérico = 54,9 mg/L; ^(j)LD₁₀ – Limite de detecção do ácido valérico = 62,4 mg/L; ^(k)LD₁₁ – Limite de detecção do ácido caproico = 11,1 mg/L;

Fonte: Autora (2018)

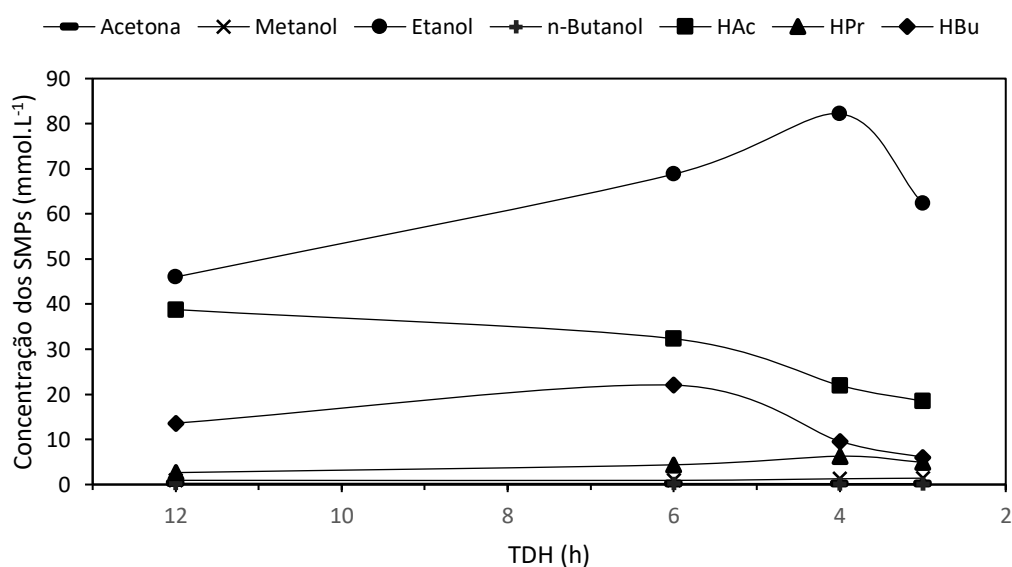
Como cada componente tem uma massa molecular diferente, para ver a predominância de cada um em relação ao total de produtos líquidos, são apresentadas na Tabela 25 e na Figura 24 as concentrações molares médias da acetona, dos álcoois e dos ácidos produzidos no RALF em cada TDH e a porcentagem molar de cada um em relação aos metabólitos totais produzidos (SMPs). A distribuição percentual dos metabólitos ao longo da diminuição dos TDHs pode ser melhor observada na Figura 25.

Tabela 25: Concentração molar, em mmol/L, e porcentagem dos metabólitos produzidos no RALF nos diferentes TDHs.

Metabólito	TDH (h)							
	12		6		4		3	
	mM	%	mM	%	mM	%	mM	%
Acetona	0,22 ± 0,02	0,22 ± 0,04	0,20 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,20 ± 0,00	0,16 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0,21 ± 0,03
Metanol	0,93 ± 0,01	0,93 ± 0,13	0,93 ± 0,01	0,72 ± 0,08	1,28 ± 0,25	1,06 ± 0,23	1,41 ± 0,03	1,54 ± 0,23
Etanol	46,01 ± 17,53	44,09 ± 12,91	68,81 ± 16,92	53,07 ± 10,11	82,19 ± 10,85	67,36 ± 10,85	62,31 ± 12,95	66,23 ± 4,04
n-Butanol	0,24 ± 0,07	0,25 ± 0,10	0,22 ± 0,04	0,17 ± 0,03	0,19 ± 0,03	0,16 ± 0,03	0,16 ± 0,00	0,18 ± 0,02
Ácido Acético	38,79 ± 10,65	37,61 ± 8,47	32,32 ± 6,62	25,29 ± 5,80	21,97 ± 4,13	18,11 ± 3,32	18,50 ± 1,90	20,06 ± 2,80
Ácido Propiônico	2,64 ± 1,17	2,62 ± 1,18	4,38 ± 0,84	3,40 ± 0,57	6,28 ± 3,78	5,22 ± 3,22	4,91 ± 0,60	5,30 ± 0,58
Ácido Butírico	13,60 ± 9,26	14,29 ± 10,42	22,04 ± 7,80	17,18 ± 5,69	9,59 ± 4,00	7,93 ± 3,29	6,04 ± 1,61	6,48 ± 1,56
AVT	55,04 ± 11,20	54,52 ± 12,78	58,74 ± 12,79	45,88 ± 10,06	37,84 ± 4,72	31,25 ± 4,26	29,44 ± 3,37	31,84 ± 3,87
SMP	102,44 ± 12,88	100	128,89 ± 12,43	100	121,71 ± 11,25	100	93,52 ± 14,92	100

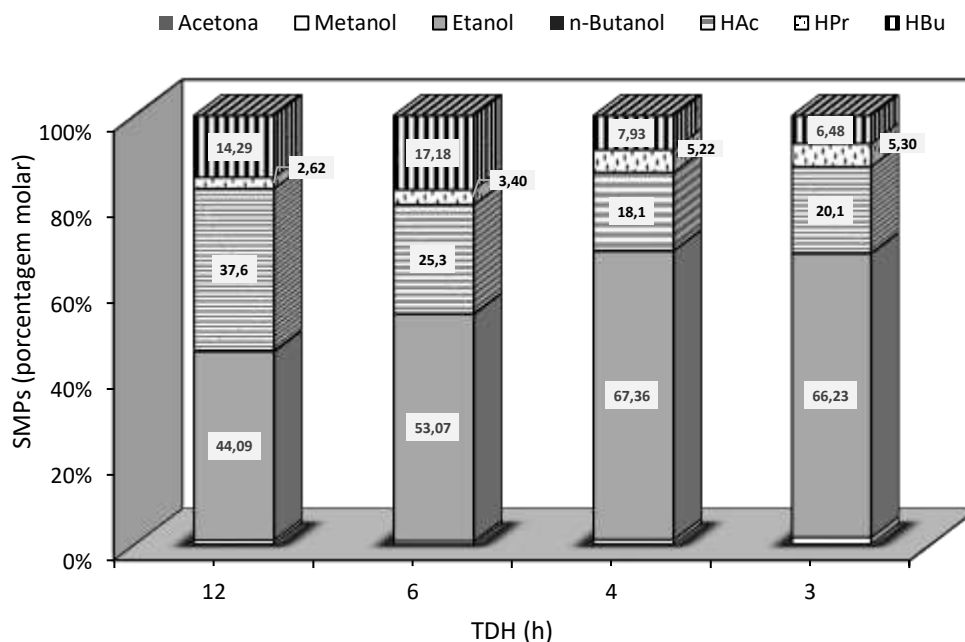
AVT = ácidos voláteis totais produzidos; SMP = metabólitos solúveis totais produzidos.
Porcentagens calculadas a partir das concentrações molares.

Fonte: Autora (2018)

Figura 24: Perfil de dependência da concentração molar média, em mmol.L⁻¹ dos metabólitos solúveis produzidos (SMPs) no RALF, com os diferentes TDHs.

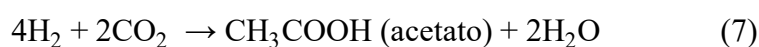
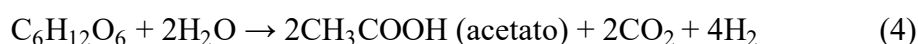
Fonte: Autora (2018)

Figura 25: Metabólitos solúveis produzidos (SMPs) no RALF (%) ao longo da diminuição do TDH (HAc=ácido acético, HPr = ácido propiônico e HBU = ácido butírico).



Fonte: Autora (2018)

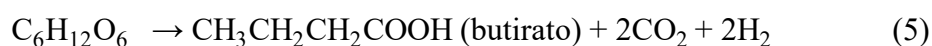
Dos gráficos e tabelas expostas percebe-se que o TDH, além de influenciar a HPR e o HY, também afetou os SMPs, que estão relacionados diretamente com os rendimentos obtidos no RALF. O menor rendimento foi observado no TDH de 12 h ($2,57 \pm 0,01 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{glicose}}^{-1}$) e alcançou o ápice de $3,07 \pm 0,05 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{glicose}}^{-1}$ no TDH de 6 h (Tabela 18). A presença do ácido acético em maior concentração ($38,79 \pm 10,65 \text{ mM}$ e $37,61 \pm 8,47\%$ dos SMPs) no TDH de 12 h pode estar relacionada com o menor HY alcançado nesta fase. Quando este ácido é apenas um subproduto da fermentação na ausência de luz, resulta em um HY máximo de $4 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{glicose}}^{-1}$ (Eq. 4), mas nem sempre a presença do mesmo está ligada ao alcance de altos HYs, isto porque, bactérias homoacetogênicas que provavelmente resistiram ao tratamento térmico do inóculo, podem ter utilizado H_2 para produzir ácido acético (Eq. 7).



Ao aplicar TDHs menores (6 h, 4 h e 3 h), pode ter havido lavagem das homoacetogênicas, o que ocasionou a diminuição da concentração do ácido acético, e, conseqüentemente, o consumo de menos hidrogênio nesses TDHs, resultando em maiores HY. Foram registrados $32,32 \pm 6,62 \text{ mM}$, $21,97 \pm 4,13 \text{ mM}$ e $18,50 \pm 1,90 \text{ mM}$ de ácido acético,

respectivamente, nessas fases, correspondendo a $25,29 \pm 5,80\%$, $18,11 \pm 3,32\%$ e $20,06 \pm 2,80\%$ dos SMPs.

As concentrações de etanol e de ácido butírico aumentaram, respectivamente, de $46,01 \pm 17,53$ mM ($44,09 \pm 12,91\%$ dos SMPs) para $68,81 \pm 16,92$ mM ($53,07 \pm 10,11$ dos SMPs) e de $13,60 \pm 9,26$ mM ($14,29 \pm 10,42\%$ dos SMPs) para $22,04 \pm 7,80$ mM ($17,18 \pm 5,69\%$ dos SMPs), quando o TDH foi reduzido de 12 h para 6 h, estando de acordo com o aumento observado no HY, visto que a fermentação destes metabólitos gera HYs máximos teóricos de $2 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{glicose}}^{-1}$ (Eq. 5 e 6). No TDH ótimo de 6 h, o ácido butírico alcançou a sua maior concentração e o etanol representou $53,07\%$ dos SMPs, indicando que a produção de hidrogênio neste trabalho seguiu principalmente a rota fermentativa do etanol.



No TDH de 4 h, apesar da concentração de etanol ter tido o seu valor máximo ($82,19 \pm 10,85$ mM), representando $67,36 \pm 10,85\%$ dos SMPs, o HY sofreu um pequeno decréscimo ($2,94 \pm 0,01 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{glicose}}^{-1}$), fato este que pode estar relacionado com a redução da concentração do ácido butírico ($9,59 \pm 4,00$ mM e $7,93 \pm 3,29\%$ dos SMPs) para cerca da metade do valor atingindo no TDH anterior. O aumento da concentração do ácido propiônico, que neste TDH atingiu seu ápice ($6,28 \pm 3,78$ mM e $5,22 \pm 3,22\%$ dos SMPs) também pode ter contribuído para a diminuição do HY, pois na rota fermentativa deste metabólito são consumidos 2 mols de H_2 para produzir 2 mols do mesmo (Eq. 8).



O comportamento dos metabólitos solúveis produzidos no TDH de 3 h foi bastante semelhante ao apresentado no TDH de 4 h, entretanto, com concentrações menores de etanol ($62,31 \pm 12,95$ mM e $66,23 \pm 4,04\%$ dos SPMs) e de ácido butírico ($6,04 \pm 1,61$ mM e $6,48 \pm 1,56\%$ dos SMPs), o que resultou em um menor HY ($2,66 \pm 0,03 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{glicose}}^{-1}$).

Outros autores, ao trabalharem com o mesmo substrato desta pesquisa também observaram maiores produções de etanol e ácido acético, indicando uma fermentação do tipo etanol. Mais especificamente, nos estudos de Li et al. (2007), Guo et al. (2008), Han et al. (2010), Chang et al. (2011), Han et al. (2012a), Han et al. (2012b), Li et al. (2013) e Zhu et al.

(2013), o etanol e o ácido acético chegaram a representar, após estabilização, 70%, 89,1%, 89%, 80,7%, 82%, 89,3%, 71,5% e 73% dos metabólitos solúveis totais produzidos, respectivamente. Neste trabalho, essa porcentagem foi de 81,69% (TDH 12 h), 78,37% (TDH 6 h), 85,46% (TDH 4 h) e 86,44% (TDH 3 h). Os autores citados observaram que a fermentação do tipo etanol ocorre em pHs efluentes bastante ácidos, geralmente entre 4 e 4,5; nesta pesquisa os pHs efluentes foram ainda mais baixos, entre 3,83 e 4,08.

Como foram obtidas altas concentrações de etanol, na Tabela 26 são mostrados os rendimentos de etanol (EtOHY) alcançados nos diferentes TDHs. O EtOHY aumentou de $0,58 \pm 0,16 \text{ mol}_{\text{EtOH}} \cdot \text{mol}^{-1}_{\text{glicose}}$ para $1,10 \pm 0,04 \text{ mol}_{\text{EtOH}} \cdot \text{mol}^{-1}_{\text{glicose}}$ quando o TDH foi reduzido de 12 h para 4 h, e, a partir da aplicação do TDH de 3 h, este valor diminuiu para $0,98 \pm 0,08 \text{ mol}_{\text{EtOH}} \cdot \text{mol}^{-1}_{\text{glicose}}$. Portanto, o TDH de 4 h pode ser escolhido como o TDH ótimo para a produção de etanol em RALF a partir de melão de cana de açúcar.

Tabela 26: Rendimentos de etanol obtidos no RALF em cada TDH aplicado.

TDH (h)	EtOHY ($\text{mol}_{\text{EtOH}} \cdot \text{mol}^{-1}_{\text{glicose}}$)
12	$0,58 \pm 0,16$
6	$0,85 \pm 0,13$
4	$1,10 \pm 0,04$
3	$0,98 \pm 0,08$

Fonte: Autora (2018)

Wu et al. (2007) ao realizarem a produção simultânea de hidrogênio e etanol em um biorreator de leite fluidificado, obtiveram a partir da frutose um EtOHY máximo de $0,65 \text{ mol}_{\text{EtOH}} \cdot \text{mol}^{-1}_{\text{hexose}}$.

Reis e Silva (2011), ao estudarem o efeito da velocidade de fluxo ascendente e do tempo de detenção hidráulica em reatores anaeróbios de leite fluidificado utilizados para a produção de hidrogênio a partir de glicose a $5 \text{ g}_{\text{DQO}} \cdot \text{L}^{-1}$ como fonte de carbono, por meio de fermentação tipo etanol, alcançaram um rendimento de etanol superior a este trabalho, no valor de $2,02 \text{ mol}_{\text{EtOH}} \cdot \text{mol}^{-1}_{\text{substrato}}$ na velocidade de $1,24 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ e TDH de 2 h. O HY máximo também obtido nestas mesmas condições operacionais foi $2,55 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}^{-1}_{\text{glicose}}$.

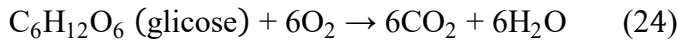
Rosa et al. (2014b) avaliaram a produção de hidrogênio em RALF a partir de soro de queijo com fermentação do tipo etanol, obtendo rendimentos máximo de hidrogênio e etanol no TDH 4 h, onde atingiram $1,33 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}^{-1}_{\text{lactose}}$ e $1,22 \text{ mol}_{\text{EtOH}} \cdot \text{mol}^{-1}_{\text{lactose}}$, respectivamente.

5.8 Balanço de DQO

O balanço de DQO para o efluente do reator foi feito com base nos metabólitos solúveis totais produzidos no efluente (SMPs), na biomassa, representada pelos sólidos suspensos voláteis (SSV) no efluente, e na glicose remanescente, de acordo com a Equação 23:

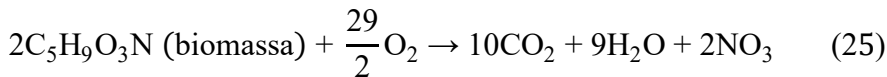
$$DQO_{\text{efluente teórica total}} = DQO_{\text{real dos SMPs}} + DQO_{\text{real glicose efluente}} + DQO_{\text{real biomassa efluente}} \quad (23)$$

As DQOs reais foram calculadas pela multiplicação das concentrações em mg.L^{-1} dos componentes (Tabela 27) pelas respectivas DQOs teóricas (DQO_t) obtidas a partir das equações de combustão devidamente balanceadas de cada um:



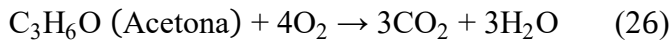
$$DQO_t \text{ (glicose)} = 1,065$$

$$DQO_{\text{real glicose efluente}} (\text{mg}_{DQO} \cdot L^{-1}) = 1,065 \times \text{concentração da glicose efluente} (\text{mg} \cdot L^{-1})$$



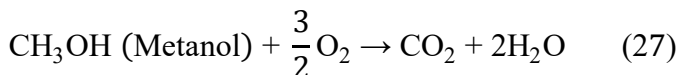
$$DQO_t \text{ (biomassa)} = 1,771$$

$$DQO_{\text{real biomassa efluente}} (\text{mg}_{DQO} \cdot L^{-1}) = 1,771 \times \text{concentração dos SSVs efluente} (\text{mg} \cdot L^{-1})$$



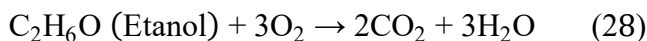
$$DQO_t \text{ (Acetona)} = 2,2$$

$$DQO_{\text{real acetona}} (\text{mg}_{DQO} \cdot L^{-1}) = 2,2 \times \text{concentração da Acetona} (\text{mg} \cdot L^{-1})$$



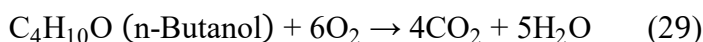
$$DQO_t \text{ (Metanol)} = 1,498$$

$$DQO_{\text{real Metanol}} (\text{mg}_{DQO} \cdot L^{-1}) = 1,498 \times \text{concentração do Metanol} (\text{mg} \cdot L^{-1})$$



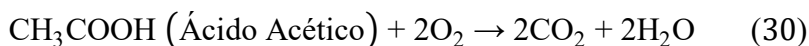
$$DQO_t \text{ (Etanol)} = 2,084$$

$$DQO_{\text{real Etanol}}(\text{mg}_{DQO} \cdot \text{L}^{-1}) = 2,084 \times \text{concentração do Etanol}(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$$



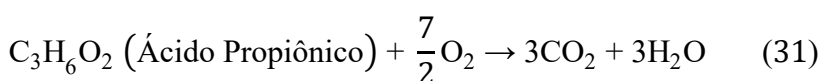
$$DQO_t(\text{n-Butanol}) = 2,59$$

$$DQO_{\text{real n-Butanol}}(\text{mg}_{DQO} \cdot \text{L}^{-1}) = 2,59 \times \text{concentração do n-Butanol}(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$$



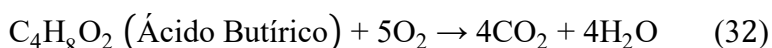
$$DQO_t(\text{Ácido Acético}) = 1,066$$

$$DQO_{\text{real Ácido Acético}}(\text{mg}_{DQO} \cdot \text{L}^{-1}) = 2,59 \times \text{concentração do Ácido Acético}(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$$



$$DQO_t(\text{Ácido Propiônico}) = 1,512$$

$$DQO_{\text{real Ácido Propiônico}}(\text{mg}_{DQO} \cdot \text{L}^{-1}) = 1,512 \times \text{concentração do Ácido Propiônico}(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$$



$$DQO_t(\text{Ácido Butírico}) = 1,816$$

$$DQO_{\text{real Ácido Butírico}}(\text{mg}_{DQO} \cdot \text{L}^{-1}) = 1,816 \times \text{concentração do Ácido Butírico}(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$$

Tabela 27: Concentrações médias e desvios padrões da biomassa, da glicose efluyente e dos metabólitos solúveis produzidos no RALF nos diferentes TDHs.

Metabólito (mg.L ⁻¹)	TDH (h)			
	12	6	4	3
Biomassa (SSV efluyente)	876,1 ± 149,3	1.394,6 ± 592,0	309,6 ± 193,3	288,6 ± 53,7
Glicose efluyente	6.152,1 ± 1184,9	6.361,4 ± 848,7	8.309,9 ± 795,8	12.417,6 ± 1277,2
Acetona	12,6 ± 1,0	11,3 ± 0,4	11,5 ± 0,2	11,4 ± 0,3
Metanol	29,9 ± 0,4	29,6 ± 0,5	40,9 ± 8,0	45,1 ± 0,9
Etanol	2.119,6 ± 807,7	3.170,1 ± 779,6	3.786,6 ± 499,7	2.870,4 ± 596,8
n-Butanol	18,0 ± 5,5	16,4 ± 2,9	14,4 ± 2,4	12,1 ± 0,3
Ácido Acético	2.329,3 ± 639,6	1.941,1 ± 397,8	1.319,5 ± 248,0	1.110,8 ± 114,0
Ácido Propiônico	195,9 ± 86,7	324,1 ± 62,0	465,5 ± 279,7	363,7 ± 44,5
Ácido Butírico	1.198,6 ± 816,0	1.941,8 ± 687,5	844,6 ± 352,1	531,8 ± 142,0

Fonte: Autora (2018)

Na Tabela 28 são apresentadas as médias das DQOs reais da biomassa, da glicose efluyente e dos SMPs, além das DQOs efluentes teóricas totais e DQOs efluentes medidas nos

diferentes TDHs. A DQO efluente teórica total deve ser compatível com a DQO efluente medida no reator, resultando em um saldo zero de DQO.

Tabela 28: Valores médios, em $\text{mg}_{\text{DQO}}\cdot\text{L}^{-1}$, e desvios padrões, da biomassa, da glicose efluente, dos metabólitos solúveis produzidos no RALF e da DQO efluente medida nos diferentes TDHs.

DQO _{Efluente} ($\text{mg}_{\text{DQO}}\cdot\text{L}^{-1}$)	TDH (h)			
	12	6	4	3
Biomassa (SSV)	1.551,6 ± 264,4	2.469,7 ± 1048,4	548,3 ± 342,3	511,1 ± 95,0
Glicose Efluente	6.552,0 ± 1.261,9	6.774,9 ± 903,8	8.850,1 ± 847,6	13.224,7 ± 1.360,2
Acetona	27,6 ± 2,2	25,0 ± 0,9	25,3 ± 0,3	25,1 ± 0,7
Metanol	44,8 ± 0,6	44,4 ± 0,7	61,3 ± 12,1	67,6 ± 1,4
Etanol	4.417,3 ± 1.683,1	6.606,5 ± 1.624,8	7.891,4 ± 1.041,4	5.981,9 ± 1.243,7
n-Butanol	46,6 ± 14,3	42,4 ± 7,4	37,4 ± 6,1	31,2 ± 0,9
Ácido Acético	2.483,1 ± 681,8	2.069,2 ± 424,1	1.406,6 ± 264,4	1.184,1 ± 121,5
Ácido Propiônico	296,2 ± 131,2	490,1 ± 93,7	703,9 ± 422,8	549,9 ± 67,3
Ácido Butírico	2.176,7 ± 1.481,9	3.526,3 ± 1.248,4	1.533,7 ± 639,4	965,7 ± 257,8
DQO _{efluente} teórica total	17.595,8 ± 1045,1	22.048,5 ± 1.931,0	21.057,9 ± 1.800,6	22.541,3 ± 2.050,1
DQO _{efluente} medida	21.723,7 ± 1.049,0	22.423,1 ± 1.790,8	21.866,8 ± 1.528,8	23.659,0 ± 1.288,6
DQO _{efluente} medida - DQO _{efluente} teórica total	4.128,0 ± 1.440,5	374,6 ± 206,3	809,0 ± 552,9	1.117,7 ± 1.072,1
Consistência (%)	81,0	98,3	96,3	95,3

DQO_{efluente} teórica total = DQO da biomassa + DQO da glicose efluente + DQO dos metabólitos solúveis.
 Consistência = (DQO_{efluente} teórica total/DQO_{efluente} medida)*100.

Fonte: Autora (2018)

Pelos dados contidos na Tabela 28 percebe-se que, em todos os TDHs aplicados, houve uma saldo positivo de DQO, com valores entre $374,6 \pm 206,3 \text{ mg}_{\text{DQO}}\cdot\text{L}^{-1}$ (TDH 6 h) e $4.128,0 \pm 1.440,5 \text{ mg}_{\text{DQO}}\cdot\text{L}^{-1}$ (TDH 12 h), com consistência variando entre 81% e 98,3%. Isto indica que houve produção de outros metabólitos além dos que foram investigados. Uma possível sugestão é de que tenha havido produção de ácido láctico, principalmente na primeira fase, onde a diferença foi maior, pois o mesmo já foi detectado em grandes quantidades por Park et al. (2010), que também trabalharam com o melaço de cana de açúcar para produzir hidrogênio em um PBR, contabilizando um valor máximo de $3.300 \pm 836 \text{ mg}_{\text{DQO}}\cdot\text{L}^{-1}$ de lactato no TDH 5 h.

Essa sobra de DQO também pode ser devido a desvios nas medidas dos metabólitos, da glicose remanescente, da biomassa e da DQO efluente medida, além da possível presença de compostos reduzidos no reator, como o 1,3 propanodiol.

Diversos autores que utilizaram um RALF para avaliar a capacidade produtiva de hidrogênio, também observaram diferenças entre a DQO efluente medida e DQO efluente teórica total (AMORIM, 2009; OTTAVIANO, 2014; SILVA, 2015; MARTINS E AMORIM, 2016). Os mesmos atribuíram essa diferença a possível produção de outros metabólitos que não foram detectados.

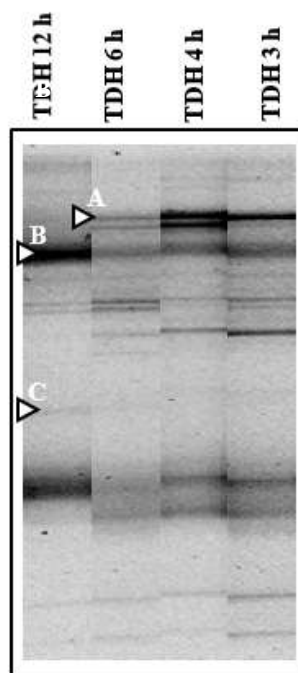
Amorim (2009), ao avaliar a produção de H₂ a partir de glicose encontrou uma diferença entre a DQO efluente medida e DQO efluente teórica total de até 1.259 mg_{DQO}.L⁻¹. Ottaviano (2014) observou diferenças de até 949,7 mg_{DQO}.L⁻¹ na TCO de 85 kg_{DQO}.m⁻³.d⁻¹ ao produzir H₂ a partir de água residuária de soro de queijo. No estudo de Silva (2015), que implementou a bioprodução de H₂ a partir de efluentes de laticínios, essa diferença apresentou-se entre 1.357,4 mg_{DQO}.L⁻¹ e 4.987,6 mg_{DQO}.L⁻¹. Martins e Amorim (2016), por sua vez, analisando a produção de biohidrogênio a partir de efluente do processamento de coco observaram que a diferença entre a DQO efluente medida e a DQO teórica total variou de 1.017,9 mg_{DQO}.L⁻¹ (TDH = 6 h) a 1.562,6 mg_{DQO}.L⁻¹ (TDH = 7 h).

5.9 Avaliação da Diversidade Microbiana por PCR-DGGE

Os microrganismos aderidos ao pneu triturado, que foi utilizado como material suporte no RALF, foram analisados pela técnica de biologia molecular PCR-DGGE. A Figura 26 mostra o perfil de bandas obtido a partir da análise de PCR-DGGE para a comunidade bacteriana presente no reator em cada valor de TDH.

Ao comparar os perfis de DGGE obtidos ao longo das fases, observa-se alterações na estrutura da comunidade microbiana, as quais são verificadas através do surgimento e/ou desaparecimento de bandas e de modificações na intensidade dessas bandas, por exemplo, a banda A, que não existia no TDH 12 h, apareceu no TDH de 6 h, ficando mais intensa nos TDHs 4 h e 3 h; por outro lado, a banda B que era bastante intensa no TDH 12 h, diminui de intensidade nos demais TDHs. Além disso, a banda C existiu apenas no primeiro TDH aplicado, em baixa intensidade, desaparecendo nos demais.

Figura 26: Perfil de bandas da análise de PCR-DGGE da comunidade bacteriana presente no RALF nos diferentes TDHs.

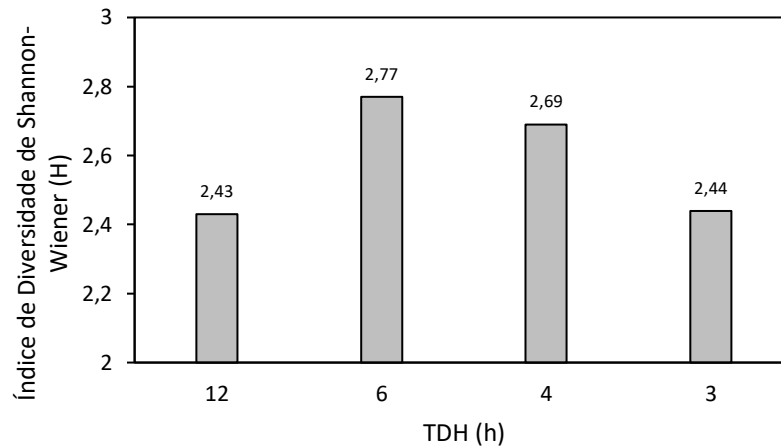


Fonte: Autora (2018)

A Figura 27 mostra os índices de diversidade de Shannon-Wiener (H) obtidos para os diferentes TDHs. Os TDHs 12 h e 6 h apresentaram, respectivamente, o menor (2,43) e o maior (2,77) índice de diversidade para bactérias dentre todas as fases, correspondendo ao mínimo e máximo rendimentos de hidrogênio obtidos, $2,57 \pm 0,01 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{glicose}}^{-1}$ e $3,07 \pm 0,05 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{glicose}}^{-1}$, respectivamente. Portanto, neste estudo, o HY aumentou de acordo com a expansão da diversidade bacteriana, que se deu ao longo da diminuição do TDH, até o TDH 6 h, passando a diminuir com a aplicação dos TDHs 4 h e 3 h. Os TDHs 12 h e 3 h tiveram índice H bem próximos, equivalentes a 2,43 e 2,44, o que explica os rendimentos semelhantes atingidos, $2,57 \pm 0,01 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{glicose}}^{-1}$ e $2,66 \pm 0,03 \text{ mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{glicose}}^{-1}$, respectivamente.

Bianco (2015), ao caracterizar a diversidade microbiana presente na biometanização da fração orgânica dos resíduos sólidos urbanos em conjunto com serragem e lodo de esgoto, observou índices de diversidade de Shannon-Wiener da comunidade de bactérias presentes nas amostras de chorume e digestato dos biometanizadores variando entre 2,24 e 3,23, identificando que a diversidade de bactérias foi maior no digestato do que no chorume, devido o maior valor de H observado no chorume. Este resultado sugeriu que o digestato seria uma melhor fonte de inóculo devido ao fato de que quanto maior a variedade de microrganismos, mais rapidamente ocorre a adaptação da comunidade microbiana a novos ambientes.

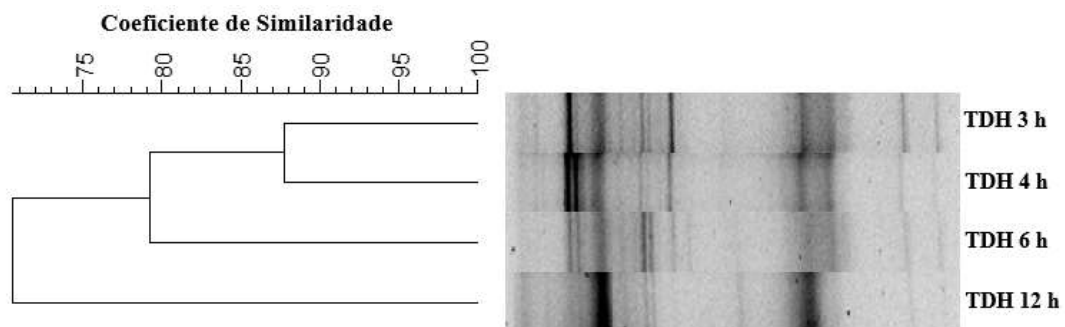
Figura 27: Índice de diversidade de Shannon-Wiener (H) para a comunidade bacteriana presente nos diferentes TDHs aplicados no RALF.



Fonte: Autora (2018)

As similaridades de espécies de bactérias referente aos perfis de DGGE das fases operacionais, foram verificadas pelo coeficiente de similaridade de Pearson. Na Figura 28 temos o dendograma elaborado a partir dos padrões de banda do DGGE e o coeficiente de similaridade calculado pela correlação de Pearson por meio do software Bionumerics versão 2.5.

Figura 28: Dendograma e coeficiente de similaridade (correlação de Pearson) gerado a partir do perfil de DGGE referente as comunidades bacterianas presentes em cada fase operacional.



Fonte: Autora (2018)

Comparando as similaridades entre os perfis de bandas ao longo dos quatro TDHs aplicados, ratifica-se que houve modificações na estrutura bacteriana. Observou-se 71% de similaridade (correlação de Pearson) entre o perfil de bandas do TDH inicial de 12 h e o das demais fases, evidenciando a ocorrência de mudanças favoráveis a produção de hidrogênio na comunidade bacteriana durante a operação do reator, visto que neste TDH foram verificados os menores HY e HPR. Isto sugere que as comunidades microbianas contidas na biomassa aderida

ao pneu triturado no TDH de 12 h foram relativamente diferentes das que prevaleceram ao longo dos outros TDHs. Entre o TDH de 6 h e as fases seguintes, o coeficiente de similaridade foi de 79%.

Os perfis de bandas resultantes dos TDHs 4 h e 3 h foram bastante semelhantes, conforme já detectado na distribuição dos metabólitos solúveis, na seção 5.7; estas fases apresentaram um coeficiente de similaridade de 88%, apesar das diferentes taxas de carregamento aplicadas, indicando que houve reduzidas mudanças nas populações microbianas durante estes TDHs e que, provavelmente populações semelhantes garantiram a produção de biohidrogênio, o que explica o fato de os resultados de produção volumétrica terem sido bem próximos nessas fases ($1,44 \pm 0,05$ e $1,19 \pm 0,03 \text{ L}_{\text{H}_2} \cdot \text{L}^{-1} \text{Reator} \cdot \text{h}^{-1}$).

Rosa et al. (2014b) obtiveram similaridades de 86% e 82% entre as populações de bactérias observadas no TDH inicial e nos demais TDHs aplicados nos reatores anaeróbios inoculados com lodo de suinocultura (RALF1) e com lodo de águas residuais de matadouro de aves (RALF2), respectivamente. Estes altos valores de similaridade indicam que não houve mudanças importantes ao longo dos TDHs aplicados em termos de populações de bactérias. Os reatores foram utilizados para produzir hidrogênio a partir de fermentação tipo-etanol com soro de queijo como substrato.

Rosa et al. (2014a) observaram grandes diferenças entre as comunidades bacterianas presentes ao longo da redução do TDH e do aumento da COV em um RALF inoculado com lodo de suíno, utilizado para produzir hidrogênio a partir de soro de queijo. Os autores verificaram similaridades de 55% entre os TDHs de 6 h e 4 h e de 50% entre os TDHs 4 h e 2 h.

Santos et al. (2014), ao realizar a produção de H_2 em um RALF termofílico alimentado com vinhaça de cana de açúcar a $10 \text{ g}_{\text{DQO}} \cdot \text{L}^{-1}$, verificaram similaridade de 56% entre o TDH inicial de 6 h e as demais fases operacionais. Já no RALF alimentado com concentração maior de vinhaça ($30 \text{ g}_{\text{DQO}} \cdot \text{L}^{-1}$), a similaridade entre o TDH de 6 h e o de 4 h foi de 85% e entre os TDHs de 2 h e 1 h, este valor aumentou para 95%.

5.10 Considerações Finais

Os dados experimentais referentes a todos os parâmetros obtidos nas condições de estado estacionário relativos a produção de hidrogênio no RALF em cada TDH são resumidos na Tabela 29. As melhores fases para a produção de hidrogênio a partir de melaço de cana de açúcar em RALF foram observadas nos TDHs de 6 h, com o maior rendimento e conteúdo de

hidrogênio, e de 4 h com a maior produção volumétrica de hidrogênio. Quanto ao rendimento de etanol, o TDH ótimo foi o de 4 h.

Tabela 29: Dados experimentais obtidos na produção de hidrogênio em RALF a partir do melaço de cana de açúcar em cada TDH.

Parâmetro	Unidade	Valores			
		12	6	4	3
TDH	H	12	6	4	3
TCO	Kg _{DQO} .m ⁻³ .d ⁻¹	50	100	150	200
pH _{efluente}	-	3,83 ± 0,23	3,99 ± 0,11	4,08 ± 0,15	3,97 ± 0,15
Remoção de DQO	%	12,6 ± 1,8	9,0 ± 2,1	11,5 ± 1,8	8,8 ± 2,1
Conversão de glicose	%	67,2 ± 5,6	70,1 ± 2,2	61,5 ± 4,1	50,0 ± 3,9
HPR	L _{H2} .L ⁻¹ _{Reator} .h ⁻¹	0,43 ± 0,03	1,07 ± 0,03	1,44 ± 0,05	1,19 ± 0,03
EPR – H ₂	kJ.L ⁻¹ _{Reator} .d ⁻¹	111,36	277,44	373,25	308,45
Conteúdo de H ₂	%	20,35 ± 0,72	25,95 ± 1,39	21,01 ± 0,37	19,15 ± 0,63
HY	mol _{H2} .mol ⁻¹ _{glicose}	2,57 ± 0,01	3,07 ± 0,05	2,94 ± 0,01	2,66 ± 0,03
EtOHY	mol _{EtOH} .mol ⁻¹ _{glicose}	0,58 ± 0,16	0,85 ± 0,13	1,10 ± 0,04	0,98 ± 0,08
Ácido acético + etanol	% molar	81,69	78,37	85,46	86,44
SSV _{efluente}	mg _{DQO} .L ⁻¹	1551,6 ± 264,4	2.469,7 ± 1048,4	548,3 ± 342,3	511,1 ± 95,0
Glicose Efluente	mg _{DQO} .L ⁻¹	6.552,0 ± 1.261,9	6.774,9 ± 903,8	8.850,1 ± 847,6	13.224,7 ± 1.360,2
Acetona	mg _{DQO} .L ⁻¹	27,6 ± 2,2	25,0 ± 0,9	25,3 ± 0,3	25,1 ± 0,7
Metanol	mg _{DQO} .L ⁻¹	44,8 ± 0,6	44,4 ± 0,7	61,3 ± 12,1	67,6 ± 1,4
Etanol	mg _{DQO} .L ⁻¹	4.417,3 ± 1.683,1	6.606,5 ± 1.624,8	7.891,4 ± 1.041,4	5.981,9 ± 1.243,7
n-Butanol	mg _{DQO} .L ⁻¹	46,6 ± 14,3	42,4 ± 7,4	37,4 ± 6,1	31,2 ± 0,9
Ácido Acético	mg _{DQO} .L ⁻¹	2.483,1 ± 681,8	2.069,2 ± 424,1	1.406,6 ± 264,4	1.184,1 ± 121,5
Ácido Propiônico	mg _{DQO} .L ⁻¹	296,2 ± 131,2	490,1 ± 93,7	703,9 ± 422,8	549,9 ± 67,3
Ácido Butírico	mg _{DQO} .L ⁻¹	2.176,7 ± 1.481,9	3.526,3 ± 1.248,4	1.533,7 ± 639,4	965,7 ± 257,8
DQO _{efluente medida} - DQO _{efluente teórica total}	mg _{DQO} .L ⁻¹	4.128,0 ± 1.440,5	374,6 ± 206,3	809,0 ± 552,9	1.117,7 ± 1.072,1

Fonte: Autora (2018)

É possível observar que os baixos pH efluentes verificados no reator (3,83 a 4,08) favoreceram a rota metabólica do etanol, visto que esta foi a principal rota seguida pelos microrganismos, conforme validado por Ren et al. (2006), Li et al. (2007), Guo et al. (2008) e Zhu et al. (2013). Segundo eles, a fermentação do tipo etanol acontece em pHs baixos, geralmente entre 4 e 4,5, sendo mais bem sucedida quanto a produção de hidrogênio do que a fermentação tradicional do tipo butirato, devido a produção simultânea de altas concentrações de ácido acético e etanol, possibilitando maiores rendimentos e taxas de produções de hidrogênio. Por outro lado, as altas concentrações de metabólitos, acabaram contribuindo para uma alta DQO efluente, resultando em baixas remoções de DQO.

Um ponto negativo das altas concentrações de etanol e ácido acético, é que as mesmas ocasionaram baixos conteúdos de hidrogênio no biogás (19,15% a 25,25%), visto que esses dois metabólitos são acompanhados por altas produções de CO₂. Em compensação, a distribuição de todos os metabólitos ao longo das fases operacionais, com excesso de ácido acético e etanol, estão diretamente relacionadas com os altos HY alcançados, conforme já explicado na seção 5.7.

A semelhança entre a distribuição dos metabólitos solúveis observada entre as duas últimas fases (TDH de 4 h e 3 h), pode ser diretamente correlacionada com a análise de PCR-DGGE, através do alto coeficiente de similaridade obtido entre esses dois TDHs.

As diferenças verificadas entre a DQO efluente medida e a DQO efluente teórica total, sugerem que outros tipos de metabólitos estavam presentes no efluente, mas os mesmos não foram detectados pelo método de análise de SMPs que foi utilizado neste trabalho, visto que este método só detecta os produtos que são voláteis. O ácido láctico, por exemplo, não é um composto volátil, deixando de ser analisado pelo método de extração por headspace.

6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados apresentados e discutidos, concluiu-se que a utilização de um RALF para produzir hidrogênio a partir de melaço de cana de açúcar foi muito bem-sucedida. Mesmo sem controle de temperatura e sem adição de produtos químicos para regular o pH do reator, foram alcançados altos rendimentos e produções volumétricas de hidrogênio ao longo das fases analisadas, por mais de 130 dias de operação.

O tratamento térmico do lodo foi eficiente, visto que não houve produção de metano e o conteúdo de hidrogênio no biogás produzido foi relativamente baixo e estável, mas está dentro de uma faixa já encontrada por alguns pesquisadores nesse tipo de trabalho, sendo atingido o ápice de 25,95% de H₂ no TDH de 6 h.

A taxa de carregamento orgânico e o tempo de detenção hidráulica afetaram significativamente a produção de hidrogênio. O rendimento e o conteúdo de hidrogênio aumentaram do TDH 12 h até o TDH 6 h e diminuíram nos demais TDHs, sendo encontrado no TDH de 6 h o maior HY equivalente a 3,07 mol_{H₂}.mol_{glicose}⁻¹. A produção volumétrica aumentou ao longo da diminuição do TDH até o TDH de 4 h, onde foi alcançada a maior HPR no valor de 1,44 L_{H₂}.L⁻¹_{Reator}.h⁻¹, equivalente a 373,25 kJ.L⁻¹_{Reator}.d⁻¹ de taxa máxima de produção de energia.

Os principais metabólitos produzidos foram o etanol, o ácido acético e o ácido butírico, com o etanol em maior quantidade, indicando a rota fermentativa do etanol. As altas concentrações de ácido acético apresentaram efeito inibitório a produção de hidrogênio. A comunidade microbiana também foi bastante afetada pelo decréscimo do tempo de detenção hidráulica, com similaridade de 71% (correlação de Pearson) entre as populações contidas no TDH inicial e as demais fases. Nos TDHs de 4 h e 3 h as comunidades foram bastante similares.

7. SUGESTOES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Estudar a produção de hidrogênio em RALF a partir de diferentes concentrações de alimentação do melaço de cana de açúcar;
- ✓ Utilizar diferentes configurações de reatores sob mesmas condições de operação (pH, concentração afluente, temperatura, TDH);
- ✓ Estudar a produção de hidrogênio a partir de melaço de cana de açúcar em RALF mesofílico e termofílico.
- ✓ Estudar a produção de hidrogênio em RALF a partir de melaço de cana de açúcar com a utilização de diferentes materiais suportes;
- ✓ Estudar a produção de hidrogênio em RALF a partir de melaço de cana de açúcar com a utilização de diferentes fontes de inóculo;
- ✓ Investigar a produção de compostos de elevado valor agregado.
- ✓ Investigar a produção de compostos a partir de alongamentos de cadeia.

REFERÊNCIAS

- ADORNO, M. A. T.; HIRASAWA, J. S.; VARESCHE, M. B. A. Development and validation of two methods to quantify volatile acids (C2-C6) by GC/FID: headspace (automatic and manual) and liquid-liquid extraction (LLE). **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 5, n. 7, p. 406–414, 2014.
- AKUTSU, Y.; LEE, D-Y; CHI, Y-Z.; LI, Y-Y. HARADA, H.; YU, H-Q. Thermophilic fermentative hydrogen production from starch-wastewater with bio-granules. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 12, p. 5061–5071, 2009.
- ALBANEZ, R. **Codigestão de vinhaça e melaço em biorreator anaeróbio operado em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada visando a produção de hidrogênio**. 268 f. Tese (Doutorado em Ciências: Engenharia Hidráulica e Saneamento) - Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de São Carlos, São Carlos, 2015.
- AMORIM, E. L. C. **Efeito da concentração de glicose e da alcalinidade na produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidificado**. 163 f. Tese (Doutorado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) - Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de São Carlos, São Carlos, 2009.
- AMORIM, E. L. C.; SADER, L. T.; SILVA, E. L. Effect of substrate concentration on dark fermentation hydrogen production using an anaerobic fluidized bed reactor. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 166, p. 1248–1263, 2012.
- AMORIM, N. C. S. **Produção de hidrogênio a partir da manipueira em reator anaeróbio de leito fluidificado**. 106 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Hídricos e Saneamento) - Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2012.
- AMORIM, N. C. S.; ALVES, I.; MARTINS, J. S.; AMORIM, E. L. C. Biohydrogen production from cassava wastewater in an anaerobic fluidized bed reactor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 31, n. 3, p. 603–612, 2014.
- APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater. 19th. edn. American Public Health Association**. Washington, DC: American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environmental Federation; 1998.
- AZBAR, N.; DOKGOZ, F. T. Ç.; KESKIN, T.; KORKMAZ, K. S.; SYED, H. M. Continuous fermentative hydrogen production from cheese whey wastewater under thermophilic anaerobic conditions. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 30, p. 1–7, 2009.
- BARCA, C.; SORIC, A.; RANAVA, D.; GIUDICI-ORTICONI, M-T.; FERRASSE, J-H. Anaerobic biofilm reactors for dark fermentative hydrogen production from wastewater : A review. **Bioresource Technology**, v. 185, p. 386–398, 2015.
- BARROS, A. R. **Influência de diferentes materiais suporte na produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidizado**. 119 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.
- BARROS, A. R.; ADORNO, M. A. T.; SAKAMOTO, I. K.; MAINTINGUER, S. I.;

- VARESCHE, M. B. A.; SILVA, E. L. Performance evaluation and phylogenetic characterization of anaerobic fluidized bed reactors using ground tire and pet as support materials for biohydrogen production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 4, p. 3840–3847, 2011.
- BARROS, A. R.; AMORIM, E. L. C.; REIS, C. M.; SHIDA, G. M.; SILVA, E. L. Biohydrogen production in anaerobic fluidized bed reactors: effect of support material and hydraulic retention time. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, n. 8, p. 3379–3388, 2010.
- BARROS, A. R.; SILVA, E. L. Hydrogen and ethanol production in anaerobic fluidized bed reactors: performance evaluation for three support materials under different operating conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 61, p. 59–65, 2012.
- BARROS, V. G. **Conversão anaeróbia de vinhaça e melão em reatores UASB inoculados com lodo granulado**. 69 f. Dissertação (Mestrado em microbiologia agropecuária) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2013.
- BEHERA, S.; MOHANTY, R. C.; RAY, R. C. Ethanol fermentation of sugarcane molasses by *Zymomonas mobilis* MTCC 92 immobilized in *Luffa Cylindrica* L. sponge discs and calcium alginate matrices. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1499–1507, 2012.
- BHARATHIRAJA, B.; SUDHARSANAA, T.; BHARGHAVI, A.; JAYAMUTHUNAGAI, J.; PRAVEENKUMAR, R. Biohydrogen and biogas – an overview on feedstocks and enhancement process. **Fuel**, v. 185, p. 810–828, 2016.
- BIANCO, C. I. **Caracterização da comunidade procarionte presente no tratamento anaeróbio da fração orgânica dos resíduos sólidos urbanos em conjunto com serragem e lodo de esgoto**. 131 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos/SP, 2015.
- CAPPAL, G.; DE GIOANNIS, G.; FRIARGIU, M.; MASSI, E.; MUNTONI, A.; POLETTINI, A.; POMI, R.; SPIGA, D. An experimental study on fermentative H₂ production from food waste as affected by pH. **Waste Management**, v. 34, n. 8, p. 1510–1519, 2014.
- CASTELLÓ, E.; GARCÍA Y SANTOS, C.; IGLESIAS, T.; PAOLINO, G.; WENZEL, J.; BORZACCONI, L.; ETCHEBEHERE, C. Feasibility of biohydrogen production from cheese whey using a UASB reactor : links between microbial community and reactor performance. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 30, p. 1–9, 2009.
- CHANG, S.; LI, J.; LIU, F. Continuous biohydrogen production from diluted molasses in an anaerobic contact reactor. **Front. Environ. Sci. Engin**, v. 5, n. 1, p. 140–148, 2011.
- CHERNICHARO, C. A. L. **Reatores anaeróbios**. 2 ed., v. 5. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - UFMG, 1997.
- DAVILA-VAZQUEZ, G.; COTA-NAVARRO, C. B.; ROSALES-COLUNGA, L. M.; LEÓN-RODRIGUES, A.; RAZO-FLORES, E. Continuous biohydrogen production using cheese whey : improving the hydrogen production rate. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 30, p. 1–9, 2009.

- DE GIOANNIS, G.; FRIARGIU, M.; MASSI, E.; MUNTONI, A.; POLETTINI, A.; POMI, R.; SPIGA, D. Biohydrogen production from dark fermentation of cheese whey : influence of pH. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 36, p. 20930–20941, 2014.
- DING, J.; LIU, B-F.; REN, N-Q.; XING, D-F.; GUO, W-Q.; XU, J-F.; XIE, G-J. Hydrogen production from glucose by co-culture of *Clostridium Butyricum* and immobilized *Rhodospseudomonas Faecalis* RLD-53. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 30, p. 1–6, 2009.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMITTON, J. K.; REDERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.
- ELSHARNOUBY, O.; HAFEZ, H.; NAKHLA, G.; EL NAGGAR, M. H. A critical literature review on biohydrogen production by pure cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 30, p. 1–22, 2013.
- ESPINOZA-ESCALANTE, F. M.; PELAYO-ORTÍZ, C.; NAVARRO-CORONA, J.; GONZÁLEZ-GARCÍA, Y.; BORIES, A.; GUTIÉRREZ-PULIDO, H. Anaerobic digestion of the vinasses from the fermentation of Agave tequilana Weber to tequila : the effect of pH , temperature and hydraulic retention time on the production of hydrogen and methane. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, p. 14–20, 2009.
- FARIA, A. A. A. **Fermentação metanogênica mesofílica de melão e termofílica de vinhaça em reatores UASB**. 59 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2014.
- FRINK, L. A.; ARMSTRONG, D. W. Using headspace gas chromatography for the measurement of water in sugar and sugar-free sweeteners and products. **Advances in Food and Beverage Analysis**, v. 34, n. 10, p. 6 - 13, 2017.
- FERNÁNDEZ, N.; MONTALVO, S.; BORJA, R.; GUERRERO, L.; SÁNCHEZ, E.; CORTÉS, I.; COLMENAREJO, M. F.; TRAVIESO, L.; RAPOSO, F. Performance evaluation of an anaerobic fluidized bed reactor with natural zeolite as support material when treating high-strength distillery wastewater. **Renewable Energy**, v. 33, n. 11, p. 2458–2466, 2008.
- GADOW, S. I.; LI, Y.; LIU, Y. Effect of temperature on continuous hydrogen production of cellulose. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 20, p. 15465–15472, 2012.
- GEHRING, C. G. **Análise da geração de energia elétrica a partir do biogás produzido na fermentação anaeróbica de vinhaça**. 124 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Elétrica com ênfase em Sistemas de Energia e Automação) - Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia Elétrica de São Carlos, São Carlos, 2014.
- GOKFILIZ, P.; KARAPINAR, I. The effect of support particle type on thermophilic hydrogen production by immobilized batch dark fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 4, p. 2553–2561, 2017.
- GOMES, B. C.; ROSA, P. R. F.; ETCHEBEHERE, C.; SILVA, E. L.; VARESCHE, M. B. A. Role of homo-and heterofermentative lactic acid bacteria on hydrogen-producing reactors

operated with cheese whey wastewater. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, p. 8650–8660, 2015.

GUILMAN, F.; BUZATO, L. B.; CELLIGOI, M. A. P. C. Comparação da produção de etanol por *Zymomonas mobilis* em meio de melaço de cana-de-açúcar puro e pré-tratado com invertase. **Semina: Ci. Biol. Saúde**, v. 20/21, n.2, p. 39–43, 2000.

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

HAN, W.; CHEN, H.; YAO, X.; LI, Y-F.; YANG, C-P. Biohydrogen production with anaerobic sludge immobilized by granular activated carbon in a continuous stirred-tank. **Journal of Forestry Research**, v. 21, n.4, p. 509-513, 2010.

HAN, W.; CHEN, H.; JIAO, A.; WANG, Z.; LI, Y.; REN, N. Biological fermentative hydrogen and ethanol production using continuous stirred tank reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 1, p. 843–847, 2012a.

HAN, W.; WANG, B.; ZHOU, Y.; WANG, D-X.; WANG, Y.; YUE, L-R.; LI, Y. F.fermentative hydrogen production from molasses wastewater in a continuous mixed immobilized sludge reactor. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 219-223, 2012b.

INFANTES, D.; CAMPO, A. G.; VILLASEÑOR, J.; FERNÁNDEZ, F. J. Influence of pH , temperature and volatile fatty acids on hydrogen production by acidogenic fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, p. 15595–15601, 2011.

INTANOO, P.; RANGSANVIGIT, P.; MALAKUL, P.; CHAVADEJ, S. Optimization of separate hydrogen and methane production from cassava wastewater using two-stage upflow anaerobic sludge blanket reactor (UASB) system under thermophilic operation. **Bioresource Technology**, v. 173, p. 256–265, 2014.

JIMÉNEZ, A. M.; BORJA, R.; MARTÍN, A. A comparative kinetic evaluation of the anaerobic digestion of untreated molasses and molasses previously fermented with *Penicillium decumbens* in batch reactors. **Biochemical Engineering Journal**, v. 18, n. 2, p. 121–132, 2004.

JO, J. H.; LEE, D. S.; PARK, D.; PARK, J. M. Biological hydrogen production by immobilized cells of *Clostridium tyrobutyricum* JM1 isolated from a food waste treatment process. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 6666–6672, 2008.

JÚNIOR, A. D. N. F. **Digestão anaeróbia da vinhaça da cana de açúcar em reator acidogênico de leito fixo seguido de reator metanogênico de manta de lodo**. 136 f. Tese (Doutorado em Ciências: Engenharia Hidráulica e Saneamento) - Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de São Carlos , São Carlos, 2013.

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

KARADAG, D.; KÖROĞLU, O. E.; OZKAYA, B.; CAKMAKCI, M.; HEAVEN, S.;

BANKS, C. A review on fermentative hydrogen production from dairy industry wastewater. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 89, n. 11, p. 1627–1636, 2014.

KIM, D.; KIM, M. Thermophilic fermentative hydrogen production from various carbon sources by anaerobic mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 2, p. 2021–2027, 2012.

LAY, C-H.; WU, J-H.; HSIAO, C-L.; CHANG, J-J.; CHEN, C-C.; LIN, C-Y. Biohydrogen production from soluble condensed molasses fermentation using anaerobic fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, n. 2, p. 13445–13441, 2010.

LAMAISON, F. C.; FRAGATA, R.; ANTÔNIO, R. V.; AMANTE, E. R.; REGINATTO, V. Pretreatment on anaerobic sludge for enhancement of biohydrogen production from cassava processing wastewater. **Acta Scientiarum Technology**, v. 36, n. 3, p. 437–444, 2014.

LEE, J-Y.; WEE, D.; CHO, K-S. Effects of volatile solid concentration and mixing ratio on hydrogen production by co-digesting molasses wastewater and sewage sludge. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 24, n. 11, p. 1542–1550, 2014.

LEE, K. S.; HSU, Y-F.; LO, Y-C.; LIN, P-J.; LIN, C-Y.; CHANG, J-S. Exploring optimal environmental factors for fermentative hydrogen production from starch using mixed anaerobic microflora. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 5, p. 1565–1572, 2008.

LI, J; AI, B.; REN, N. Effect of Initial Sludge Loading Rate on the Formation of Ethanol Type Fermentation for Hydrogen Production in a Continuous Stirred-Tank Reactor. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, v. 32, p. 1271-1279, 2013.

LI, J.; LI, B.; ZHU, G.; REN, N.; BO, L.; HE, J. Hydrogen production from diluted molasses by anaerobic hydrogen producing bacteria in an anaerobic baffled reactor (ABR). **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 32, p. 3274–3283, 2007.

LIMA, D. M. F. **Produção de biohidrogênio a partir de soro de leite em AnSBBR com recirculação da fase líquida**. Tese (Doutorado em Ciências: Engenharia Hidráulica e Saneamento) - Universidade de São Paulo, Escola de engenharia de São Carlos, São Carlos, 2015.

LIN, C. Y.; CHANG, C. C.; HUNG, C. H. Fermentative hydrogen production from starch using natural mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 10, p. 2445–2453, 2008.

LIU, Y.; YU, P.; SONG, X.; QU, Y. Hydrogen production from cellulose by co-culture of *Clostridium thermocellum* JN4 and *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* GD17. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 12, p. 2927–2933, 2008.

LO, Y-C.; CHEN, W-M.; HUNG, C-H.; CHEN, S-D.; CHANG, J-S. Dark H₂ fermentation from sucrose and xylose using H₂-producing indigenous bacteria: feasibility and kinetic studies. **Water Research**, v. 42, n. 4–5, p. 827–842, 2007.

LOVATO, G. **Produção de biohidrogênio em AnSBBR tratando efluente do processo de produção de biodiesel - efeito da carga orgânica e do tempo de enchimento**. 202 f. Dissertação (Mestrado em Ciências: Engenharia Hidráulica e Saneamento) - Universidade de

São Paulo, Escola de Engenharia de São Carlos, São Carlos, 2014.

LUTPI, N. A.; MD JAHIM, J.; MUMTAZ, T.; HARUN, S.; ABDUL, P. M. Batch and continuous thermophilic hydrogen fermentation of sucrose using anaerobic sludge from palm oil mill effluent via immobilisation technique. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 2, p. 297–307, 2016.

MAINTINGUER, S. I.; FERNANDES, B. S.; DUARTE, I. C. S.; SAAVEDRA, N. K.; ADORNO, M. A. T.; VARESCHE, M. B. Fermentative hydrogen production by microbial consortium. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 30, p. 1–9, 2008.

MAINTINGUER, S. I.; SAKAMOTO, I. K.; ADORNO, M. A.T.; VARESCHE, M. B. A. Bacterial diversity from environmental sample applied to bio-hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, n. 8, p. 3180–3190, 2015.

MARTINS, J. S.; AMORIM, E. L. C. Produção de hidrogênio em reator anaeróbico a partir de efluente do processamento de coco. **Ciência & Engenharia (Science & Engineering Journal)**, v. 25, n. 1, p. 17–26, 2016.

MARTINS, M.; PEREIRA, I. A. C. Sulfate-reducing bacteria as new microorganisms for biological hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 28, p. 12294–12301, 2013.

MOHAN, S. V.; BHASKAR, Y. V.; KRISHNA, P. M.; RAO, N. C.; BABU, V. L.; SARMA, P. N. Biohydrogen production from chemical wastewater as substrate by selectively enriched anaerobic mixed consortia : influence of fermentation pH and substrate composition. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 32, p. 2286–2295, 2007.

MUÑOZ-PÁEZ, K. M.; RUÍZ-ORDÁZ, N.; GARCÍA-MENA, J.; PONCE-NOYOLA, M. T.; RAMOS-VALDIVIA, A. C.; ROBLES-GONZÁLEZ, I. V.; VILLA-TANACA, L.; BARRERA-CORTÉS, J.; RINDERKNECHT-SEIJAS, N.; POGGI-VARALDO, H. M. Comparison of biohydrogen production in fluidized bed bioreactors at room temperature and 35 C. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, p. 12570–12579, 2013.

NGHIEM, L. D.; KOCH, K.; BOLZONELLA, D.; DREWES, J. E. Full scale co-digestion of wastewater sludge and food waste: bottlenecks and possibilities. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 72, p. 354–362, 2017.

NICIURA, C. L. **Avaliação do uso da banda de rodagem de pneus inservíveis triturada como suporte ao desenvolvimento de biofilmes em um reator anaeróbico de leito expansível**. 179 f. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) - Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de São Carlos, 2005.

NIU, D-J.; WANG, J-Y.; WANG, B-Y.; ZHAO, Y-C. Effect of Mo-containing additives on biohydrogen fermentation from cassava's stillage. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 9, p. 5289–5295, 2011.

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

NÜBEL, U.; ENGELEN, B.; FELSKA, A.; SNAIDR, J.; WIESHUBER, A.; AMANN, R.I.;

LUDWIG, W.; BACKHAUS, H. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by Temperature Gradient Gel Electrophoresis. **Journal of Bacteriology**, v.178, n.19, p.5636 - 5643, 1996.

OHIMAIN, E. I.; IZAH, S. C. A review of biogas production from palm oil mill effluents using different configurations of bioreactors. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 70, p. 242–253, 2017.

ONODERA, T.; SASE, S.; CHOEISAI, P.; YOOCHATCHAVAL, W.; SUMINO, H.; YAMAGUCHI, T.; EBIE, Y.; XU, K.; TOMIOKA, N.; MIZUOCHI, M.; SYUTSUBO, K. Development of a treatment system for molasses wastewater: the effects of cation inhibition on the anaerobic degradation process. **Bioresource Technology**, v. 131, p. 295–302, 2013.

O-THONG, S.; HNIMAN, A.; PRASERTSAN, P.; IMAI, T. Biohydrogen production from cassava starch processing wastewater by thermophilic mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 5, p. 3409–3416, 2011.

OTTAVIANO, L. M. **Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidificado a partir de água residuária de soro de queijo em condição termófila**. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciências: Engenharia Hidráulica e Saneamento) - Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de São Carlos, São Carlos, 2014.

OTTAVIANO, L. M.; RAMOS, L. R.; BOTTA, L. S.; VARESCHE, M. B. A.; SILVA, E. L. Continuous thermophilic hydrogen production from cheese whey powder solution in an anaerobic fluidized bed reactor: effect of hydraulic retention time and initial substrate concentration. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 30, p. 1–13, 2016.

OZTEKIN, R.; KAPDAN, I. K.; KARGI, F.; ARGUN, H. Optimization of media composition for hydrogen gas production from hydrolyzed wheat starch by dark fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 15, p. 4083–4090, 2008.

PARK, M. J.; JO, J. H.; PARK, D.; LEE, D. S.; PARK, J. M. Comprehensive study on a two-stage anaerobic digestion process for the sequential production of hydrogen and methane from cost-effective molasses. **Renewable Energy**, v. 35, n. 12, p. 6194–6202, 2010.

PAWAR, S. S.; VAN NIEL, E. W. J. Thermophilic biohydrogen production: How far are we? **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 18, p. 7999–8009, 2013.

PEIXOTO, G. **Sistema fermentativo de duas fases para a produção de hidrogênio e metano a partir de esgoto sanitário combinado com águas residuárias industriais**. 191 f. Tese (Doutorado em Ciências: Engenharia Hidráulica e Saneamento) - Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de São Carlos, São Carlos, 2011.

PIACENTE, F. J. **Agroindústria canavieira e o sistema de gestão ambiental: o caso das usinas localizadas nas bacias hidrográficas dos rios Piracicaba, Capivari e Jundiáí**. 177 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Econômico) - Universidade de Campinas (UNICAMP), Instituto de Economia, Campinas, 2005.

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

RAHMAN, S. N. A.; MASDAR, M. S.; ROSLI, M. I.; MAJLAN, E. H.; HUSAINI, T.; KAMARUDIN, S. K.; DAUD, W. R. W. Overview biohydrogen technologies and application in fuel cell technology. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 66, p. 137–162, 2016.

RAMOS, C.; BUITRÓN, G.; MORENO-ANDRADE, I.; CHAMY, R. Effect of the initial total solids concentration and initial pH on the bio-hydrogen production from cafeteria food waste. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, p. 13288–13295, 2012.

RAMOS, L. R.; SILVA, E. L. Continuous hydrogen production from agricultural wastewaters at thermophilic and hyperthermophilic temperatures. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2016.

RATTI, R. P.; DELFORNO, T. P.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B. A. Thermophilic hydrogen production from sugarcane bagasse pretreated by steam explosion and alkaline delignification. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 30, p. 1–11, 2015.

REGO, G.; C. **Produção de hidrogênio em reatores anaeróbios de leito fluidificado mesofílico a partir de diferentes substratos orgânicos da indústria sucroalcooleira**. 118 f. Dissertação (Mestrado em Ciências: Engenharia Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2016.

REIS, C. M.; CAROSIA, M. F.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B. A.; SILVA, E. L. Evaluation of hydrogen and methane production from sugarcane vinasse in an anaerobic fluidized bed reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, n. 27, p. 8498–8509, 2015.

REIS, C. M.; SILVA, E. L. Effect of upflow velocity and hydraulic retention time in anaerobic fluidized-bed reactors used for hydrogen production. **Chemical Engineering Journal**, v. 172, p. 28-36, 2011.

REN, N.; LI, J.; LI, B.; WANG, Y.; LIU, S. Biohydrogen production from molasses by anaerobic fermentation with a pilot-scale bioreactor system. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 31, n. 15, p. 2147–2157, 2006.

ROSA, P. R. F.; SANTOS, S. C.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B. A.; SILVA, E. L. The effects of seed sludge and hydraulic retention time on the production of hydrogen from a cassava processing wastewater and glucose mixture in an anaerobic fluidized bed reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 25, p. 13118–13127, 2014a.

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

ROSA, P. R. F.; GOMES, B. C.; VARESCHE, M. B. A.; SILVA, E. L. Characterization and antimicrobial activity of lactic acid bacteria from fermentative bioreactors during hydrogen production using cassava processing wastewater. **Chemical Engineering Journal**, v. 284, p. 1–9, 2016.

SAKAMOTO, I. K. **Comparação da estrutura de comunidades microbianas presentes em sistemas de lodos ativados modificados para remoção biológica do fósforo em excesso**,

utilizando-se a técnica de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE). 162 f. Tese (Doutorado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos – SP, 2001.

SANTOS, S. C. **Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidificado termofílico com vinhaça como substrato orgânico.** 142 f. Tese (Doutorado em Ciências: Engenharia Hidráulica e Saneamento) - Universidade de São Paulo, Escola de engenharia de São Carlos, São Carlos, 2014.

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

SEARMSIRIMONGKOL, P.; RANGSUNVIGIT, P.; LEETHOCHAWALIT, M.; CHAVADEJ, S. Hydrogen production from alcohol distillery wastewater containing high potassium and sulfate using an anaerobic sequencing batch reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 20, p. 12810–12821, 2011.

SEIFERT, K.; WALIGORSKA, M.; WOJTOWSKI, M.; LANIECKI, M. Hydrogen generation from glycerol in batch fermentation process. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 30, p. 1–8, 2009.

SHI, Y.; ZHAO, X-T.; CAO, P.; HU, Y.; ZHANG, L.; JIA, Y.; LU, Z. Hydrogen bio-production through anaerobic microorganism fermentation using kitchen wastes as substrate. **Biotechnology Letters**, v. 31, p. 1327–1333, 2009.

SHIDA, G. M.; SADER, L. T.; AMORIM, E. L. C.; SAKAMOTO, I. K.; MAINTINGUER, S. I.; SAAVEDRA, N. K.; VARESCHE, M. B. A.; SILVA, E. L. Performance and composition of bacterial communities in anaerobic fluidized bed reactors for hydrogen production: Effects of organic loading rate and alkalinity. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, p. 16925–16934, 2012.

SILVA, A. N. **Produção de hidrogênio a partir de efluentes laticínios.** 94 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Hídricos e Saneamento) - Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2015.

SILVA, C. E. V. **Produção enzimática de frutooligosacarídeos (FOS) por leveduras a partir de melão de cana-de-açúcar.** 52 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2008.

SREETHAWONG, T.; CHATSIRIWATANA, S.; RANGSUNVIGIT, P.; CHAVADEJ, S. 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**, v. 35, n. 9, p. 4092–4102, 2010.

URBANIEC, K.; BAKKER, R. R. Biomass residues as raw material for dark hydrogen fermentation - a review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, n. 9, p. 3648–3658, 2015.

VASCONCELOS, E. A. F.; LEITÃO, R. C.; SANTAELLA, S. T. Factors that affect bacterial ecology in hydrogen-producing anaerobic reactors. **Bioenergy Research**, 2016.

VIJAYARAGHAVAN, K.; SOOM, M. A. M. Trends in biological hydrogen production—a review. **International Journal of Hydrogen Energy**, 2004.

WANG, B.; LI, Y.; REN, N. Biohydrogen from molasses with ethanol-type fermentation: effect of hydraulic retention time. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 11, p. 4361–4367, 2013.

WANG, X.; JIN, B. Process optimization of biological hydrogen production from molasses by a newly isolated *Clostridium butyricum* W5. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 107, n.2, p. 138-144, 2009.

WANG, W.; XIE, L.; CHEN, J.; LUO, G.; ZHOU, Q. Biohydrogen and methane production by co-digestion of cassava stillage and excess sludge under thermophilic condition. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 4, p. 3833–3839, 2011.

WON, S. G.; BALDWIN, S. A.; LAU, A. K.; REZADEHBASHI, M. Optimal operational conditions for biohydrogen production from sugar refinery wastewater in an ASBR. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 32, p. 13895–13906, 2013.

WU, K-J.; CHANG, C-F.; CHANG, J-S. Simultaneous production of biohydrogen and bioethanol with fluidized-bed and packed-bed bioreactors containing immobilized anaerobic sludge. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1165–1171, 2007.

YANG, P.; ZHANG, R.; MCGARVEY, J. A.; BENEMANN, J. R. Biohydrogen production from cheese processing wastewater by anaerobic fermentation using mixed microbial communities. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 32, n. 18, p. 4761–4771, 2007.

ZHU, G.; LIU, C.; LI, J.; REN, N.; LIU, L.; HUANG, X. Fermentative hydrogen production from beet sugar factory wastewater treatment in a continuous stirred tank reactor using anaerobic mixed consortia. **Front. Environ. Sci. Eng.**, v. 7, n. 1, p. 143-150, 2013.