

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

JAKELLINE NUNES MARQUES TORRES

**PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO A PARTIR DO BAGAÇO DE CANA-DE-  
AÇÚCAR POR VIA FERMENTATIVA ANAERÓBIA**

MACEIÓ

2018

JAKELLINE NUNES MARQUES TORRES

**Produção de hidrogênio a partir do bagaço de cana-de-açúcar por via fermentativa  
anaeróbia**

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**  
**Bibliotecário: Marcelino de Carvalho**

T693p Torres, Jakelline Nunes Marques.  
Produção de hidrogênio a partir do bagaço de cana-de-açúcar por via fermentativa anaeróbia / Jakelline Nunes Marques Torres. – 2018.  
103 f. : il.

Orientador: Eduardo Lucena Cavalcante de Amorim.  
Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Tecnologia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Maceió, 2018.

Bibliografia: f. 87-103.

1. Hidrogênio como combustível. 2. Bagaço de cana. 3. Fermentação. I. Título.

CDU: 661.96

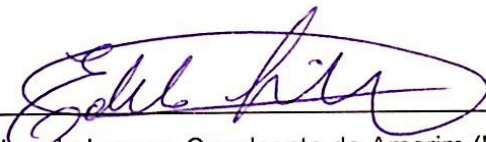
**Jakelline Nunes Marques Torres**

**Produção de hidrogênio a partir do bagaço de cana-de-açúcar  
por via fermentativa anaeróbia**

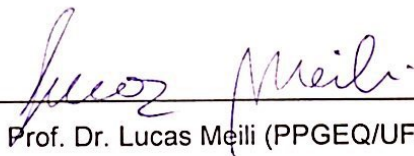
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Alagoas, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Engenharia Química.

Aprovada em: Maceió, 03 de Agosto de 2018.

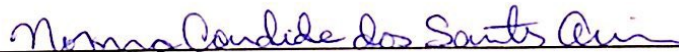
**BANCA EXAMINADORA**



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



Prof. Dr. Lucas Meili (PPGEQ/UFAL)



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Norma Candida dos Santos Amorim (IFAL – Membro Externo)

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser um pai maravilhoso, ter realizado os meus sonhos e escrito a minha história melhor do que imaginei e com tanta perfeição.

Dedico ao meu esposo Wendell Nunes por toda compreensão e apoio dado para realização deste sonho.

Dedico aos meus pais e irmãos, pela criação, ensinamentos e apoio dado.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, o meu criador, que me ajudou em todos os momentos, principalmente nas dificuldades, onde também foi o autor de todas as minhas alegrias, cumprindo todas as suas promessas. Nele, somente Nele, confiarei!

Ao meu esposo Wendell, que com muita paciência me ajudou e incentivou durante todo tempo, me socorrendo nos momentos de dificuldades, falando palavras de conforto, amor e perseverança. Sem você do meu lado minha conquista não seria completa.

Aos meus pais, Fernando e Ilma por tudo que fizeram por mim, toda compreensão e apoio nessa longa caminhada que foi a graduação.

Aos meus irmãos, Luis e Wesley por me apoiarem e também me auxiliarem nas horas de dúvidas e dificuldades.

À minha avó Maria José por todo seu cuidado e amor.

Ao meu orientador e professor Eduardo Lucena Cavalcante de Amorim, por toda sua paciência, ajuda e ensinamentos dado.

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

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

Por fim, a CAPES pelo auxílio financeiro durante a realização da minha pesquisa.

Confie no Senhor de todo coração e não se apoie na sua própria capacidade e entendimento; lembre-se de colocar Deus em primeiro lugar, em todos os seus caminhos, e Ele guiará os seus passos, e você andará no caminho certo. Não fique cheio de si, pensando que a sua própria sabedoria é a razão do seu sucesso. A verdadeira sabedoria é temer o Senhor e evitar o mal.

Provérbios 3:5-7

## RESUMO

O Brasil gera aproximadamente 350 milhões de toneladas de resíduos lignocelulósicos por ano, entre estes está o bagaço de cana-de-açúcar, que pode ser utilizados na produção de hidrogênio. O hidrogênio vem sendo estudado como alternativa para substituir os combustíveis fósseis. Uma vez que é um combustível renovável, apresenta alta concentração de energia por unidade de massa e não gera gases causadores do efeito estufa. Entre os processos de produção de hidrogênio destaca-se a fermentação anaeróbia, pois tem baixo custo quando comparado com outros processos. Neste sentido, este trabalho teve como proposta estudar parâmetros envolvidos na produção fermentativa do  $H_2$  a partir do bagaço de cana-de-açúcar. O trabalho envolve duas fases. Na Fase 1, foram desenvolvidas as atividades da preparação e caracterização do bagaço, e dos pré-tratamentos tanto do bagaço como do inóculo. Enquanto que na Fase 2 foram realizadas os procedimentos operacionais do sistema em batelada, assim como o seu monitoramento e análises, o qual foi dividida em duas etapas, a etapa 1 estudou-se os fatores: massa de substrato (0,5, 1,0, e 1,5 g) e porcentagem de inóculo (10, 20 e 30%), enquanto que na etapa 2 estudou-se os fatores: tempo de aquecimento na pré-hidrólise (0, 30 e 60 min) e pH inicial (5, 6 e 7). Os resultados mostraram que as melhores condições avaliadas para este projeto, os melhores fatores foram: massa de substrato de 0,5g, 10% de inóculo, pH inicial de 6 e tempo de aquecimento na pré-hidrólise de 30 min, representado pelo reator R567 com uma produção específica de hidrogênio de 2,59 mmol $H_2$ /gSSVdia. Os principais metabólitos gerados nos reatores foram: ácido acético (478 – 1374,2 mg/L) predominante em todos os reatores, ácido propiônico (56,92 – 59,45 mg/L), etanol (26,46 – 79,13 mg/L) e metanol (33,71 – 79,88 mg/L). Para o coeficiente de correlação das variáveis, em todos os reatores o nível de influência entre os fatores para produção de  $H_2$  foram de forte à perfeita, ou seja, a interação dos fatores tem influência forte/perfeita na produção de  $H_2$ .

**Palavras-chave:** Pré-tratamento do substrato, bagaço de cana-de-açúcar, fermentação, produção específica de hidrogênio, coeficiente de correlação.



## ABSTRACT

Brazil produces approximately 350 million tons of lignocellulosic residues per year, among them is sugarcane bagasse, which can be used in the production of hydrogen. Hydrogen has been studied as an alternative to replace fossil fuels. Once it is a renewable fuel, it has high concentration of energy per unit mass and does not generate gases that cause the greenhouse effect. Among the hydrocarbon production processes, anaerobic fermentation stands out, as it has a low cost when compared to other processes. In this sense, this work had as data source the work in the production of H<sub>2</sub> fermentation from sugarcane bagasse. The work involves two phases. In Phase 1, bagasse preparation and characterization activities were created, and pre-attempts were made for both bagasse and inoculum. As happened in 2 were the modalities of the batch system, as well as its monitoring and analysis, which was divided into two stages, a stage1 of the phenomena: substrate mass (0.5, 1.0, and 1.5 (0, 30 and 60 min) and initial pH (5, 6, and 7) were evaluated in the pre-hydrolysis phase (10, 20 and 30%), . The results were the ones that had the best results for this project, the best factors were: substrate mass of 0.5 g, 10% of inoculum, initial pH of 6 and heating time in the 30 min prehydrolysis, represented by the reactor R567 with a hydrogen search of 2.59 mmolH<sub>2</sub> / gSSVday. The main metabolites generated in the reactors were acetic acid (478 - 1374.2 mg / L), predominant in all reactors, propionic acid (56.92 - 59.45 mg / L), ethanol (26,46 - 79, 13 mg / L) and methanol (33.71 - 79.88 mg / L). For the coefficient of variation of the variables, in all reactors the level of influence between the factors for H<sub>2</sub> production was strong to perfect, that is, one of the factors has a strong / perfect influence on H<sub>2</sub> production.

**Keywords:** Substrate pretreatment, sugarcane bagasse, fermentation, specific hydrogen production, correlation coefficient.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Estrutura recalcitrante da biomassa lignocelulósica .....	29
Figura 2 - Processo de digestão anaeróbia.....	36
Figura 3 - Alterações estruturais do complexo celulose-hemicelulose-lignina determinadas pelo pré-tratamento .....	39
Figura 4 - Vias metabólicas simplificadas da redução de glicose e produção de vários metabolites e a quantidade de hidrogênio produzida pela formação de cada metabólito41	
Figura 5 -Fases do experimento .....	54
Figura 6 - Antes e depois da trituração do bagaço .....	55
Figura 7 - Preparação do bagaço para sua caracterização .....	56
Figura 8 - Reatores sendo hermeticamente fechados .....	59
Figura 9 - Substituição de todo o ar atmosférico presente no headspace dos frascos pelo nitrogênio.....	60
Figura 10- Cromatógrafo gasoso de alta resolução, da marca Shimadzu, modelo GC 2010 .....	61
Figura 11- Retiradas amostras de 250uL da fase gasosa do headspace do reator com o uso de seringa gastigh com trava da marca Hamilton.....	62
Figura 12- Representação gráfica da função sigmoide.....	64
Figura 13 - Ajustes dos dados utilizando o modelo de Gompertz modificado.....	70
Figura 14 Gráfico de Pareto.....	73
Figura 15 - Ajustes dos dados utilizando o modelo de Gompertz modificado.....	75
Figura 16 - pH inicial e final de cada reator .....	76
Figura 17 Gráfico de Pareto.....	79
Figura 19 - Porcentagem molar dos SMPs .....	84

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Fontes renováveis na OIE 2016 (%).....	23
Tabela 2 – Hectares de cana-de-açúcar plantada 2016/Produção de Cana-de-açúcar - 2017/2018 (unidade: mil toneladas). .....	26
Tabela 3- Composição química de biomassas lignocelulósicas .....	29
Tabela 4- Métodos de produção de hidrogênio a partir das três principais matérias-primas utilizadas: combustíveis fósseis, água e biomassa.....	30
Tabela 5- Vantagens, desvantagens e principais micro-organismos estudados para produção de hidrogênio biológico .....	33
Tabela 6- Comparação de diferentes métodos de pré-tratamento de inóculo para produção de H <sub>2</sub> por fermentação anaeróbia.....	44
Tabela 7- Estudos sobre o efeito da temperatura na produção de H <sub>2</sub> .....	47
Tabela 8 - Efeito do pH na produção de H <sub>2</sub> .....	49
Tabela 9- Trabalhos utilizando o bagaço como substrato para produção de hidrogênio	51
Tabela 10- Caracterização do inóculo .....	57
Tabela 11- Níveis reais e variáveis do planejamento fatorial 2 <sup>2</sup> .....	58
Tabela 12- Níveis reais e variáveis do planejamento fatorial 2 <sup>2</sup> .....	58
Tabela 13- Análises dos reatores .....	61
Tabela 14 - Tempo de detenção fornecido pelo cromatograma para identificação e quantificação dos compostos orgânicos .....	67
Tabela 15- Caracterização do bagaço de cana-de açúcar “ <i>in natura</i> ” .....	69
Tabela 16- Caracterização do lodo da ETE .....	69
Tabela 17 - Dados cinéticos do modelo de Gompertz Modificado nos reatores – Etapa 1 .....	72
Tabela 18 - Análise de variância (ANOVA) .....	72
Tabela 19 - Dados cinéticos do modelo de Gompertz Modificado nos reatores – Etapa 2 .....	77
Tabela 20 - Análise de variância (ANOVA) .....	78
Tabela 22 - Concentrações médias, em mg/L, dos metabólitos solúveis produzidos nos reatores.....	81

Tabela 23 - Concentração molar, em mmol/L, e porcentagem dos metabólitos produzidos nos reatores .....	83
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>PPM</b>	Partes por Milhão
<b>TON</b>	Toneladas
<b>BEN</b>	Balanco energético nacional
<b>OIE</b>	Oferta Interna de Energia
<b>AIE</b>	Agência Internacional de Energia
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>NASA</b>	National Aeronautics and Space Administration
<b>IBGE</b>	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
<b>UNICAMP</b>	Universidade Estadual de Campinas
<b>CTC</b>	Centro de Tecnologia Canavieira
<b>BNR</b>	Bactérias nitrato-redutoras
<b>BSR</b>	Bactérias sulfato-redutoras
<b>BESA</b>	Bromoetano sulfônico
<b>UABS</b>	Anaerobic sludge blanket reactor
<b>TDH</b>	Tempo de Detenção Hidráulica
<b>CSTR</b>	Continuous stirred-tank
<b>BCA</b>	Bagaço de cana-de açúcar
<b>DQO</b>	Demanda Química de Oxigênio
<b>ETE</b>	Estações de Tratamento de Efluentes
<b>ST</b>	Sólidos totais
<b>SST</b>	Sólidos suspensos fixos
<b>SSV</b>	Sólidos suspensos voláteis
<b>RPM</b>	Rotações por minuto
<b>LSA</b>	Laboratório de Saneamento Ambiental
<b>LCA</b>	Laboratório de Controle Ambiental
<b>CTEC</b>	Centro de Tecnologia
<b>UFAL</b>	Universidade Federal de Alagoas
<b>AVT</b>	Ácidos voláteis totais
<b>SMP</b>	Metabólitos solúveis totais produzidos.
<b>ANOVA</b>	Análise de variância

## LISTA DE SIMBOLOS

<b>H<sub>2</sub></b>	Hidrogênio
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Água
<b>NO<sub>x</sub></b>	Óxidos de nitrogênio
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxigênio
<b>kJ.g<sup>-1</sup></b>	Kilo joule por grama
<b>kg/m<sup>3</sup></b>	Kilo grama por metro cúbico
<b>%</b>	Porcentagem
<b>pH</b>	Potencial Hidrogeniônico
<b>SO<sub>2</sub></b>	Gás sulfuroso
<b>CaO</b>	Cal
<b>°</b>	Grau
<b>Kg</b>	Kilo Grama
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Ácido Sulfúrico
<b>HCl</b>	Ácido Clorídrico
<b>Min</b>	Minuto
<b>H</b>	Hora
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sódio
<b>HOO-</b>	Ânion hidroperóxido
<b>OH</b>	Hidroxil
<b>cm<sup>3</sup></b>	Centímetro cúbico
<b>NH<sub>3</sub></b>	Amônia
<b>Mg</b>	Miligrama
<b>Mmol</b>	Milimol
<b>g/L</b>	Gramas por litro
<b>mL/d</b>	Mililitro por dia
<b>-</b>	Menos
<b>+</b>	Mais
<b>Nm</b>	Nanometro
<b>ml</b>	Mililitro
<b>cm.s<sup>-1</sup></b>	Centímetro por segundo
<b>uL</b>	Microlitro
<b>mmolH<sub>2</sub>/dia</b>	Milimol de hidrogênio por dia
<b>mmolH<sub>2</sub>/gSSVdia</b>	Milimol de hidrogênio por grama de sólidos suspensos voláteis dia
<b>xc</b>	Fase lag

<b>k</b>	Taxa de produção
<b>R<sup>2</sup></b>	Ajuste do modelo
<b>R</b>	Coefficiente de correlação
<b>mg/L</b>	Miligrama por litro
<b>R1, R2, R3, R4, R567</b>	Condição operacional
<b>Mmol/dia</b>	Milimol por dia
<b>C<sub>6</sub> H<sub>12</sub>O<sub>6</sub></b>	Glicose
<b>CH<sub>3</sub>COOH</b>	Acetato
<b>CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>COOH</b>	Propianato

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>20</b>
<b>2.2.</b>	<b>Geral</b> .....	<b>20</b>
<b>2.3.</b>	<b>Específico</b> .....	<b>20</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>21</b>
<b>3.1.</b>	<b>Hidrogênio e o balanço energético nacional</b> .....	<b>21</b>
3.1.1	Balanço Energético Nacional (BEN) .....	22
<b>3.2</b>	<b>Biomassa</b> .....	<b>24</b>
3.2.1	Uso de biomassa para produção de energia .....	24
3.2.2	Bagaço de cana-de-açúcar.....	25
3.2.3	Características estruturais da biomassa lignocelulósica .....	28
<b>3.3</b>	<b>Produção de hidrogênio através de biomassa</b> .....	<b>30</b>
3.3.1	Produção biológica de hidrogênio .....	31
3.3.2	Digestão anaeróbia.....	35
<b>3.4</b>	<b>Fatores que influenciam na produção de hidrogênio</b> .....	<b>41</b>
3.4.1	Inóculo .....	41
3.4.2	Temperatura .....	45
3.4.3	pH.....	48
<b>3.5</b>	<b>Estudos já realizados</b> .....	<b>50</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>54</b>
<b>4.1</b>	<b>Fase 1</b> .....	<b>55</b>
4.1.1	Bagaço de cana-de-açúcar.....	55
4.1.2	Inóculo .....	56
4.1.3	Planejamento experimental.....	57
<b>4.2</b>	<b>Fase 2</b> .....	<b>59</b>
4.2.1	Procedimentos experimentais .....	59
4.2.2	Análises físico-químicas .....	60
4.2.3	Funções sigmoidais não-lineares .....	64
4.2.4	Análises de ácidos e álcoois pelo método do headspace .....	66
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>69</b>



<b>5.1</b>	<b>Caracterização do bagaço de cana-de açúcar e lodo da ete.....</b>	<b>69</b>
<b>5.2</b>	<b>Estudo dos dados cinéticos de Gompertz Modificado nos reatores – Etapa 1</b>	<b>70</b>
5.2.1	Planejamento fatorial.....	72
<b>5.3</b>	<b>Estudo dos dados cinéticos de Gompertz Modificado nos reatores - Etapa 2</b>	<b>74</b>
5.3.1	Planejamento fatorial.....	77
<b>5.4</b>	<b>Metabólitos solúveis produzidos .....</b>	<b>80</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>85</b>
<b>7</b>	<b>SUGESTOES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>87</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>88</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Com o aumento das necessidades energéticas mundiais, o esgotamento das reservas de combustíveis fósseis e os problemas ambientais relacionados ao uso contínuo destes combustíveis, definem um novo panorama para o século XXI e determinam que novas políticas referentes à fontes de energia sejam adotadas (SÁ et al., 2014).

Atualmente os recursos energéticos estão sendo bastante discutidos, tendo em vista que o crescimento econômico e a qualidade de vida da população estão diretamente ligados ao suprimento de energia (SANTOS FILHO, 2015). De toda a geração mundial de energia, 80% são representados pelos combustíveis fósseis (petróleo, carvão, etc). No Brasil, de acordo com o Balanço Energético Nacional em 2016, os combustíveis fósseis são responsáveis por até 54,3% da oferta de energia (BRASIL, 2017; MOREIRA et al., 2013).

O crescimento da procura por fontes de energia, conduzem à adoção de práticas para o desenvolvimento e exploração de novos recursos energéticos. Assegurar a geração de energia, com as devidas precauções em relação ao meio ambiente, tem sido um dos mais relevantes desafios atuais (GHOSH E HALLENBECK, 2009; SÁ et al., 2014).

Das fontes alternativas promissoras para a geração de energia que causam impacto socioeconômico positivo, diz respeito ao aproveitamento da biomassa, o qual é rica em material lignocelulósico e está sendo estudada no mundo todo como uma fonte renovável de carbono e energia. Segundo Silva et al.(2008) pode substituir os combustíveis fósseis e fornecer variadas formas de energia, como: o carvão vegetal, o biodiesel, o etanol, metanol e o hidrogênio (biogás) (GUILHERME, 2014; SANTOS FILHO, 2015).

O desenvolvimento de tecnologias para produção de hidrogênio a partir de biomassa, é também denominado de bio-hidrogênio (HOTZA e COSTA, 2009; SÁ et al., 2014).

A produção de bio-hidrogênio combinada com o tratamento de resíduos orgânicos, integra os princípios do desenvolvimento sustentável e da minimização e tratamento de resíduos, as chamadas "tecnologias verdes" (ALVES E ABREU, 2006; BALAT E KIRTAY, 2010; DAS E VEZIROGLU, 2001).

O bagaço da cana-de-açúcar, é considerado um resíduo nas indústrias agroindustriais, um material lignocelulósico riquíssimo em carboidratos e um excelente

resíduo para produção de hidrogênio. Devido a sua estrutura (celulose, hemicelulose e lignina), para aumentar a produção de hidrogênio é necessário que a pré-hidrólise aconteça como um pré-tratamento, desestruturando e ampliando o acesso dos microorganismos para metabolizar o carboidrato em hidrogênio. É importante citar que o pré-tratamento básico com o hidróxido de sódio (NaOH) é um dos métodos mais eficazes para aumentar o rendimento de hidrogênio comparado com o ácido, conforme constatou Andrade (2017) em seu trabalho utilizando biomassa lignocelulósica, o que justificou a sua aplicação para o desenvolvimento deste trabalho.

Para os métodos de obtenção de hidrogênio a partir de biomassa estão: métodos físicos, métodos químicos e os métodos biológicos. Cita-se como exemplos: a queima de combustíveis fósseis, foto-fermentação e fermentação anaeróbia (ROSA E SILVA, 2012).

Dentre os sistemas biológicos para produção de hidrogênio  $H_2$ , a fermentação anaeróbia tem se destacado, devido, principalmente, à maior produção de  $H_2$  quando comparada aos outros processos biológicos e a possibilidade de utilização de diferentes materiais residuais como substrato (SÁ et al., 2014).

Deste modo, este trabalho tem como objetivo avaliar a produção biológica de hidrogênio por processo de fermentação anaeróbia em reator batelada utilizando a biomassa (bagaço de cana-de-açúcar) como substrato.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.2. Geral**

Avaliar a produção de hidrogênio por via fermentativa anaeróbia, conduzida em reator operado em batelada utilizando o bagaço de cana-de-açúcar como substrato.

### **2.3. Específico**

- Caracterizar, físico-quimicamente, o bagaço de cana-de-açúcar e o inóculo;
- Avaliar a influência das variáveis: massa de substrato e porcentagem de inóculo na produção de gás;
- Avaliar a influência das variáveis: tempo de aquecimento na pré-hidrólise e pH inicial na produção de H<sub>2</sub>;
- Obter a maior produção específicas de hidrogênio nos reatores;
- Observar a correlação dos fatores na produção de hidrogênio;
- Avaliar a composição dos metabólitos solúveis e a rota de produção utilizada.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Hidrogênio e o balanço energético nacional

O átomo de hidrogênio foi descoberto em 1766, por Henry Cavendish, ao identificar o gás de uma reação ácido-metal como "ar inflamável" e descobrindo mais profundamente, em 1781, que o gás produz água quando queimado, mas o nome que lhe conhecemos hoje, foi dado por Lavoisier. O hidrogênio é o mais simples e mais abundante elemento do Universo. Existe em milhões de substâncias, em cerca de 76% da massa do Universo e 93% de suas moléculas, como a água (H<sub>2</sub>O) e as proteínas nos seres vivos. Existe em grande quantidade nas estrelas no estado de plasma. No planeta Terra, representa aproximadamente 70% da superfície terrestre. Como o hidrogênio não aparece naturalmente na Terra, e a sua concentração na atmosfera é muito reduzida (1 ppm), e por se encontrar combinado com outros elementos, não pode ser considerado como um recurso de energia primária, tal como o petróleo ou o gás natural, mas sim como um vetor de energia (ESTÊVÃO, 2008).

O hidrogênio começou a ser utilizado em grande escala já no início do séc. XIX, quando foi identificado como uma fonte potencial de combustível. No Brasil, em 1977, o abastecimento de hidrogênio foi de 168.000 ton, sendo a indústria de fertilizante a maior consumidora (78%) desse hidrogênio. Em 1980, a demanda total de hidrogênio no Brasil foi de 300.000 ton métricas e o consumo brasileiro foi de 180.000 ton métricas, sendo que apenas 2% desse hidrogênio foram obtidos por eletrólise e os 98% restantes originados de petróleo, nafta e gás natural (FERNANDES, 2008; MOREIRA et al., 2013).

Ainda hoje a maior utilização do hidrogênio serve como reagente em indústrias químicas e petroquímicas para a produção de fertilizantes (com uma quota de 50%), nomeadamente no processo "Harber" para produção de amônia, além destes processos, o hidrogênio é também utilizado na conversão de óleo líquido em margarina, no processo de fabricação de plásticos, como fluido de refrigeração em geradores elétricos, devido à sua elevada condutibilidade térmica, na produção de ácido clorídrico (HCl), e como reagente nos processos de hidrogenação (DAS E VEZIROGLU, 2001; ESTÊVÃO, 2008).

De acordo com a agência espacial dos Estados Unidos da América (EUA) – NASA – o hidrogênio é utilizado nos seus projetos espaciais para a propulsão dos foguetes, pois estes exigem características não adquiridas com outros combustíveis, tais como: o baixo peso, a capacidade de compactação e grande armazenamento de energia. Quando utilizado em células, a água que resulta do processo é consumida pelos astronautas (ESTÊVÃO, 2008).

O hidrogênio também pode ser utilizado diretamente como combustível em motores de combustão ou em células a combustível, a queima de hidrogênio é 50% mais eficiente que a da gasolina, e esta gera alguns óxidos de nitrogênio (NO<sub>x</sub>), mas ainda assim, a queima de hidrogênio com ar, produz menos poluentes atmosféricos que os combustíveis fósseis (petróleo, carvão). Isto quer dizer que o hidrogênio queima mais rapidamente, mas traz consigo a desvantagem dos perigos relacionados a pré-ignição e *flashback* (DAS E VEZIROGLU, 2008; ESTÊVÃO, 2008; KOTAY E DAS, 2008).

Atualmente, com as intensas mudanças climáticas globais e o fornecimento futuro de energia têm estimulado o desenvolvimento de pesquisas baseadas em combustíveis alternativos. Dentro deste contexto, o hidrogênio (H<sub>2</sub>) tem despertado grande interesse, visto que a sua combustão direta produz uma quantidade significativa de energia e libera apenas água ( $H_2 + 1/2 O_2 \rightarrow H_2O$ ). O hidrogênio é considerado: um combustível limpo; gera água como único produto nas células combustíveis; apresenta alta conversão de energia por unidade de massa (calor de combustão de 122 kJ.g<sup>-1</sup>), sendo 2,75 vezes mais energético do que os hidrocarbonetos, além de ser renovável (CHEN, LIN CY, 2001; SÁ et al., 2014).

Além do mais, os processos de produção de hidrogênio a partir de matérias-primas renováveis ou não renováveis permitem certa flexibilidade em relação à tecnologia, tornando-o uma promissora alternativa energética (PAGE E KRUMDIECK, 2009).

### 3.1.1 Balanço Energético Nacional (BEN)

Segundo os dados do BEN 2017 – ano base 2016 – a principal fonte de geração de energia no Brasil é de não renováveis (56,5%) do total (renováveis e não-renováveis), e destes, 54,3% é referente aos fósseis. No entanto, vale destacar que mesmo a dominância

dos fósseis como principal oferta, as fontes renováveis passaram a uma participação de 43,5% na demanda total de energia de 2016 (OIE), ante os 41,3%, verificados em 2015, como mostra a Tabela 1 (BRASIL, 2017).

**Tabela 1- Fontes renováveis na OIE 2016 (%)**

FONTES	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	IDENTIFICATION
<b>ENERGIA NÃO RENOVÁVEL</b>	<b>54,5</b>	<b>54,4</b>	<b>53,2</b>	<b>55,3</b>	<b>56,5</b>	<b>58,2</b>	<b>59,6</b>	<b>60,6</b>	<b>58,7</b>	<b>56,5</b>	<b>NON-RENEWABLE ENERGY</b>
PETRÓLEO E DERIVADOS	37,5	36,7	38,0	37,8	38,6	39,3	39,3	39,4	37,3	36,5	PETROLEUM AND OIL PRODUCTS
GÁS NATURAL	9,3	10,3	8,8	10,2	10,2	11,5	12,8	13,5	13,7	12,3	NATURAL GAS
CARVÃO MINERAL E COQUE	5,7	5,5	4,6	5,4	5,7	5,4	5,6	5,7	5,9	5,5	COAL AND COKE
URÂNIO (U <sub>3</sub> O <sub>8</sub> )	1,4	1,5	1,4	1,4	1,5	1,5	1,4	1,3	1,3	1,5	URANIUM - U <sub>3</sub> O <sub>8</sub>
OUTRAS NÃO RENOVÁVEIS	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	OTHER NON-RENEWABLE
<b>ENERGIA RENOVÁVEL</b>	<b>45,5</b>	<b>45,6</b>	<b>46,8</b>	<b>44,7</b>	<b>43,5</b>	<b>41,8</b>	<b>40,4</b>	<b>39,4</b>	<b>41,3</b>	<b>43,5</b>	<b>RENEWABLE ENERGY</b>
HIDRÁULICA <sup>1</sup>	14,9	14,1	15,2	14,0	14,7	13,8	12,5	11,5	11,3	12,6	HYDRAULIC <sup>1</sup>
LENHA E CARVÃO VEGETAL	12,0	11,6	10,1	9,7	9,6	9,1	8,3	8,2	8,3	8,0	FIREWOOD AND CHARCOAL
DERIVADOS DA CANA-DE-AÇÚCAR	15,9	17,0	18,1	17,5	15,7	15,4	16,1	15,8	16,9	17,5	SUGAR CANE PRODUCTS
EÓLICA	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,2	0,2	0,3	0,6	1,0	WIND
SOLAR									0,0	0,0	SOLAR
OUTRAS RENOVÁVEIS	2,7	2,9	3,3	3,4	3,5	3,3	3,4	3,7	4,1	4,4	OTHER RENEWABLE
<b>TOTAL</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>TOTAL</b>

FONTE: BRASIL (2017)

Pensando na escala global, e de acordo com cenários da Shell, em 2050 a necessidade de renováveis atingirá 30% do total consumido. A maior parte desta energia verde terá de ser produzida a partir de turbinas eólicas, células fotovoltaicas, centrais hídricas e mini hídricas, pela digestão ou gasificação de biomassa e na forma de combustíveis líquidos e gasosos produzidos a partir de biomassa (bioenergia) (SHELL INTERNATIONAL, 2001).

Apesar de algumas fontes renováveis participarem da matriz energética brasileira, sabe-se que esta contribuição pode ser mais acentuada, devido à elevada disponibilidade das diversas matrizes no país. Neste sentido, a aplicação das tecnologias de produção de hidrogênio a partir da biomassa, torna-se uma alternativa para inserir ainda mais as fontes renováveis no balanço energético nacional (MOREIRA et al., 2013).

## 3.2 Biomassa

### 3.2.1 Uso de biomassa para produção de energia

Qualquer matéria orgânica que possa ser transformada em energia mecânica, térmica ou elétrica é classificada como biomassa. De acordo com a sua origem, pode ser: florestal (madeira, principalmente), agrícola (soja, arroz e cana-de-açúcar, entre outras) e rejeitos urbanos e industriais (sólidos ou líquidos, como o lixo). Os derivados obtidos dependem tanto da matéria-prima utilizada (cujo potencial energético varia de tipo para tipo) quanto da tecnologia de processamento para obtenção dos energéticos (BRASIL, 2017).

A energia presente na biomassa pode ser transformada (através de processos de conversão físicos, químicos e biológicos) em combustíveis líquidos, sólidos e gasosos. O objetivo desta conversão é transformar um material carbonáceo de baixa eficiência energética para uma eficiência economicamente viável (AÇMA, 2003).

A biomassa é uma das fontes para produção de energia com maior potencial de crescimento nos próximos anos. Tanto no mercado internacional quanto no nacional, ela é considerada uma das principais alternativas para a diversificação da matriz energética e a consequente redução da dependência dos combustíveis fósseis (BRASIL, 2017).

Em muitos países o uso de fontes, como carvão vegetal, resíduos florestais, esterco de animais e resíduos agrícolas como o bagaço de cana-de-açúcar, geralmente são ignorados. No entanto, esses resíduos compõem cerca de 30% a 40% do fornecimento total de biomassa (WALKER, 2009).

Walker (2009) considera a biomassa como uma fonte renovável para a produção de energia em escala suficiente para desempenhar relativa expressividade em programas de energias renováveis e na criação e desenvolvimento de uma sociedade com maior consciência ecológica.



### 3.2.2 Bagaço de cana-de-açúcar

#### **Cana-de-Açúcar**

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) é uma gramínea originária do sudeste asiático. Chegou ao Brasil em 1522 pelos portugueses, sendo hoje muito cultivada em regiões tropicais e subtropicais do país (ROSILLO-CALLE et al., 2005). Historicamente a cana-de-açúcar é um dos principais produtos agrícolas do Brasil, sendo cultivada desde a época da colonização. Desde a sua origem até os dias atuais a cana-de-açúcar vem passando por modificações, as quais diferem entre si principalmente quanto ao conteúdo de fibras e açúcares. Hoje, a maior parte da cana-de-açúcar cultivada recebe a designação de *Saccharum spp.* (JOAQUIM, 1997 apud RABELO, 2007).

Do seu processo de industrialização obtêm-se como produtos o açúcar nas suas mais variadas formas e tipos, o álcool (anidro e hidratado), o vinhoto, bagaço e palha (GUILHERME, 2014).

Dos constituintes da cana-de-açúcar, apenas o talo vem apresentando valor econômico por sua capacidade de acumulação de açúcares e produção de fibras (RABELO, 2007). O açúcar predominante é a sacarose. Os açúcares redutores compõem-se primordialmente de glicose e frutose. Esses açúcares se encontram em proporções quase iguais nas canas imperfeitamente maduras. À medida que avança o amadurecimento, seus teores diminuem, podendo não ser detectados nas canas perfeitamente maduras. O teor de frutose diminui primeiro, até desaparecer. A cana-de-açúcar pode conter: 74,5% de água, 14% de açúcares (12,5% de sacarose, 0,9% de dextrose e 0,6% de levulose), 10% de fibras e o restante dividido entre matérias minerais, compostos nitrogenados, ceras, pectinas e ácidos. Entretanto, esta composição pode variar devido a fatores como o solo e o clima (LIMA et al., 2001), porém, quantitativa e qualitativamente, exhibe regularidades em todas as variedades (SCHLITTLER, 2006).

## Aspectos gerais sobre bagaço de cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma cultura plurianual, com colheita anual. De maneira geral, ela é economicamente produtiva por três anos consecutivos. A quantidade obtida na primeira colheita é a maior e decresce anualmente até a reforma do canavial (LIMA et al., 2001).

A cana-de-açúcar, atualmente, é explorada em quase todo o nosso país, que apresenta 10.245,102 milhões de hectares cultivados (UNICA, 2018), sendo considerado o maior produtor mundial e o país com maior potencial de expansão em área plantada (666.824 mil toneladas), conforme a Tabela 2.

**Tabela 2 – Hectares de cana-de-açúcar plantada 2016/Produção de Cana-de-açúcar - 2017/2018 (unidade: mil toneladas).**

<b>Estado/Safra</b>	<b>2016</b>	<b>Estado/Safra</b>	<b>2017/2018</b>
Acre	3.079	Acre	0
Alagoas	311.641	Alagoas	13.734
Amapá	135	Amazonas	222
Amazonas	3.600	Bahia	3.540
Bahia	108.441	Ceará	0
Ceará	16.123	Espírito Santo	2.381
Distrito Federal	296	Goiás	70.622
Espírito Santo	71.733	Maranhão	2.220
Goiás	931.342	Mato Grosso	16.134
Maranhão	45.633	Mato Grosso do Sul	46.940
Mato Grosso	280.191	Minas Gerais	64.886
Mato Grosso do Sul	658.282	Pará	977
Minas Gerais	911.614	Paraíba	5.900
Pará	13.359	Paraná	37.047
Paraíba	122.770	Pernambuco	10.863
Paraná	656.429	Piauí	850
Pernambuco	260.195	Rio de Janeiro	1.062
Piauí	15.353	Rio Grande do Norte	2.516
Rio de Janeiro	56.770	Rio Grande do Sul	45
Rio Grande do Norte	60.489	Rondônia	78
Rio Grande do Sul	17.828	Santa Catarina	0

Rondônia	4.965	São Paulo	357.142
Roraima	246	Sergipe	1.719
São Paulo	5.590.586	Tocantins	2.188
Santa Catarina	7.628		
Sergipe	58.499		
Tocantins	37.875		
<b>Região Centro-Sul</b>	9.182.699	<b>Região Centro-Sul</b>	596.260
<b>Região Norte-Nordeste</b>	1.062.403	<b>Região Norte-Nordeste</b>	44.806
<b>Brasil</b>	10.245.102	<b>Brasil</b>	641.066

FONTE: UNICA (2018)

A produção de cana-de-açúcar se concentra nas regiões Centro-Sul e Nordeste do Brasil, áreas onde se concentram as plantações e usinas produtoras de açúcar, etanol e bioeletricidade, segundo dados oficiais do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), UNICAMP (Universidade Estadual de Campinas – SP) e do CTC (Centro de Tecnologia Canavieira).

Devido à grandeza dos números do setor sucroalcooleiro no Brasil, não se pode tratar a cana-de-açúcar apenas como mais um produto, mas sim, como o principal tipo de biomassa energética, como por exemplo o seu bagaço, base para todo o agronegócio sucroalcooleiro. De acordo com o BEN (2017), a produção de bagaço de cana-de-açúcar no ano civil 2016 alcançou  $168.567 \times 10^3$  toneladas, onde desses, 34% ( $57.458 \times 10^3$  toneladas) tiveram como consumo final o setor energético, o que nos mostra a grande eficiência que esse resíduo pode nos favorecer energeticamente (BRASIL, 2017; GUILHERME, 2014).

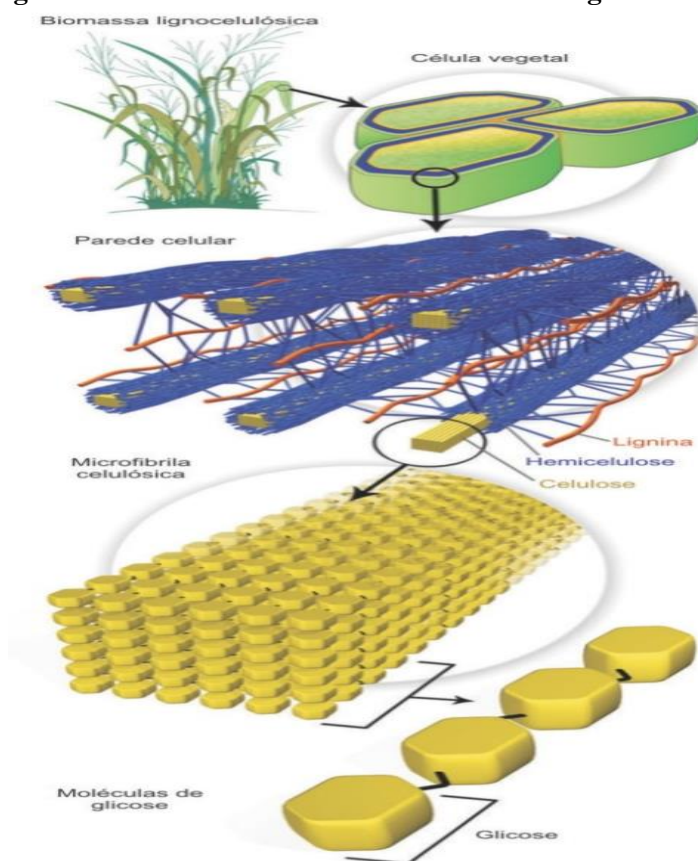
Após a extração do caldo, do qual são produzidos o açúcar e o álcool etílico, remanescente da moagem dos colmos da cana-de-açúcar, o bagaço que sobra é em parte queimado para a geração de energia elétrica e térmica para os processos industriais (HASSUANI et al., 2005). Em geral, o beneficiamento gera 270 kg de bagaço para cada tonelada de cana, sendo que, apenas 50% desse montante é suficiente para gerar energia utilizada na usina de açúcar e etanol (MACHADO, 2009; XU et al., 2006), onde os outros 50% utiliza-se como adubo ou é armazenado para dar partida na operação na próxima safra.

### 3.2.3 Características estruturais da biomassa lignocelulósica

O bagaço de cana é constituído por três frações principais: celulose, hemicelulose e lignina, o qual é considerado como uma biomassa lignocelulósica. A biomassa lignocelulósica constitui a maior fonte de carboidratos naturais do mundo (SANTOS et al., 2012).

Como pode-se observar na Figura 1, as ligações de hidrogênio entre as hidroxilas conferem resistência à celulose. Já as interações intermoleculares entre hidroxilas são responsáveis pela formação da fibra vegetal onde de seis a oito moléculas de celulose se alinham paralelamente para formar uma fibra, eliminando as moléculas de água, tornando a microfibrila extremamente longa e resistente. Sobre a superfície das microfibrilas, aderem-se as hemiceluloses que cobrem a celulose, formando o chamado domínio celulose-hemicelulose da parede celular. As ligações de hidrogênio são responsáveis pela manutenção das regiões cristalinas e tornam a celulose altamente resistente à hidrólise ácida, alcalina ou enzimática. A formação de ligações de hidrogênio é o principal fator que influencia as propriedades físicas da celulose, tais como solubilidade, reatividade e cristalinidade. A interação entre os grupos hidroxilas via ligações de hidrogênio entre as cadeias limita o acesso de agentes aos grupos funcionais da cadeia, o que dificulta tanto sua solubilização como reações (CONVERSE E WARE, 1994; KONDO E POLYM, 1997; REGIANI et al., 1998; ZHANG, 2008) apud (SANTOS et al., 2012).

A presença de hemicelulose e lignina envolvendo as cadeias de celulose também dificulta o acesso de reagentes e catalisadores, sendo necessário um tratamento prévio para a remoção destes componentes, facilitando o acesso das enzimas à celulose (FELIPE, 2010).

**Figura 1- Estrutura recalcitrante da biomassa lignocelulósica**

FONTE: SANTOS et al. (2012) Adaptado de KONDO E POLYM (1997)

A composição química da biomassa lignocelulósica, geralmente contém 35-50% de celulose, seguido de 20-35% de hemicelulose, 10-25% de lignina e uma pequena quantidade de cinzas e extrativos. Esta composição química varia em função do tipo de biomassa, conforme mostrado na Tabela 3 (SANTOS et al., 2012).

**Tabela 3- Composição química de biomassas lignocelulósicas**

Biomassa Lignocelulósica	% Celulose	% Hemicelulose	% Lignina
Bagaço de cana	32-48	19-24	23-32
Palha de cana	40-44	30-32	22-25
Madeira dura	43-47	25-35	16-24
Madeira mole	40-44	25-29	25-31
Talo de milho	35	25	35
Espiga de milho	45	35	15

Algodão	95	2	0,3
Palha de trigo	30	50	15
Sisal	73,1	14,2	11
Palha de arroz	43,3	26,4	16,3
Forragem de milho	38-40	28	7-21
Fibra de coco	36-43	0,15-0,25	41-45
Fibra de bananeira	60-65	6-8	5-10
Palha de cevada	31-45	27-38	14-19

FONTE: GOMEZ et al. (2010).

### 3.3 Produção de hidrogênio através de biomassa

Atualmente, os métodos de produção de hidrogênio podem ser divididos em função das três principais matérias-primas utilizadas: combustíveis fósseis, água e biomassa. Alguns dos processos mais significativos estão citados na Tabela 4, sendo o processo biológico mais atrativo, pois é uma tecnologia de baixo custo quando comparada com as outras técnicas, além de requerer pouca energia para sua geração (LAY, LIN E NOIKE, 1999; MIZUNO et al., 2000; SÁ et al, 2014;).

**Tabela 4- Métodos de produção de hidrogênio a partir das três principais matérias-primas utilizadas: combustíveis fósseis, água e biomassa**

Matérias-primas	Métodos
Combustíveis fósseis	Reforma a vapor do gás natural
	Oxidação parcial de hidrocarbonetos pesados
	Gaseificação do carvão
Água	Eletrólise da água
	Processos foto-eletrólise e processos termoquímicos
Biomassa	Processos biológicos (biofotólise da água, foto- fermentação e fermentação anaeróbia)
	Gaseificação da biomassa
	Reforma a vapor do etanol

FONTE: SÁ et al(2014)

O hidrogênio produzido a partir de biomassa e/ou da fração biodegradável de resíduos, para utilização como biocombustível é também denominado de bio-hidrogênio (ALVES E ABREU, 2006)

A produção de bio-hidrogênio combinada com o tratamento de resíduos orgânicos, integra os princípios do desenvolvimento sustentável e da minimização e tratamento de resíduos, numa clara aproximação as chamadas "tecnologias verdes". Além disso, estes processos são adequados para a produção descentralizada de energia, em instalações de pequena escala, em locais onde a biomassa ou os resíduos estão disponíveis, evitando custos adicionais com o transporte. Os processos biológicos são geralmente operados à temperatura e pressão ambientes, levando assim a um menor consumo de energia e a balanços energéticos favoráveis (ALVES E ABREU, 2006; BALAT E KIRTAY, 2010; DAS E VEZIROGLU, 2001).

A produção biológica de hidrogênio pode ser uma alternativa viável aos métodos apresentados. Os processos de obtenção de hidrogênio por via microbiana vêm ganhando grande destaque devido à possibilidade de utilização de fontes renováveis de energia, bem como o reaproveitamento de materiais residuais, diminuindo assim a quantidade de subprodutos armazenados nas indústrias (ALVES E ABREU, 2006; SÁ et al, 2014).

### 3.3.1 Produção biológica de hidrogênio

A produção biológica de hidrogênio pode ocorrer por meio de tres processos: biofotólise da água, foto- fermentação e fermentação anaeróbia. A biofotólise direta da água, geralmente realizada por algas verdes em condições anaeróbias, está associada à ação da energia luminosa sobre um sistema biológico, resultando na decomposição da água e produção de hidrogênio. A biofotólise indireta envolve tipicamente cianobactérias que utilizam a energia armazenada nos carboidratos oriundos da fotossíntese para gerar hidrogênio a partir da água. A foto-fermentação é realizada por bactérias púrpuras não sulfurosas que utilizam a energia luminosa para transformar ácidos orgânicos em H<sub>2</sub> e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Finalmente, o processo de fermentação anaeróbia envolve bactérias anaeróbias que convertem carboidratos em hidrogênio (SÁ et al, 2014).

A produção de H<sub>2</sub>, via fermentação anaeróbia, tem vantagens: o rendimento de produção é elevado e a taxa de produção é constante e independente da existência de luz solar. Esta fermentação chamada vulgarmente "*dark fermentation*" por não requerer a presença de luz solar, tem a vantagem de ser adequada para uma produção continuada (dia e noite) a partir de resíduos opacos tais como a fracção orgânica dos resíduos sólidos urbanos (ALVES E ABREU, 2006).

Todos os processos mencionados podem ser combinados de forma a expandir as possibilidades tecnológicas de produção do hidrogênio biológico. A Tabela 5 apresenta as principais vantagens e desvantagens dos processos biológicos mencionados (ARGUN E KARGI, 2010; DAS E VEZIROGLU, 2008; KIRTAY, 2011).



**Tabela 5- Vantagens, desvantagens e principais micro-organismos estudados para produção de hidrogênio biológico**

Processos biológicos	Vantagens	Desvantagens	Microorganismos	Referências
Biofotólise direta	Produção de H <sub>2</sub> a partir da água; Não necessita de ATP.	Necessita de iluminação constante; Inibição das hidrogenases pelo O <sub>2</sub> ; Biorreatores modificados para maximizar a utilização da energia solar.	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> <i>Platymonas subcordiformis</i>	KIM et al. (2010) RAN et al. (2009)
Biofotólise indireta	Produção de H <sub>2</sub> a partir da água; Habilidade de fixação de N <sub>2</sub> e produção de H <sub>2</sub> pelas nitrogenases; Separação espacial do O <sub>2</sub> e H <sub>2</sub> nas células diferenciadas (heterocistos); Separação temporal (dia/noite) em células não-heterocísticas.	Necessita de iluminação constante; Biorreatores modificados para maximizar a utilização da energia solar; Necessidade de ATP pelas nitrogenases; Síntese e manutenção dos heterocistos; CO <sub>2</sub> presente no gás.	<i>Plectonema boryanum</i> <i>Anabaena siamensis</i> <i>Anabaena variabilis</i> <i>Synechocystis</i> sp. <i>Cyanothece</i> sp. <i>Nostoc</i> sp.	HUESEMANN et al. (2010) KHETKORN et al. (2010) BERBEROGLU et al. (2008) NAVARRO et al. (2009) MIN E SHERMAN (2010) YOSHINO et al. (2007)
Foto-fermentação	Utilização de diferentes resíduos e efluentes como substrato; Utilização de amplo espectro de luz pelas bactérias	Necessita de iluminação; Biorreatores modificados para maximizar a utilização da energia solar; CO <sub>2</sub> presente no gás.	<i>Rhodospseudomonas palustris</i> <i>Rhodobacter</i> sp. <i>Rhodobacter sphaeroides</i> <i>Rhodobacter capsulatus</i>	SUWANSAARD et al. (2010) KAWAGOSHI et al. (2010) ZHU et al. (2010) OBEID et al. (2010)

---

Fermentação anaeróbia	Ampla variedade de fontes de carbono como substrato; Não necessita de iluminação; Produção de metabólitos intermediários de grande valor agregado; Não há limitações com relação ao O <sub>2</sub> .	Tratamento do efluente após fermentação; CO <sub>2</sub> presente no gás.	<i>Clostridium</i> sp. <i>Clostridium butyricum</i> <i>Clostridium beijerinckii</i> <i>Citrobacter freundii</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	KAMALASKAR et al. (2010) TAI et al. (2010) SKONIECZNY E YARGEU (2009) BECKERS et al. (2010) MANDAL et al. (2006) JAYASINGHEARACHCHI et al. (2009) NIU et al. (2010)
-----------------------	--	---	---	---

---

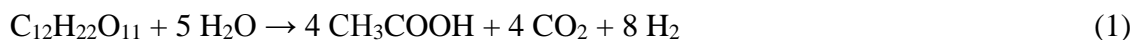
Dentre os sistemas apresentados na Tabela 5, a produção de hidrogênio por fermentação anaeróbia tem despertado grande interesse. A produção de hidrogênio por meio de bactérias fermentativas permite uma geração contínua e em ritmo sustentado, uma vez que não há inibição pela ausência de iluminação. Além disso, os micro-organismos fermentativos são mais eficazes na produção de hidrogênio em um curto intervalo de tempo quando comparados aos micro-organismos responsáveis pelos processos fotobiológicos (DAS E VEZIROGLU, 2008; HALLENBECK E BENEMANN, 2002; LEVIN, PITT E LOVE, 2004; MATHEWS E WANG, 2009).

O processo fermentativo permite ainda a utilização de diferentes tipos de resíduos como substrato, tais como materiais lignocelulósicos, glicerina, resíduos alimentícios e lácteos, entre outros. Neste contexto, a produção de hidrogênio via fermentação anaeróbia se apresenta como uma alternativa muito interessante de um ponto de vista técnico e ambiental (CHONG et al., 2009; DAS E VEZIROGLU, 2001).

### 3.3.2 Digestão anaeróbia

A digestão anaeróbia é um sistema ecologicamente delicado e balanceado, onde cada microrganismo tem função específica. Este processo ocorre na ausência de oxigênio molecular, onde se tem consórcios de diferentes tipos de microrganismos interagindo estreitamente para promover a transformação de compostos orgânicos complexos em simples (CAMPOS, 2006; STEIL, 2001).

A fermentação primária da digestão anaeróbia de resíduos orgânicos é o processo chave na produção de hidrogênio. Através dessa etapa, microrganismos acidogênicos decompõem a matéria orgânica (ex. carboidratos: glicose e sacarose) em  $H_2$ ,  $CO_2$  e ácidos graxos voláteis de cadeia curta. A Equação 1 mostra a conversão da sacarose a ácido acético e hidrogênio (FERNANDES, 2008):

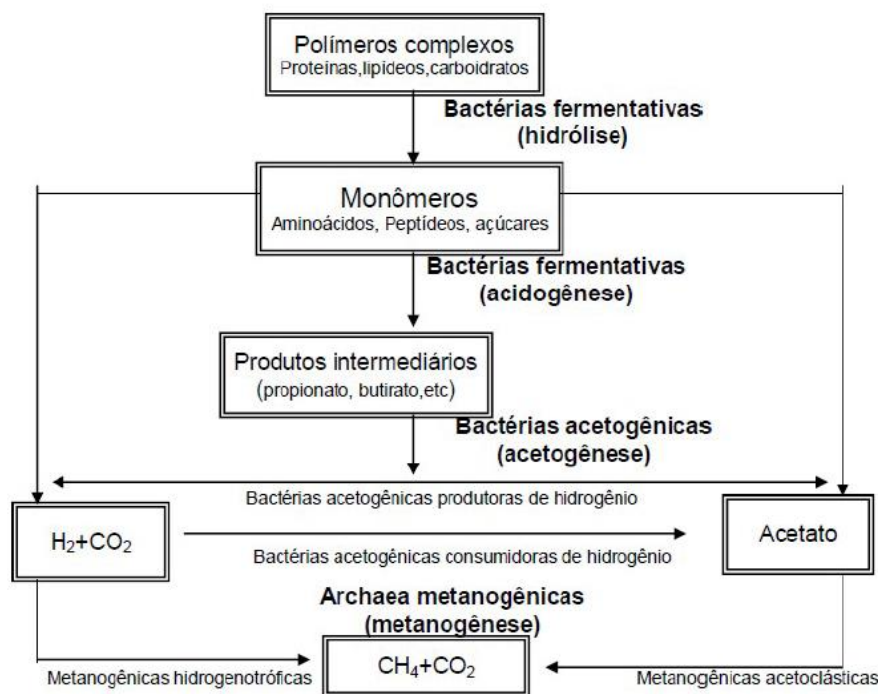


Portanto, a etapa fermentativa da digestão anaeróbia possibilita tanto a transformação da matéria orgânica em compostos facilmente degradáveis quanto a

produção de hidrogênio, obtendo-se, conseqüentemente, energia limpa a partir de resíduos orgânicos (SCHRÖDER E SCHOLZ, 2003).

As etapas do processo anaeróbio são divididas em quatro fases (Figura 2): hidrólise, acidogênese, acetogênese, metanogênese e/ou sulfetogênese, onde cada etapa possui grupos de micro-organismos com funções específicas que geram produtos através da degradação da matéria orgânica (CHERNICHARO, 1999), esses produtos se acumulam temporariamente, pela relação sinérgica que os micro-organismos possuem entre eles, pois o produto de um serve de substrato para outros numa próxima fase, em uma reação em cadeia.

**Figura 2 - Processo de digestão anaeróbia**



FONTE: CHERNICHARO(1999) apud FILHO (2015).

## Hidrólise

Na primeira fase do processo fermentativo, bactérias hidrolíticas produzem enzimas extracelulares que promovem a degradação dos materiais particulados

complexos em materiais dissolvidos mais simples, os quais são permeáveis às membranas celulares das bactérias fermentativas. Isso ocorre devido à ação de exo-enzimas secretadas pelas bactérias fermentativas. Nesta fase, os carboidratos, proteínas e lipídeos, serão convertidos em açúcares, aminoácidos e peptídeos, respectivamente (BRAUNA, 2012; SÁ et al, 2014).

As bactérias que hidrolisam a matéria orgânica nessa primeira fase são facultativas e anaeróbias estritas (AIRES, 2009). A velocidade da hidrólise é o fator limitante para o processo de digestão anaeróbia e, conseqüente, para a produção do biogás (BARCELOS, 2009).

Segundo Batstone et al. (2000) a taxa global de hidrólise do material orgânico, o qual chamamos de substrato, depende do tamanho e forma do particulado, concentração da biomassa, superfície de contato e produção de enzimas.

## **Substrato**

Uma grande variedade de materiais ricos em carboidratos, lipídios e/ou proteínas podem ser utilizados como substratos na produção de H<sub>2</sub> por via biológica. No entanto, conforme descrito em inúmeros estudos, os carboidratos constituem a fonte preferida de carbono orgânico no processo fermentativo (GUO et al., 2010; LAY et al., 2003; WANG EWAN, 2009).

Disponibilidade, custo e biodegradabilidade constituem os principais critérios para a seleção de substratos adequados para a produção de H<sub>2</sub> fermentativo. Carboidratos simples, como sacarose e glicose, são facilmente biodegradáveis, sendo por esse motivo utilizados como substratos modelo para a produção de hidrogênio biológico. No entanto, fontes puras de carboidratos representam matérias-primas caras para produção de H<sub>2</sub> em grande escala, sendo viáveis apenas quando baseadas em fontes renováveis e de baixo custo. É neste contexto que se destaca a utilização de materiais residuais como potenciais substratos para a produção de H<sub>2</sub>. A biotransformação de resíduos em H<sub>2</sub> pode ser considerada bastante atraente do ponto de vista ambiental (energia renovável) e econômica (recuperação de recursos e gestão de resíduos com baixo custo total)

(NTAIKOU, ANTONOPOULOU E LYBERATOS, 2010; DAS E VEZIROGLU, 2008).

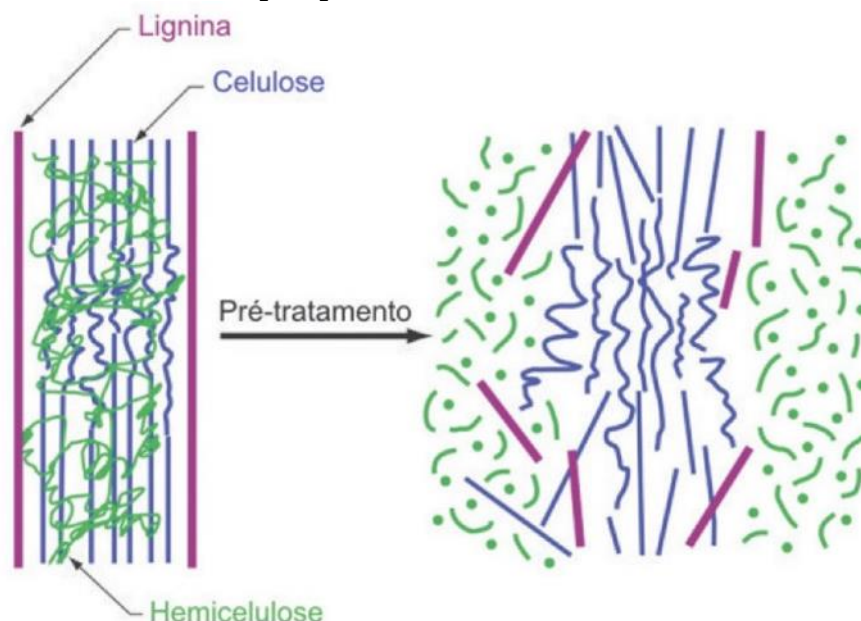
Inúmeros materiais residuais têm sido utilizados como substrato para as bactérias fermentativas na produção de H<sub>2</sub>, tais como resíduos alimentícios industriais ou domésticos, resíduos da indústria de papel, resíduos lácteos, resíduos do processamento do óleo de palma, dentre outros (DAVILA-VAZQUEZ, 2008; SHIN, YOUN E KIM, 2004; VIJAYARAGHAVAN E AHMAD, 2006).

Sem sombra de dúvidas, o substrato mais testado é a glicose, seguido da sacarose, o que favorece o entendimento do processo, por serem substratos facilmente degradáveis (FERNANDES, 2008). Como exemplo temos os resíduos lignocelulósicos oriundos do processo de produção de etanol (cana-de-açúcar).

Todo processo de conversão de biomassa vegetal a um produto qualquer, requer um pré-tratamento para alterar a estrutura da biomassa e tornar os polissacarídeos mais acessíveis aos processos subsequentes. O pré-tratamento tem por finalidade alterar ou remover a lignina e a hemicelulose, aumentar a área superficial do substrato por inchaço das fibras e diminuir o grau de polimerização e cristalinidade da celulose, deixando-a mais susceptível ao ataque enzimático e, conseqüentemente, em elevados rendimentos em açúcar. Tais características, são consideradas fatores que interferem na eficiência de hidrólise (Figura 3) (CANILHA et al., 2010; GÓMEZ, 2010; CHANG E HOLTZAPPLE, 2000; KIM E HOLTZAPPLE, 2006; SEABRA, 2008; SILVERSTEIN, CHEN, BOYETTE, 2007; WOOLEY et al., 1999; ZHANG E LYND, 2004).

O rendimento em açúcares redutores a partir de biomassa lignocelulósica, realizando a hidrólise enzimática, é baixo se o pré-tratamento adequado à biomassa não for realizado (LUO, VOET E HUPPES, 2010).

**Figura 3 - Alterações estruturais do complexo celulose-hemicelulose-lignina determinadas pelo pré-tratamento**



FONTE: SANTOS et al. (2012) Adaptado de KONDO E POLYM (1997)

O processo de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica pode ser agrupado em três categorias; físicos, com uso de altas temperaturas, altas pressões e ou rápida despressurização; químicos, com uso de reações químicas que desorganizam as ligações químicas da matriz lignocelulósica facilitando a solubilização de parte do material; e os biológicos com o uso de enzimas liberadas por micro-organismos capazes de degradar os componentes do material lignocelulósico. Os processos biológicos são menos estudados e demandam um tempo longo de duração, inviabilizando-os economicamente. Dentre estes métodos, os pré-tratamentos químicos e combinados têm recebido uma maior atenção, já que removem a lignina sem degradar a cadeia celulósica (GUILHERME, 2014).

Os pré-tratamentos têm efeitos diferentes sobre os componentes majoritários da biomassa lignocelulósica (GRAY, ZHAO E EMPTAGE, 2006). A avaliação para a escolha do melhor pré-tratamento não deve levar em consideração apenas o fator tecnológico, mas também os fatores econômicos e ambientais (SOUSA et al., 2009).

Um pré-tratamento é considerado bom se a acessibilidade ao ataque bioquímico e biológico, isto é, enzimas e microrganismos, é maximizada, e a formação dos coprodutos

inibidores é minimizada. A realização destes requerimentos é necessária para tornar um processo economicamente viável (RABELO, 2007).

### **Acidogênese**

Na fase acidogênica, as bactérias fermentativas absorvem os produtos solúveis gerados durante a hidrólise, onde são metabolizados no interior das células das bactérias, sendo convertidos em compostos mais simples. Os compostos produzidos incluem ácidos orgânicos voláteis, álcoois, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, além de novas células bacterianas (ANGELIDAKI, 1993; CHERNICHARO, 1999; CRESPO, 2013; SÁ et al, 2014).

A maioria dos carboidratos é degradado rapidamente, servindo de excelente fonte energética para o processo. Essa degradação fácil desses elementos, no entanto pode favorecer ao acúmulo dos produtos da fase acidogênica, diminuindo o pH, e causando assim uma falência do processo (BRAUNA, 2012).

A microbiota que atua nesta etapa é a que mais se beneficia energeticamente, e seus produtos servem de substrato para as bactérias acetogênicas e as arqueas metanogênicas.

### **Acetogênese**

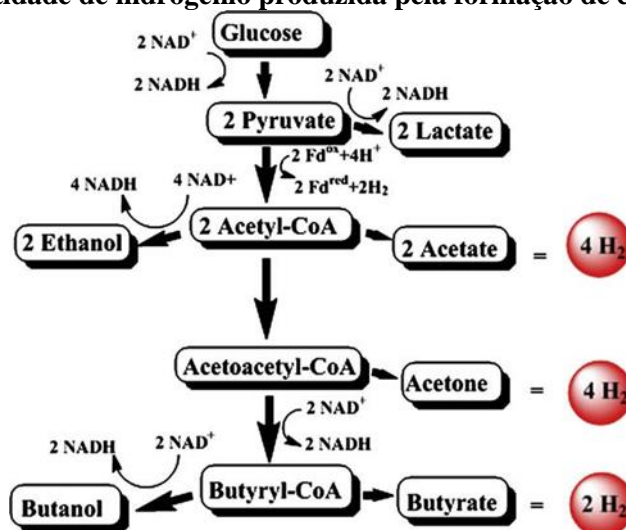
Durante essa etapa, as bactérias sintróficas acetogênicas são responsáveis pela oxidação dos produtos gerados na fase acidogênica em substrato apropriado (acetato, hidrogênio e dióxido de carbono) para as arqueias metanogênicas. O substrato é 70% destinado a produção de acetato, e 30% para a conversão em hidrogênio. Nesta etapa do processo, o H<sub>2</sub> pode também ser convertido em ácido acético pelas bactérias homo-acetogênicas (SÁ et al, 2014; SANTOS FILHO, 2015).

Os rendimentos teóricos do hidrogênio a partir de fermentações dependem em grande parte do tipo de organismos anaeróbicos que são usados na fermentação. Embora a glicose possa, teoricamente, fornecer 12 moles de hidrogênio por mol glicose, não existem vias metabólicas na natureza que permitam isso, uma vez que o crescimento



celular não seria possível. Os anaeróbios facultativos desenvolvem 2 moles de hidrogênio de cada mol de glicose consumida, enquanto anaeróbios estritos evoluem 4 mol, conforme Figura 4. No entanto, estes rendimentos teóricos são baseados no metabolismo conhecido e podem ser aumentados através da engenharia das vias metabólicas que convertem a glicose em hidrogênio (MATHEWS E WHANG, 2009).

**Figura 4 - Vias metabólicas simplificadas da redução de glicose e produção de vários metabolites e a quantidade de hidrogênio produzida pela formação de cada metabólito**



Fonte: MATHEWS E WHANG, 2009 apud Adaptado de CHIN 2003

### 3.4 Fatores que influenciam na produção de hidrogênio

A produção de hidrogênio a partir do processo de fermentação anaeróbia pode ser influenciada por uma série de condições operacionais e parâmetros físico-químicos, tais como o tipo de inóculo, temperatura, pH, tipo de reator e etc (NTAIKOU E ANTONOPOULOU, 2010; WANG E WAN, 2009).

#### 3.4.1 Inóculo

A produção de hidrogênio via fermentação anaeróbia pode ser realizada por meio de culturas microbianas mistas, derivadas de ambientes naturais, ou por culturas puras, selecionadas a partir de bactérias produtoras de H<sub>2</sub> (SÁ et al, 2014).

Existe uma variedade de bactérias que podem produzir hidrogênio. As quais podem ser mesofílicas ou termofílicas, aeróbias, facultativas ou anaeróbias, desde que possuam enzimas hidrogenase ou nitrogenase. Exemplos desse microrganismos são: *Clostridia*; *Rumen bacteria*; *Pyrococcus furiosus*; *Anaerocellum*, *Caldicellulosiruptor*; *Dictyoglomus*; *Fervidobacterium*; *Spirocheta*; *Thermotoga*; *Thermoanaerobacter*; *Enterobacter*; *Escheicchia. Coli*; *Citrobacter*; *Alcaligenes*; *Bacillus*; arqueias: *Methanosarcina barkeri* (BOXMA, 2005; HACKSTEIN, 2004; REITH et al., 2003).

Dentre eles, se destacam as espécies pertencentes ao gênero *Clostridium*, devido ao seu rápido metabolismo e sua capacidade de formar esporos frente a condições adversas. É identificado por ter mais espécies envolvidas na produção de hidrogênio (HUNG et al., 2008). Bactérias pertencentes aos gêneros<sup>43</sup>*Bacillus*, *Enterobacter* e *Thermoanaerobacterium* também têm sido relatadas como potenciais produtoras de H<sub>2</sub> (SÁ et al, 2014).

Apesar dessa praticidade aparente, o emprego destas culturas requer certos cuidados, a fim de evitar que microrganismos indesejáveis consumidores de H<sub>2</sub>, tais como as arqueias metanogênicas, as bactérias homoacetogênicas e as bactérias sulfato e nitrato redutoras. A estratégia para minimizar este efeito consiste no pré-tratamento do inóculo, que possui a finalidade de inibir e/ou eliminar os micro-organismos consumidores de H<sub>2</sub>, bem como selecionar os microrganismos produtores de H<sub>2</sub> (FANG, 2010; OH et al., 2003; WANG E WAN, 2009).

As arqueias metanogênicas, principais micro-organismos consumidores de H<sub>2</sub> na maioria dos ambientes anaeróbios, não possuem capacidade de esporular, não sobrevivendo, portanto, sob temperaturas extremas. O pH também constitui um fator de influência na atividade das arqueias metanogênicas no meio fermentativo, visto que a maioria destes micro-organismos cresce somente na faixa de pH de 6 a 8.52 (STERLING et al., 2001; VIJAYARAGHAVAN E AHMAD, 2006).

O pré-tratamento térmico é capaz de prevenir a metanogênese, no entanto, não inibe o consumo de H<sub>2</sub> pelas bactérias homoacetogênicas. A presença de bactérias homoacetogênicas no meio fermentativo pré-tratado ocorre em virtude de algumas destas bactérias pertencerem ao gênero *Clostridium*, tais como *C. aceticum* e *C. thermoautotrophicum*. Estudos mostram que a atividade deste tipo de bactéria no inóculo

pode ser suprimida através da remoção de  $\text{CO}_2$  do *headspace*, uma vez que estas bactérias necessitam concomitantemente de  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2$  para conversão a ácido acético (OH, GINKEL E LOGAN, 2003; PARK, 2005).

As bactérias que utilizam nitrato ou sulfato como aceptores de elétrons são mais eficientes em baixas concentrações de  $\text{H}_2$  no meio. Além disso, estas bactérias só competem com as bactérias homoacetogênicas e com as arqueias metanogênicas na presença de nitrato e sulfato em excesso. Valores de pH menores que 6 inibem consideravelmente a atividade das bactérias sulfato-redutoras (WEJIMA et al., 2002; LIN E CHENG, 2006).

Algumas técnicas podem ser aplicadas diretamente nos inóculos a fim de minimizar essas reações tanto antes como durante o processo. Entre as técnicas empregadas destacam-se: tratamentos químicos (ácido, alcalino, adição de compostos químicos) e físicos (térmico, congelamento/descongelamento, aeração). A Tabela 6 apresenta alguns exemplos de métodos de pré-tratamento de inóculo para produção de  $\text{H}_2$  (FERNANDES, 2008; SÁ et al, 2014).

**Tabela 6- Comparação de diferentes métodos de pré-tratamento de inóculo para produção de H<sub>2</sub> por fermentação anaeróbia**

Inóculo	Substrato	pH inicial	Temperatura (°C)	Pré-tratamentos testados	Pré-tratamento ótimo	Rendimento máximo de H <sub>2</sub> (mol de H <sub>2</sub> /mol de substrato)	Referências
Lodo anaeróbio de produção de etanol	Glicose	5,5	37	T, AC, ALC e adição de ácido linoleico	Adição de ácido linoleico	1,70	CHAGANTI, KIM E LALMAN (2012)
Lodo ativado de ETE	Glicose	7,0	35	T, AC, ALC, AER, adição de clorofórmio e BESA*	AC	1,51	CHAIRATTANAM ANOKORN et al
Lodo de ETE	Glicose	-	35	T, AC, ALC, AER	AER	1,96	REN et al. (2008)
Lodo de digestor de ETE	Glicose	6,0	37	T, AC, ALC, choque de carga, adição de ácido linoleico e BESA*	Adição de ácido linoleico	1,69	PENDYALA et al.(2012)
Lodo anaeróbio digerido de ETE	Glicose	5,5	55	T, AC e choque de carga	T	1,77	LUO et al. (2011)
Lodo de digestor de ETE	Glicose	7,0	35	T, AC, ALC, Q, AER, adição de clorofórmio	T	1,78	WANG E WAN (2008)
Lodo anaeróbio de reator de tratamento de efluente de processamento de soja	Sacarose	5,5	35	T, AC, ALC	T	4,00	MU, YU E WANG (2007)
Lodo anaeróbio de planta de óleo de palma	Sacarose	5,5	60	T, AC, ALC, adição de BESA*, choque de carga	Choque de carga	1,96	O-THONG, PRASERTAN E BIRKELAND
Lodo de ETE	Sacarose	5,5	35	T, AC, ALC	T	4,62	DE SÁ (2013)

\*BESA = ácido 2-bromoetansulfônico, ETE = estação de tratamento de esgoto, T = térmico, AC = ácido, ALC = alcalino, AER = aeração.

Como pode ser observado na Tabela 6, existem muitas diferenças com relação ao pré-tratamento ótimo para enriquecimento das bactérias produtoras de H<sub>2</sub>. Esta discordância está relacionada a inúmeros fatores, tais como o tipo e origem do inóculo utilizado, condições do pré-tratamento e do processo fermentativo e tipo de substrato (NTAIKOU, ANTONOPOULOU E LYBERATOS, 2010; O-THONG, PRASERTAN E BIRKELAND, 2009; ZHU E BÉLAND, 2006).

Oh et al. (2003) optaram pelo pré-tratamento térmico do lodo. Entretanto, os autores observaram que o tratamento não foi suficiente para suprimir o consumo de H<sub>2</sub> sob condições de elevada pressão parcial de hidrogênio e baixa concentração de sacarose (FERNANDES, 2008).

Mohan et al. (2008) compararam alguns processos de tratamento de inóculos metanogênicos como forma de obter culturas enriquecidas de microrganismos produtores de hidrogênio. Pré-tratamento térmico (100°C por 1 h); pré-tratamento com ácido ortofosfórico (pH = 3 por 24 h) e pré-tratamento com ácido 2- bromoetano sulfônico (BESA) em solução de sal de sódio (BESA; 0,2g.l<sup>-1</sup> por 24 h). Todos os processos apresentaram produções de hidrogênio superiores ao sistema que não sofreu nenhum processo de tratamento.

Hu e Chen (2007) testaram três formas de pré-tratamento: com calor, pH e clorofórmio, sendo que o tratamento com clorofórmio mostrou ser o processo mais eficiente e não foi observada a presença de metanogênese no processo.

É importante observar que os trabalhos de Mohan et al.(2008) e Hu e Chen (2007) foram realizados em batelada o que não possibilita avaliar os efeitos dos processos de pré-tratamento a longo prazo, como observado por Oh et al.(2003).

### 3.4.2 Temperatura

A temperatura é um dos principais fatores ambientais que afetam o processo de produção de hidrogênio via fermentação anaeróbia, uma vez que afeta os processos biológicos de diferentes maneiras. (CHERNICHARO et al., 1999). As reações de fermentação podem ser conduzidas em faixas ótimas de temperatura: bactérias criofílicas, que atuam a temperaturas inferiores a 20°C, mesofílica (25-40 °C), termofílica (40-65

°C), termofílica extrema (65-80 °C) e hipertermofílica (> 80 °C). Quando o ambiente está com temperatura abaixo de 10°C, a produção de gás fica bastante reduzida. Os microrganismos metanogênicos são inativados a altas e baixas temperaturas (LEVIN, PITT E LOVE, 2004).

O hidrogênio apresenta baixa solubilidade em fase aquosa: 0,017 cm<sup>3</sup> de hidrogênio por 1 cm<sup>3</sup> de água a 1 bar e 37°C (GUWY et al., 1997). Levando-se em consideração a Lei de Henry, temperaturas mais elevadas acabam reduzindo a solubilidade do gás na fase aquosa e, conseqüentemente, a interação do gás com os microrganismos presentes no processo. Isso desfavorece o consumo do gás para geração de outros produtos do processo fermentativo e aumenta a eficiência de não remoção do biogás.

O aumento da atividade dos microrganismos produtores de H<sub>2</sub>, acidogênicos, pode ser atingido com a elevação da temperatura empregada, como foi observado por alguns autores (HUANG et al., 2004; MU et al., 2006). Entretanto, é preciso ter cuidados com esta prática, já que cada microrganismo tem sua temperatura ótima de atuação, assim como os consórcios microbianos (NGUYEN et al., 2008).

A maioria dos estudos de produção de H<sub>2</sub> fermentativo tem utilizado a faixa de temperatura mesofílica. Li et al. (2007) citam que 73 dos 121 estudos de caso foram realizados em temperatura mesofílica. A Tabela 7 apresenta alguns estudos que investigaram o efeito da temperatura no processo de produção do H<sub>2</sub> fermentativo.

**Tabela 7- Estudos sobre o efeito da temperatura na produção de H<sub>2</sub>**

Inóculo	Substrato	Temperatura (°C)		Rendimento máximo de H <sub>2</sub> (mol de H <sub>2</sub> /mol de substrato)	Referências
		Faixa estudada	Temperatura ótima		
Lodo anaeróbio	Glicose	33-41	41	1,67	MU ET AL. (2006)
Lodo de esgoto municipal	Xilose	30-55	50	1,30	LIN, WU E HUNG (2008)
Lodo anaeróbio	Sacarose	25-45	35	3,73	KARADAG E PUHAKKA (2010)
Cultura mista anaeróbia	Glicose	37-65	45	1,71	LEE, LIN E CHANG (2006)
Lodo de tratamento de águas residuárias	Sacarose	30-45	40	3,88	CHIN, CHEN E CHOU (2003)
<i>Clostridium acetobutyricum</i> ATCC824	Glicose	30-40	37	2,00	XING et al. (2008)
<i>Ethanoligenens harbiense</i>	Glicose	20-50	35	1,92	WANG, MU E YU (2005)
<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	Sacarose	45-70	60	2,53	OH, GINKEL, E LOGAN (2003)

Muitas pesquisas acabam convergindo para temperaturas que variam de 30°C a 36,8°C, definindo estas como temperaturas otimizadas para sistemas anaeróbios fermentativos produtores de hidrogênio (FANG; LIU E ZHANG, 2002; LIN E CHANG 2004; MIZUNO et al., 2002). A temperatura ótima para cada processo depende do tipo e origem do inóculo, da quantidade de compostos biodegradáveis e das condições operacionais do sistema.

### 3.4.3 pH

O pH constitui outro fator que influencia fortemente no processo de produção de H<sub>2</sub> fermentativo. Dois diferentes tipos de experimentos têm sido conduzidos para determinação do pH ótimo para produção de H<sub>2</sub>. O primeiro envolve o ajuste de diferentes valores iniciais de pH, enquanto o outro envolve o controle e manutenção do mesmo pH durante todo o processo fermentativo. Rendimentos de H<sub>2</sub> utilizando o ajuste do pH inicial bem como a manutenção do pH controlado podem ser analisados na Tabela 8 (SÁ et al, 2014).

As bactérias que realizam as quatro fases da digestão, possuem exigências individuais quanto ao pH. O pH ideal para as hidrolíticas e fermentativas varia de 4,5 – 6,3. Por outro lado as arqueas metanogênicas necessitam de um pH entre 6,5 – 8,0 (BACKES, 2011) No entanto o pH pode sofrer alterações durante o processo de digestão, devido aos metabolitos que se acumulam no sistema fazendo com que o meio fique mais ácido ou alcalino (CAMPOS et al., 2006)

Algumas pesquisas mostram que o pH otimizado para produção de hidrogênio está na faixa de 5,0 e 6,5 (FANG; LIU E ZHANG, 2002; LIN, CHANG e HUNG 2008; MIZUNO et al., 2002) sendo o pH em torno de 5,5 relacionado aos melhores rendimentos de produção de H<sub>2</sub> (FANG E LIU, 2002; MU et al., 2007; SHIN et al., 2007), mesmo trabalhando com culturas diferentes. O pH dentro da faixa supracitada favorece a atividade das enzimas envolvidas no processo de produção do H<sub>2</sub>, bem como permite a inibição dos micro-organismos consumidores de H<sub>2</sub> presentes no meio fermentativo (LI E FANG, 2007; VALDEZ-VAZQUEZ E POGGI-VARALDO, 2009)

O pH afeta não somente o rendimento da produção de H<sub>2</sub> mas também modifica o espectro de subprodutos formados, bem como promove alterações nas comunidades bacterianas presentes no meio fermentativo (TEMUDO, KLEEREBEZEM E LOOSDRECHT, 2007; YE et al., 2007). Temudo et al. (2008) estudaram o impacto do



pH na atividade metabólica e na diversidade microbiana no processo fermentativo com glicose, xilose e glicerol a 30 °C. Os autores observaram que em pH baixo (< 6), os principais metabólitos formados consistiam dos ácidos butírico e acético, enquanto que em elevados valores de pH o espectro de produtos formados mudava para ácido acético e etanol. Além disso, os autores observaram que em ambas as condições, pH baixo ou elevado, havia a predominância de espécies do gênero *Clostridium*, enquanto que em valores intermediários de pH havia uma maior diversidade microbiana no meio fermentativo.

Chernicharo (1999) afirmou que valores baixos de pH indicam o acúmulo de ácidos graxos voláteis, o que inibe a metanogênese. Já os valores superiores a 8,0 podem favorecer a formação de amônia, que é tóxica a comunidade microbiana nas concentrações acima de 150 mg de NH<sub>3</sub>/L

**Tabela 8 - Efeito do pH na produção de H<sub>2</sub>**

Inóculo	Substrato	pH inicial		Rendimento máximo de H <sub>2</sub> (mol de H <sub>2</sub> /mol de substrato)	Referências
		Faixa estudada	pH ótimo		
Ajuste do pH inicial					
Lodo anaeróbico	Amido	5,0-7,0	5,0	1,10	LIN, CHANG E HUNG (2008)
Lodo de esgoto municipal	Xilose	5,0-8,0	6,5	1,30	LIN et al. (2006)
<i>Clostridium butyricum</i>	Sacarose	5,0-6,5	5,5	2,78	CHEN et al. (2005)
<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	Sacarose	4,0-8,5	6,2	2,53	OH, GINKEL, E LOGAN (2003)
Controle do pH durante o processo					
<i>Ethanoligenens harbiense</i>	Glicose	3,0-8,0	5,0	1,92	XING et al. (2008)
Cultura mista	Sacarose	3,4-6,3	4,2	1,61	MU, YU E WANG (2006)
Lodo anaeróbico	Sacarose	4,7-6,3	5,5	3,73	WANG, MU E YU (2005)
Lodo anaeróbico	Glicose	4,0-7,0	5,5	2,10	FANG E LIU (2002)

### 3.5 Estudos já realizados

Até 2004, a maioria das pesquisas concentravam-se na Coreia, Japão e Taiwan, países com escassez de fontes de energia. Pequenas contribuições vinham dos Estados Unidos e Europa e grupos de pesquisa no Brasil ainda não haviam despertado para produção de H<sub>2</sub> (FERNANDES, 2008).

Até o início de 2008, vários resultados positivos foram mapeados quanto à produção biológica de hidrogênio, demonstrando a viabilidade da utilização do H<sub>2</sub>, produzido biologicamente, para a geração de energia (WU et al., 2003) e possibilitaram a implantação de sistemas de produção de hidrogênio, até o momento, em escala piloto (REN et al., 2006).

Abaixo segue a Tabela 9 com um resumo de alguns trabalhos para produção de hidrogênio.

**Tabela 9- Trabalhos utilizando o bagaço como substrato para produção de hidrogênio**

Autor	Substrato	Pré-hidrólise	Inóculo	Fatores estudados	Valores	Melhor resultado	Produção de H <sub>2</sub>	
Chairattanamanokorn (2011)	Bagaço	NaOH	Lodo de ete anaeróbio	Temperatura do lodo (°c);	25, 35, 45, 55 e 65;	55	---	
				pH inicial	4, 5, 6 e 7.	5	---	
Soares et al. (2014)	Bagaço	Ácido e térmico	Lodo de tratamento de vinhaça	Pré-tratamento do bagaço	Ácido e térmico	Diluição: 10 <sup>-1</sup> e 10 <sup>-4</sup>	0,009 mmol	
				Tratamento do inóculo: diluição	Diluição: 10 <sup>-1</sup> e 10 <sup>-4</sup>		0,03 mmol	
Siqueira et al (2014)	Bagaço	HCl	Lodo de reator anaeróbio para tratamento de vinhaça	Porcentagem de ácido, temperatura e tempo da pré-hidrólise	HCl: 0,64-7,36%	96,8°C, 7,36 % de HCl e 441,6 min	10,87 ml/g	
					T(°c)			(1)
					T(min): 38,4-441,6			(2)
					Tipos de bagaço			(3)
								(4)
								(5)
								(6)
	(7)							
Braga et al (2014)	Glicose	-----	Solo de mata fechada e resíduo de compostagem de resíduos orgânicos (alimentos)	Tipos de inóculo	Diluição de até 10 <sup>-2</sup> e 10 <sup>-5</sup>	Diluição 10 <sup>-1</sup> (solo) e 10 <sup>-2</sup> (alimento)	0,23 e 0,09 mmol	

Torquato et al. (2014)	Sacarose	-----	Lodo granular anaeróbio	Concentrações de sacarose	2 g/l, 5 g/l, 10 g/l	10 g/l	8, 7,3 e 11,5 mmol H <sub>2</sub> /l
Pachiega et al. (2014)	Sacarose	-----	Lodo granular de reator uasb	Tipos de inóculo	(1)' (2)' (3)'	(3)'	9,62 mmol H <sub>2</sub> /L
Ratti et al (2014)	Bagaço	Explosão à vapor e tratamento alcalino	Bagaço de cana de açúcar (bca) “in natura”	Varição da massa**	(1)'' (2)'' (3)'' (4)'' (5)'' (6)''	(2)''	7,7 mmol
Lamaison et al (2014)	Vinhaça	-----	Cultura mista coletada de um reator anaeróbio	Lodo tratado e sem tratamento	Tratamento térmico (80°C por 15 min.) E um ácido (ph 3 por 24h)	Lodo tratado	170 ml/d
Tavares (2016)	Manipueira	-----	-----	TDH	8, 6, 4 e 2 h	55°C	1,24 mol H <sub>2</sub> .mol glicose <sup>-1</sup>
Andrade (2017)	Palma forrageira	Ácido (HCl) e alcalino (NaOH)	Suínos	Porcentagem de inóculo e tipo de pré-hidrólise	-----	5% (v/v) de inóculo de suínos com 5% (m/v) de substrato em solução aquosa com 0,5% (v/v) de naoh	286,32 ml H <sub>2</sub> /gssvh

---

Chaves (2018)	Melaço	-----	-----	Diferentes cargas	TDHs: 12, 6, 4 e 3 h	6h	3,07 mol
				orgânicas volumétricas (cov) e tempos de detenção hidráulica			$H_2.mol^{-1}$

---

**Leganda:** (1) hidrolisado de cana de açúcar líquido, (2) hidrolisado líquido junto com o sólido tratado, (3) hidrolisado líquido junto com o sólido e enzima (Celluclast®),

(4) bagaço tratado, (5) bagaço tratado e enzima, (6) glicose e (7) bagaço;

(1)' lodo granular de reator UASB tratando resíduos de cervejaria; (2)' lodo de lagoa anaeróbia facultativa tratando esgoto municipal, e (3)' lodo granular de reator UASB tratando esgoto municipal;

(1)'' 0,5 g/L BCA "in natura" + 0,5 g/L BCA pré-tratado; (2)'' 2,0 g/L BCA "in natura" + 2,0 g/L BCA pré-tratado; (3)'' 0,5 g/L BCA "in natura" + 0,5 g/L glicose;

(4)'' 2,0 g/L BCA "in natura" + 2,0 g/L glicose; (5)'' 0,5 g/L BCA "in natura"; (6)'' 2,0 g/L A "in natura".

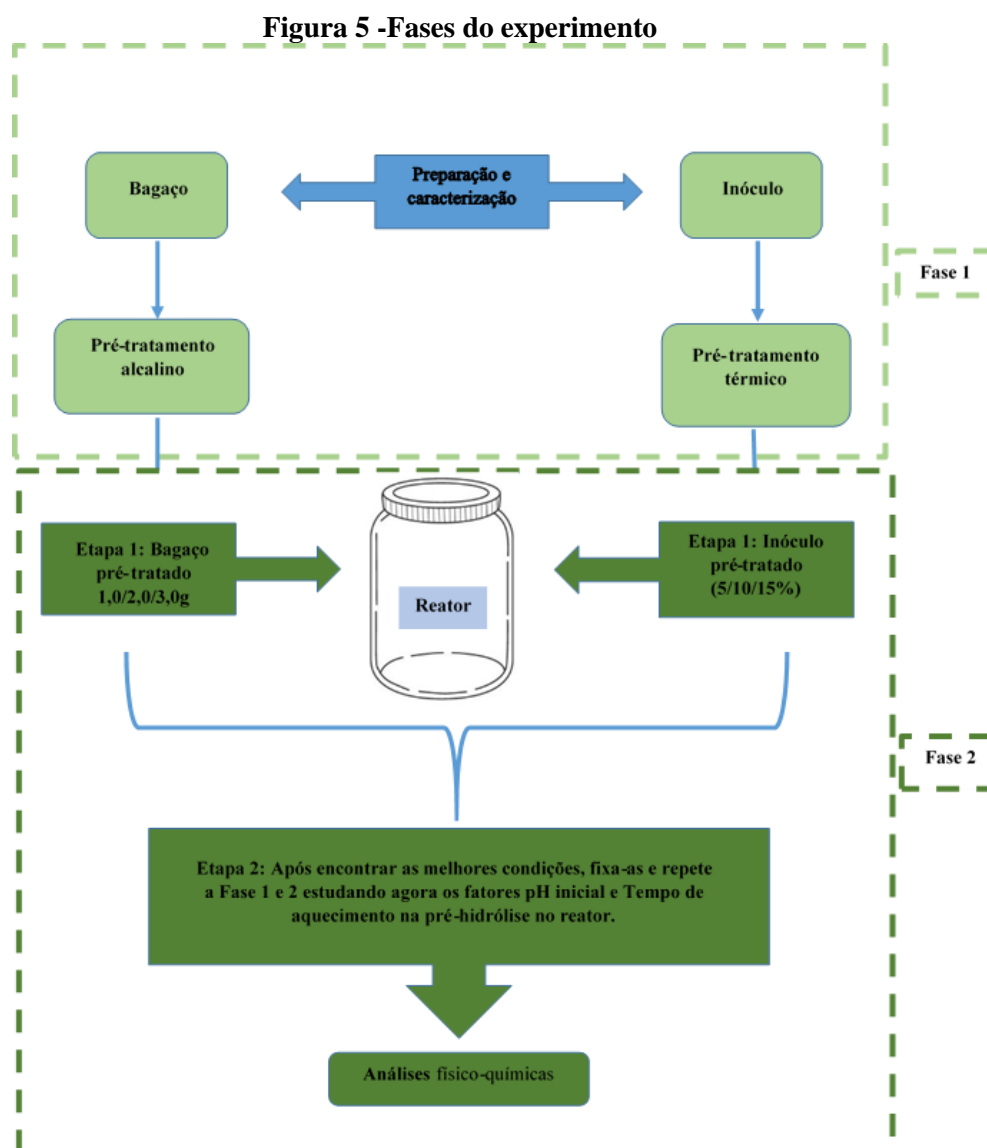
Fonte: Autora (2018)

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada nas seguintes fases:

- Fase 1 – Preparação, pré-tratamentos e planejamento experimental;
- Fase 2 – Desenvolvimento e Monitoramento do Experimento.

Na Fase 1 foram desenvolvidas as atividades da preparação, caracterização do bagaço e dos pré-tratamentos tanto do bagaço como do inóculo. Enquanto que na Fase 2, foi dividida em duas etapas, onde foram realizadas os procedimentos operacionais do sistema em batelada, assim como o seu monitoramento e análises, conforme demonstrado na Figura 5.



Fonte: Autora (2018)

## 4.1 Fase 1

### 4.1.1 Bagaço de cana-de-açúcar

Foi utilizado como substrato visando a produção fermentativa de hidrogênio no presente trabalho o bagaço de cana-de-açúcar. O bagaço da cana, utilizado nos ensaios, foi cedido pela Usina Santo Antônio, localizada em São Luís do Quitunde-AL.

O processo de pré-tratamento é crucial a desestruturação da matriz lignocelulósica de forma a deixar a celulose mais disponível para o ataque das enzimas celulolíticas. Mas antes de aplicado o pré-tratamento, foi feita a caracterização do substrato através das seguintes análises: DQO, carboidratos, sólidos totais, sólidos suspensos totais, sólidos suspensos voláteis e pH.

### Preparo e caracterização do bagaço

Devido à característica sólida do substrato, foi utilizado um triturador, para reduzir o tamanho das partículas, conforme mostra a Figura 6, para Batstone et al. (2000), o tamanho da partícula do substrato, assim como a concentração da biomassa e superfície de contato, influenciam na taxa global de hidrólise.

**Figura 6 - Antes e depois da trituração do bagaço**

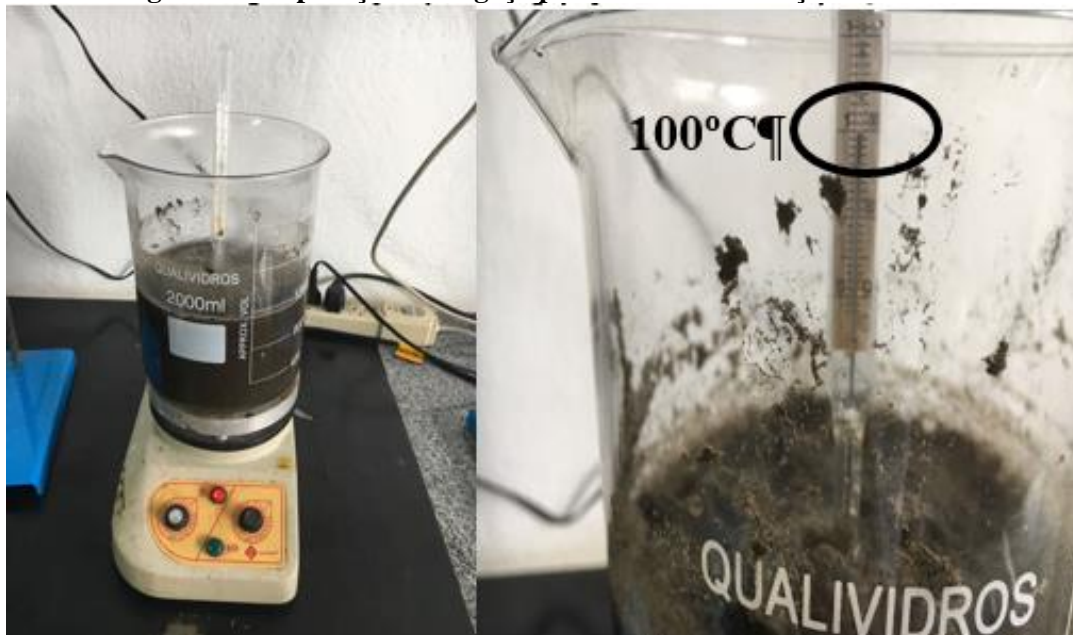


Fonte: Autora (2017)

Conforme foi indicado por Chairattanamanokorn (2011) em seu trabalho, preparou-se uma solução de 70g/l do bagaço triturado com água destilada aquecendo a solução a 100°C por um tempo de 2h, o que chamamos de amostra bruta, conforme mostra

a Figura 7, esta preparação foi realizada para facilitar as análises físico-químicas o qual é necessário que a fase da amostra seja líquida e não sólida. Após a solução atingir temperatura ambiente segue-se as análises referente a sua caracterização.

**Figura 7 - Preparação do bagaço para sua caracterização**



Fonte: Autora (2017)

### **Pré-tratamento (hidrólise) do bagaço de cana-de-açúcar**

Neste trabalho foi realizado um pré-tratamento alcalino para sacarificação da biomassa lignocelulósica (bagaço). O bagaço in natura (sem o preparo) foi seco por 2h a 105°C em uma estufa, após resfriar, misturado com hidróxido de sódio (NaOH) 0,5%, sendo aquecido ou não, conforme o planejamento experimental.

#### **4.1.2 Inóculo**

Foi utilizado um inóculo proveniente da atividade referente à Estações de Tratamento de Efluentes, lodos de ETE anaeróbico. Antes de sua utilização foi realizado sua caracterização e um pré-tratamento térmico para inibir a atuação das bactérias metanogênicas.

### **Caracterização**



Antes do tratamento foram realizadas as seguintes análises para caracterizar o inóculo bruto utilizado:

**Tabela 10- Caracterização do inóculo**

<b>Análise</b>	<b>Metodologia</b>
pH	
DQO	APHA: Standard Methods
Sólidos (sólidos totais – ST, sólidos suspensos Fixos – SSF, sólidos suspensos voláteis – SSV)	for Examination of Water and Wastewater (1998).
Carboidratos	DUBOIS et al.(1956)

Fonte: Autora (2017)

### **Pré-tratamento**

Com o objetivo de impedir a produção de metano, foi realizado um pré-tratamento térmico. O pré-tratamento térmico ocorreu de forma simples: colocou-se o inóculo em um aquecedor até que atingisse a temperatura de 100°C, quando a temperatura é atingida mantém-se por 15 min, em seguida resfria-se o inóculo até que se obtenha a temperatura de 25°C (CUI E SHEN, 2012).

#### 4.1.3 Planejamento experimental

A Tabela 11 apresenta a matriz das variáveis de estudo utilizadas no planejamento fatorial, e os níveis reais para cada variável do sistema. Foi adotado um planejamento experimental fatorial  $2^k$  com adição de 3 repetições no ponto central (PtCt). No planejamento  $2^k$ , k representa o número de fatores e 2 representa o número de níveis.

Para o planejamento experimental da etapa 1 os fatores adotados foram: A – Massa de substrato e B – percentual de inóculo. Como mostra a Tabela 11, para o fator A, foram usados os níveis 0,5 e 1,5 g codificados para baixo (-) e alto (+), respectivamente. Para o fator B, foram usados níveis 10 e 20, codificados nos níveis baixo (-) e alto (+), respectivamente. O ponto central é a média aritmética dos níveis nos fatores.

Portanto, para o fator A, o ponto central adotado foi 1 g. Para o fator B, o ponto central usado foi 15, que são codificados como 0 (zero).

**Tabela 11- Níveis reais e variáveis do planejamento fatorial 2<sup>2</sup>**

Variáveis	Níveis
<b>Massa de substrato (g)</b>	(-1) = 0,5
	(0) = 1
	(+1) = 1,5
<b>% de inóculo</b>	(-1) = 10
	(0) = 15
	(+1) = 20

Fonte: Autora (2017)

Após encontramos as melhores condições para o planejamento da etapa 1, fixamos essas condições ótimas e variamos outros fatores. Para o planejamento experimental da etapa 2 os fatores adotados foram: A – pH inicial e B – Tempo de aquecimento na pré-hidrólise (min). Como mostra a Tabela 12, para o fator A, foram usados os níveis 5 e 7 codificados para baixo (-) e alto (+), respectivamente. Para o fator B, foram usados níveis 0 e 60, codificados nos níveis baixo (-) e alto (+), respectivamente. O ponto central é a média aritmética dos níveis nos fatores. Portanto, para o fator A, o ponto central adotado foi 6. Para o fator B, o ponto central usado foi 30, que são codificados como 0 (zero).

**Tabela 12- Níveis reais e variáveis do planejamento fatorial 2<sup>2</sup>**

Variáveis	Níveis
<b>pH inicial</b>	(-1) = 5
	(0) = 6
	(+1) = 7
<b>Tempo de aquecimento na pré-hidrólise (min)</b>	(-1) = 0
	(0) = 30
	(+1) = 60

Fonte: Autora (2017)

O experimento teve como objetivo verificar se existem efeitos significativos entre os fatores das duas etapas, além das interações entre eles, através da análise de variância – ANOVA.

## 4.2 Fase 2

### 4.2.1 Procedimentos experimentais

Foram utilizados como reatores frascos de 100 mL sendo que o volume ocupado pela mistura foi de 50% do volume total do recipiente (50mL). Foram escolhidos reatores em batelada devido à maior facilidade de operação e controle (WANG e WAN, 2009).

A correção do pH inicial foram feitas com a adição de HCl, logo após o pré-tratamento do bagaço.

Os frascos foram hermeticamente fechados com rolha de borracha de butila e lacre metálico, o que impossibilita o vazamento dos gases produzidos, como mostra a Figura 8. A anaerobiose foi estabelecida pela substituição de todo o ar atmosférico presente no *headspace* dos frascos pelo nitrogênio, como mostra a Figura 9.

**Figura 8 - Reatores sendo hermeticamente fechados**



Fonte: Autora (2018).

**Figura 9 - Substituição de todo o ar atmosférico presente no headspace dos frascos pelo nitrogênio**



Fonte: Autora (2018).

Foram avaliados os efeitos da massa do inóculo e do substrato na produção biológica de hidrogênio sob condições mesofílicas ( $\pm 35^{\circ}\text{C}$ ) e pH inicial de 7,0 (para a Etapa 1 da Fase 2 do experimento) através da utilização de uma incubadora *shaker* devido ao efeito positivo dessa faixa de temperatura na produção de hidrogênio, além da rotação utilizada de 120 rpm (CUI E SHEN, 2012).

#### 4.2.2 Análises físico-químicas

As análises físico-químicas foram realizadas periodicamente no Laboratório de Saneamento Ambiental (LSA) e no Laboratório de Controle Ambiental (LCA) do Centro de Tecnologia (CTEC) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Campus A.C. Simões, localizado na cidade de Maceió - AL.

A Tabela 13 apresenta as análises laboratoriais que foram realizadas no decorrer do trabalho para o controle operacional dos reatores utilizados com as respectivas metodologias que foram adotadas para execução das mesmas.

**Tabela 13- Análises dos reatores**

Análise	Metodologia
pH	
DQO	APHA: Standard Methods
Sólidos (sólidos totais – ST, sólidos suspensos totais – SST, sólidos suspensos voláteis – SSV)	for Examination of Water and Wastewater (1998).
Hidrogênio	
Ácidos Orgânicos Voláteis e Alcoóis	Cromatografia gasosa: MAINTINGUER et al (2008)
Carboidratos	DUBOIS et al.(1956)

Fonte: Andrade (2017)

### Determinação da Produção de Hidrogênio

As determinações da produção de hidrogênio 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, conforme Figura 10, munido de detector de condutividade térmica (TCD), com as seguintes configurações:

**Figura 10– Cromatógrafo gasoso de alta resolução, da marca Shimadzu, modelo GC 2010**



Fonte: Autora (2018)

- Coluna Carboxen™ 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<sup>-1</sup>;
- Tempo total de análise: 6,87 min.

Nestas condições, o H<sub>2</sub>, foi detectado no tempo aproximado de 1,8 minutos, respectivamente. Para as análises, foram retiradas amostras de 0,25 mL da fase gasosa do *headspace* do reator com o uso de seringa *gastigh* com trava da marca Hamilton, conforme Figura 11, 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.

**Figura 11– Retiradas amostras de 250uL da fase gasosa do headspace do reator com o uso de seringa *gastigh* com trava da marca Hamilton**



Fonte: Autora (2018)

Para isso, o volume acumulado de hidrogênio foi calculado pela Equação 2:

$$V_{H,i} = V_{H,i-1} + CH_i(V_{G,i} - V_{G,i-1}) + V_{H,0}(CH_i - CH_{i-1}) \quad (2)$$

Onde,

$VH_i$  = volume de hidrogênio acumulado no tempo atual

$VH_{i-1}$  = volume de hidrogênio acumulado no tempo anterior

$CH_i$  = volume de hidrogênio acumulado no *headspace* do recipiente no tempo atual

$CH_{i-1}$  = volume de hidrogênio acumulado no *headspace* do recipiente no tempo anterior

$VG_i$  = volume total de biogás no tempo atual

$VG_{i-1}$  = volume total de biogás no tempo anterior

$VH_0$  = volume de hidrogênio acumulado no tempo inicial.

Já a taxa máxima de produção de  $H_2$  ( $mmolH_2/dia$ ) representa o volume máximo de  $H_2$  produzido em um reator em determinado intervalo de tempo, e, neste trabalho, será obtida através de um ajuste para funções de crescimento sigmoidais realizado com o auxílio do *software* Origin 2018b.

Para que possam ser comparados os resultados obtidos das produções de hidrogênio dos reatores durante o experimento, foram calculadas as produções específicas de hidrogênio de cada reator. Essa produção é calculada utilizando-se a Equação 3 a seguir, e tem o intuito de fornecer a capacidade que uma determinada comunidade microbológica apresenta para converter o substrato em gás, nesse caso, o hidrogênio.

$$PEH = \frac{mmolH_2}{gSSVdia} \quad (3)$$

Onde:

$PEH$  = Produção específica ( $mmolH_2/gSSVdia$ );

$mmolH_2/dia$  = Taxa máxima de produção de  $H_2$  por dia;

$gSSV$  = Quantidade inicial de inóculo presente nos reatores.

A partir desse dado, é possível aperfeiçoar condições operacionais como a quantidade de inóculo necessária em um reator anaeróbio para consumir a matéria orgânica presente no mesmo (AQUINO et al. 2007). Enquanto isso, os sólidos suspensos voláteis (SSV) fornecem uma ideia sobre o crescimento da comunidade microbológica aderida à biomassa presente nos reatores, sendo obtidos com a realização do ensaio de sólidos suspensos como já foi mencionado anteriormente.

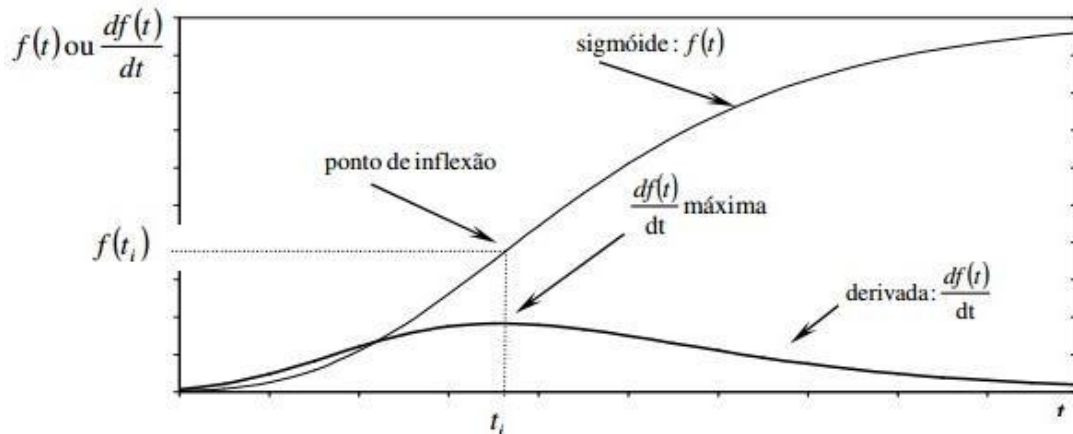
### 4.2.3 Funções sigmoidais não-lineares

As regressões lineares simples, múltiplas e polinomiais, são as mais comumente utilizadas para ajustar dados experimentais. No entanto, a maioria dos fenômenos reais, sejam eles físicos, químicos ou biológicos, como é o caso da produção de hidrogênio, é melhor representada por outros tipos de funções denominadas de funções não lineares, as quais não são linearizáveis por transformação.

A curva representativa da produção acumulada de hidrogênio tem o formato de “S”, por isso, recebe o nome de função sigmoide. Funções sigmóides são crescente em todo intervalo de variação do tempo. É um tipo de função não-linear que não possui pontos extremos (máximos e mínimos), mas possui ponto de inflexão, ponto no qual ocorre a máxima taxa de variação da função, característica que mais interessa para a realização deste trabalho (FLORENTINO, BISCARO E PASSOS, 2010).

Até o ponto de inflexão, o gráfico representativo da função sigmoide apresenta concavidade para cima (derivada segunda positiva), no ponto de inflexão a função apresenta derivada segunda nula e daí em diante apresenta concavidade para baixo (derivada segunda negativa). Ver Figura 12 que apresenta as características principais das funções sigmoidais citadas acima (FLORENTINO, BISCARO E PASSOS, 2010).

**Figura 12- Representação gráfica da função sigmoide**



Fonte: Florentino, Biscaro e Passos (2010)

Para explicar a produção de hidrogênio do presente trabalho foi utilizado modelo de regressão não-linear para fazer o ajuste das curvas sigmóides obtidas após a plotagem do gráfico com os valores da produção de  $H_2$  (mol) versus o tempo (min). A regressão



não linear tem como objetivo estudar a relação entre uma variável dependente e uma ou mais variáveis independentes de funções não linearizáveis por transformação (CALBO, SILVA E TORRES, 1989).

Nesse trabalho foram utilizado os modelo de regressão não-linear de Gompertz modificado, exatamente para estudar a relação existente entre a variável dependente “y” que fornece a produção de H<sub>2</sub> acumulada (mmol), e os demais parâmetros independentes (A, xc, k, R<sup>2</sup>). A escolha do modelo utilizado levou em consideração a indicação de Ahmad (2017) e Cui e Sheng (2012), onde os dados experimentais (valores médios de reatores duplicados) obtidos foram ajustados usando a equação de Gompertz modificado (Zwietering et al., 1990) com a versão do pacote de software Origin através da equação 4.

$$H = P \cdot \exp \left\{ - \exp \left[ \frac{Rm \cdot e}{P} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (4)$$

Onde:

$P$  = Potencial de produção (mmol);

$Rm$  = Taxa de produção (mmol/dia);

$t$  = Tempo de incubação no reator (dia);

$e$  = Número de Euler (2.71828);

$\lambda$  = Fase Lag (dia).

Após o ajuste dos dados no Origin utilizando o modelo de Gompertz Modificado, em seus resultados podemos obter o valor de R<sup>2</sup>, o qual representa o quanto os dados se ajustaram ao modelo utilizado.

O coeficiente de correlação (R) foi calculado usando a equação 5:

$$R = \sqrt{R^2} \quad (5)$$

Ela representa a correlação entre as variáveis. É um número usado para classificar a correlação da seguinte forma:

- R = 1 à Perfeita
- R = 0,75 à Forte

- R = 0,5 e < 0,75 à Média
- R < 0,5 à Fraca
- R = 0 à Inexistente

#### 4.2.4 Análises de ácidos e álcoois pelo método do headspace

Nesta etapa foram identificados os subprodutos da digestão anaeróbia produzidos nos reatores, 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 Carboxen<sup>TM</sup> 1010 PLOT por uma coluna SUPELCOWAX<sup>TM</sup> 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 (H<sub>2</sub>), do make-up ou gas auxiliar (N<sub>2</sub>) 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).

Para identificar qual composto orgânico foi produzido, verifica-se o tempo de retenção de cada um deles conforme Tabela 14:

**Tabela 14 - Tempo de detenção fornecido pelo cromatograma para identificação e quantificação dos compostos orgânicos**

Substância	Tempo de retenção (min)
Acetona	2,22
Metanol	2,81
Etanol	3,18
Isobutanol	5,27
n-Butanol	5,99
Ácido acético	8,68
Ácido propiônico	9,54
Ácido isobutírico	9,83
Ácido butírico	10,44
Ácido isovalérico	10,89
Ácido valérico	11,62

---

Ácido crotonico	12,04
Ácido caproico	12,76

---

Fonte: Adaptado de HIRASAWA; ADORNO; VARESCH, (2009)

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização do bagaço de cana-de açúcar e lodo da ete

O bagaço de cana de açúcar e o lodo de ETE, foram coletados em quantidade suficiente para o funcionamento do reator durante toda a pesquisa, e devidamente caracterizado. Os resultados estão apresentados nas Tabelas 15 e 16.

**Tabela 15- Caracterização do bagaço de cana-de açúcar “in natura”**

pH	Sólidos Suspensos	Sólidos Suspensos	Sólidos Suspensos	Carboidratos	DQO
	Totais (mg/L)	Fixos (mg/L)	Voláteis (mg/L)	(mg/L)	(mg/L)
5,86	168000	3000	165000	3559,916	5742,87

Fonte: Autora, 2017

**Tabela 16- Caracterização do lodo da ETE**

pH	Sólidos Suspensos	Sólidos Suspensos	Sólidos Suspensos	Carboidratos	DQO
	Totais (mg/L)	Fixos (mg/L)	Voláteis (mg/L)	(mg/L)	(mg/L)
6,92	161000	1285,7	159714,28	679,65	20896,04

Fonte: Autora, 2018

Esses parâmetros serviram para comparação e conclusão de diversos fatores, como é o caso dos carboidratos, que nos indica se o pré-tratamento básico desestruturou a formação do bagaço aumentando a concentração de carboidratos para serem consumidos pelos micro-organismos, e assim, produzir a maior concentração de hidrogênio no reator.

O SSV, o qual depende do SST e SSF, nos forneceu, conforme a Equação 3 uma ideia sobre o crescimento da comunidade microbológica aderida à biomassa presente nos reatores (consumo de carboidratos), nos informando a quantidade de inóculo necessário em um reator anaeróbio para consumir a matéria orgânica presente no mesmo.

Quanto ao pH, em torno de 5,86 e 6,92, algumas pesquisas mostram que o pH otimizado para produção de hidrogênio está na faixa de 5,0 e 6,5 (FANG; LIU E ZHANG, 2002; LIN E CHANG 2004; MIZUNO et al., 2002) sendo o pH em torno de 5,5 relacionado aos melhores rendimentos de produção de H<sub>2</sub> (CHAIRATTANAMANOKORN et al. 2011; LIU E FANG, 2002; MU et al., 2007; SHIN 2007). O pH dentro da faixa supracitada favorece a atividade das enzimas envolvidas no processo de produção do H<sub>2</sub>, bem como permite a inibição dos micro-organismos

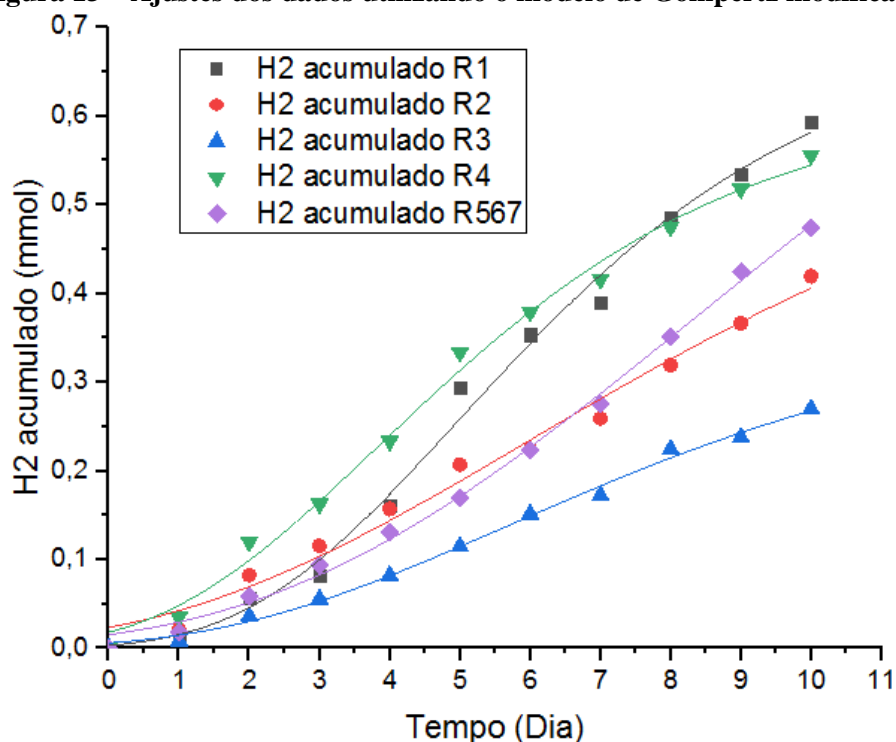
consumidores de  $H_2$  presentes no meio fermentativo (LI E FANG, 2007; VALDEZ-VAZQUEZ E POGGI-VARALDO, 2009).

## 5.2 Estudo dos dados cinéticos de Gompertz Modificado nos reatores – Etapa 1

Na Etapa 1 do experimento, onde foram avaliados os fatores: massa de substrato e % de inóculo, observamos que os reatores que apresentaram os melhores resultados na produção acumulada de  $H_2$ , conforme a Figura 15, foram para os reatores R1 (0,5g de bagaço e 10% de lodo de ETE) com 0,59 mmol de  $H_2$  acumulado, e o reator R4 (1,0g de bagaço e 20% de lodo de ETE) com 0,55 mmol de  $H_2$  acumulado.

Ratti et al (2014) estudou proporções de massa de substrato e inóculo de 1:1 em todos os 6 sistemas, comparando os resultados da Figura 13, observamos que a proporção influencia na produção, onde para os três maiores resultados (R1, R4 e R567) a proporção também foi de 1:1, enquanto que para os reatores R2 e R3 a proporção foi de 3:1 e 1:3.

**Figura 13 – Ajustes dos dados utilizando o modelo de Gompertz modificado**



Legenda: R1(m=0,5g de bagaço, inóculo=5mL); R2(m=1,5g de bagaço, inóculo=5mL); R3(m=0,5g de bagaço, inóculo=15mL); R4(m=1,5g de bagaço, inóculo=15ml); R567(m=1,5g de bagaço, inóculo=10ml).

Fonte: Autora (2018)

Com os dados cinéticos encontrados pelo Origin 2018b utilizando o modelo de Gompertz Modificado, como recomenda Ahmad (2017), tivemos as maiores taxas de produção de H<sub>2</sub> para os reatores R567 (2,5 mmol/dia) e R1 (2,0 mmol/dia), conforme nos mostra a Tabela 21.

A fase Lag, representada por X<sub>c</sub>, conforme Tabela 21, é a fase de adaptação ao novo meio, onde os microrganismos consomem carboidratos para seu crescimento. As menores fase Lag, ocorreram para os reatores R2 e R3 com 1,12 e 0,83 h respectivamente. Para o reator R1 o qual apresentou a melhor produção de H<sub>2</sub> acumulada, sua fase lag foi de 2,07 h. Vale ressaltar que para os reatores que apresentaram a menor fase lag (R2 e R3), não foram suficientes para serem os melhores reatores em produção de hidrogênio, como já explicado no item anterior, isso deve-se ao fato de que o reator tinha muito microrganismo para pouca fonte de carboidrato no meio, 0,5g e 1,5 de substrato e 10 e 30% de lodo, onde a maior parte de carboidrato foi direcionado apenas para o crescimento do microrganismo, ficando a produção de hidrogênio desfavorecida para estes reatores, o que confirma a baixa produção acumulada na Figura 13.

Para todos os reatores, com o ajuste do modelo, obtivemos um coeficiente de correlação (R) entre as variáveis perfeita, conforme Tabela 17, o que nos mostra que as variáveis estudadas interferem juntas perfeitamente na produção de hidrogênio.

Avaliando a produção específica dos reatores dessa etapa, confirmamos de acordo o apontado na produção acumulada e taxa de produção, que a maior produção específica, conforme Figura 15, foram para os reatores R1 e R567, com 2,51 e 1,58 mmolH<sub>2</sub>/gSSVdia, respectivamente. Isso nos mostra, que quanto maior a fase lag, maior será a taxa de produção de hidrogênio por dia e maior será a produção específica de hidrogênio, ou seja, a produção específica de hidrogênio depende do crescimento microbiano no meio, onde representa a capacidade que uma determinada comunidade microbiológica em converter o substrato em gás, para comparação de sistemas, no nosso caso, os melhores sistemas foram os reatores R1 e R567.

**Tabela 17 - Dados cinéticos do modelo de Gompertz Modificado nos reatores – Etapa 1**

Constantes	R1	R2	R3	R4	R567
<b>Xc (hora)</b>	2,16	1,2	0,72	1,92	1,44
<b>K (mmol/dia)</b>	2,01	0,97	1,69	0,80	2,53
<b>R<sup>2</sup></b>	0,99	0,99	1,00	0,99	1,00
<b>R</b>	0,99	0,99	1,00	0,99	1,00
<b>PeH<sub>2</sub> (mmolH<sub>2</sub>/gSSVdia)</b>	2,51	1,21	0,7	0,33	1,58

Fonte: Autora (2018)

### 5.2.1 Planejamento fatorial

A Tabela 18 apresenta a saída do Statistic 7 para a ANOVA, referente à produção de hidrogênio utilizando bagaço de cana-deaçúcar, usada para determinar ao nível de 5% de significância se as médias foram ou não significativamente diferentes entre si.

Tabela 18 - Análise de variância (ANOVA)

Fontes de Variação	G.L	Soma Quadrática (SQ)	Quadrado Médio Ajustado (QM <sub>aj</sub> )	p- valor
<b>A – Massa de substrato (g)</b>	1	0,003025	0,003025	0,569
<b>B - % de inóculo</b>	1	0,009025	0,009025	0,364
<b>AB - Interação Massa x pH</b>	1	0,050625	0,050625	0,109
<b>Falta de ajuste</b>	1	0,000430	0,000430	0,823
<b>Puro Erro</b>	2	0,013267	0,006633	
<b>Total</b>	6	0,076371		
		$R^2 = 82,07$		

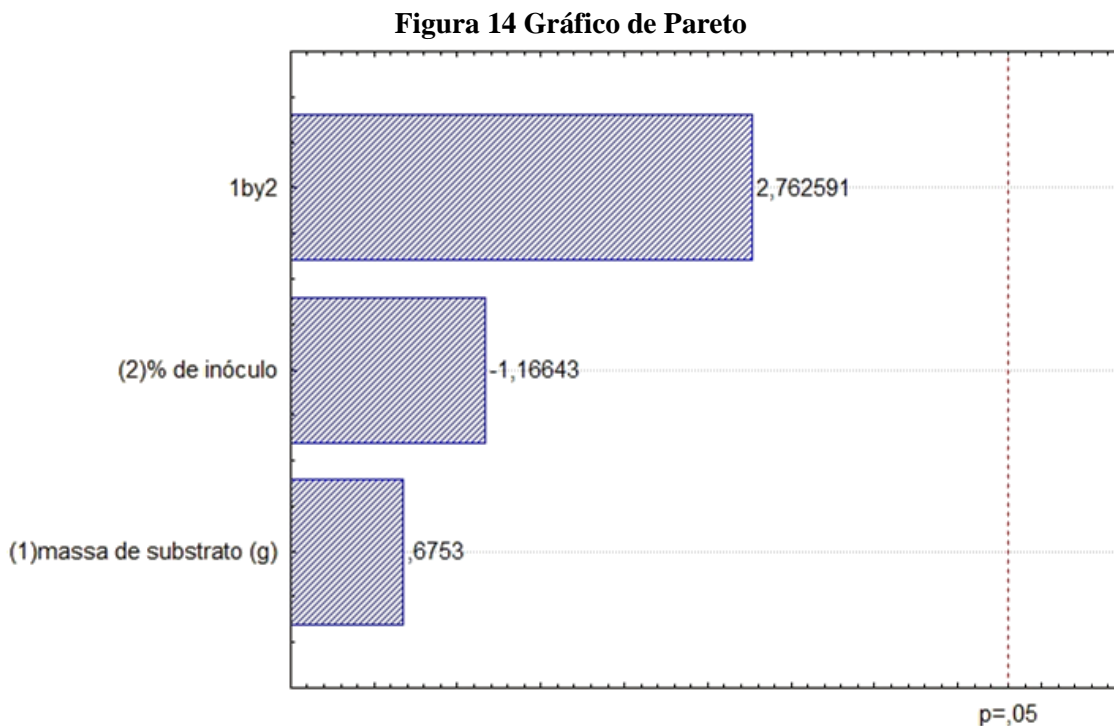
LEGENDA: G.L: Graus de liberdade.

Fonte: Statistic 7

A ANOVA apresentou para os fatores, massa de substrato e % de inóculo (fatores A, B e AxB) o valor de  $p$  igual a 0,569, 0,364 e 0,109 que é maior que 0,05. Pode-se afirmar, então, com 95 % de confiança, que as médias são iguais entre si. Portanto, não influenciaram na variável resposta (Produção de H<sub>2</sub>). Isso significa que, para o intervalo estudado nos fatores não há qualquer influência na variável resposta. Como não obteve curvatura, o modelo a ser adotado não deve ser o quadrático e sim o linear, conforme a Equação 6.



A Figura 14 apresenta o gráfico de pareto que mostra a significância dos fatores em relação a probabilidade normal dos efeitos, em que todos os fatores e a interação foram não significativos, confirmando a Tabela 18.



Fonte: Statistic 7

A partir da ANOVA e do gráfico de probabilidade pode-se obter o modelo que está expresso na Equação 6:

$$\hat{Y}(H_2) = 0,4643 + 0,0275 * \text{Massa} - 0,0475 * \% \text{ de inóculo} + 0,1125 * \text{Massa} * \% \text{ de inóculo}$$

(6)

Segundo a Tabela 18, o valor do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi igual a 82,07%, dessa forma 82,07% dos dados são explicados pelo modelo.

Substituindo os níveis das massas e das % de inóculos de cada ensaio (-1 e -1; +1 e -1; -1 e +1; +1 e +1) no modelo encontrado representado pela Equação 6, as melhores condições previstas pelo modelo foi para o ensaio 1, onde  $\hat{Y}_1 = 60\%$ , o que significa que as melhores condições para produção de  $H_2$  foi para o reator R1 massa de substrato de 0,5g e % de inóculo de 10%, confirmando o melhor resultado exposto no item anterior.

### 5.3 Estudo dos dados cinéticos de Gompertz Modificado nos reatores - Etapa 2

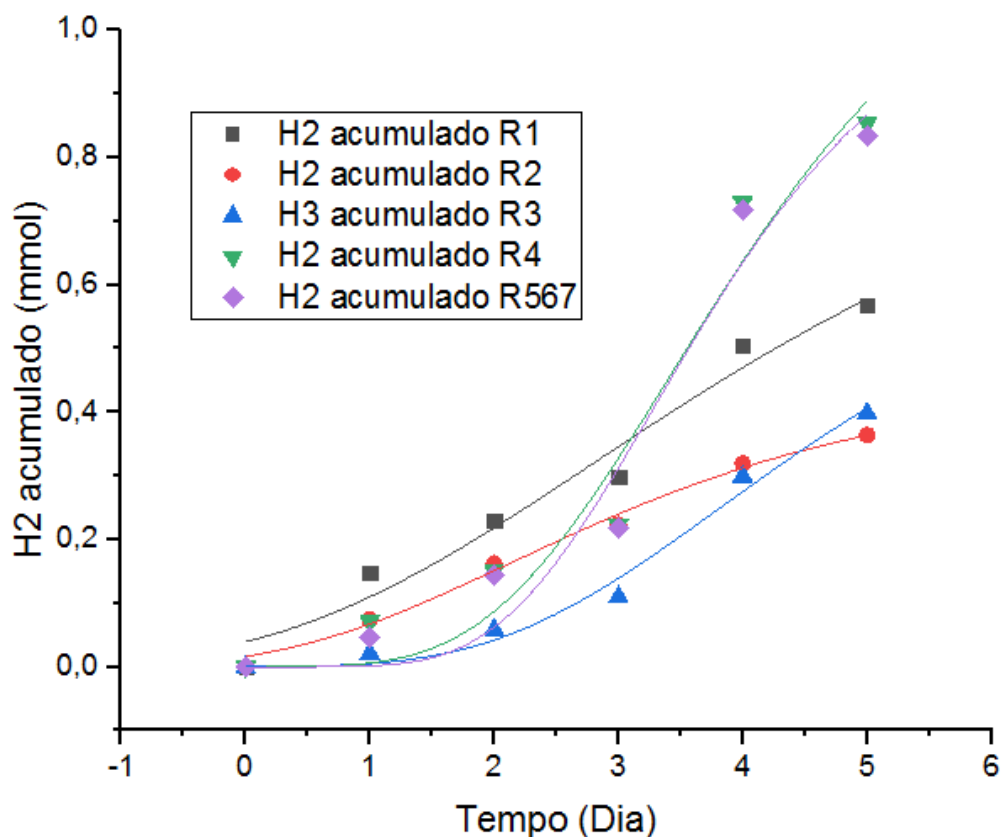
Para esta Etapa 2, foi fixado os fatores: massa de bagaço e porcentagem de inóculo, confirmados como melhores resultados de acordo com a etapa anterior, o qual para esta etapa fixaremos para todos os reatores:  $m=0,5\text{g}$  de bagaço e 10% (5mL) de lodo de ETE, os fatores que foram avaliados: tempo de aquecimento da pré-hidrólise (0, 30 e 60 min) e pH inicial (5, 6 e 7).

Conforme a Figuras 14, observamos que os reatores que apresentaram os melhores resultados na produção acumulada de  $\text{H}_2$ , foram para os reatores R4 com 0,85 mmol de  $\text{H}_2$  acumulado, e o reator R567 com 0,83 mmol de  $\text{H}_2$  acumulado, para o R1, que obteve a 3ª maior produção, alcançando 0,57 mmol de  $\text{H}_2$  acumulado.

Os reatores R2 e R3 tiveram a menor produção de acumulado, 0,36 e 0,39 mmol. De acordo com Schuchardt et al., (2001), durante a quebra da lignina alguns compostos podem ser formados: Compostos aromáticos, benzeno, fenol, ácido acético e vanilina, obtenção de óleos com características semelhantes ao petróleo, produção de resinas fenol-formaldeído, dispersantes, emulsificantes, sequestrantes de metais, adesivos, aglomerantes, obtenção de gás de síntese utilizado na produção de metanol, dependendo do método de extração, com isso, a produção de hidrogênio fica desfavorecida.

Braga et al. (2014), Ratti et al. (2014) e Soares et al. (2014) alcançaram produções de  $\text{H}_2$  de 0,23, 7,7 e 0,09 mmol respectivamente, comparando com os nossos resultados podemos observar que a maior produção alcançada (0,85 mmol) se mostrou dentro do esperado considerando que o substrato é o mesmo.

Figura 15 – Ajustes dos dados utilizando o modelo de Gompertz modificado



Legenda: R1(Tempo de aquecimento da pré-hidrólise=0 min, pH inicial=5); R2(Tempo de aquecimento da pré-hidrólise=60 min, pH inicial=5); R3(Tempo de aquecimento da pré-hidrólise=0 min, pH inicial=7); R4(Tempo de aquecimento da pré-hidrólise=60 min, pH inicial=7); R567(Tempo de aquecimento da pré-hidrólise=30 min, pH inicial=6).

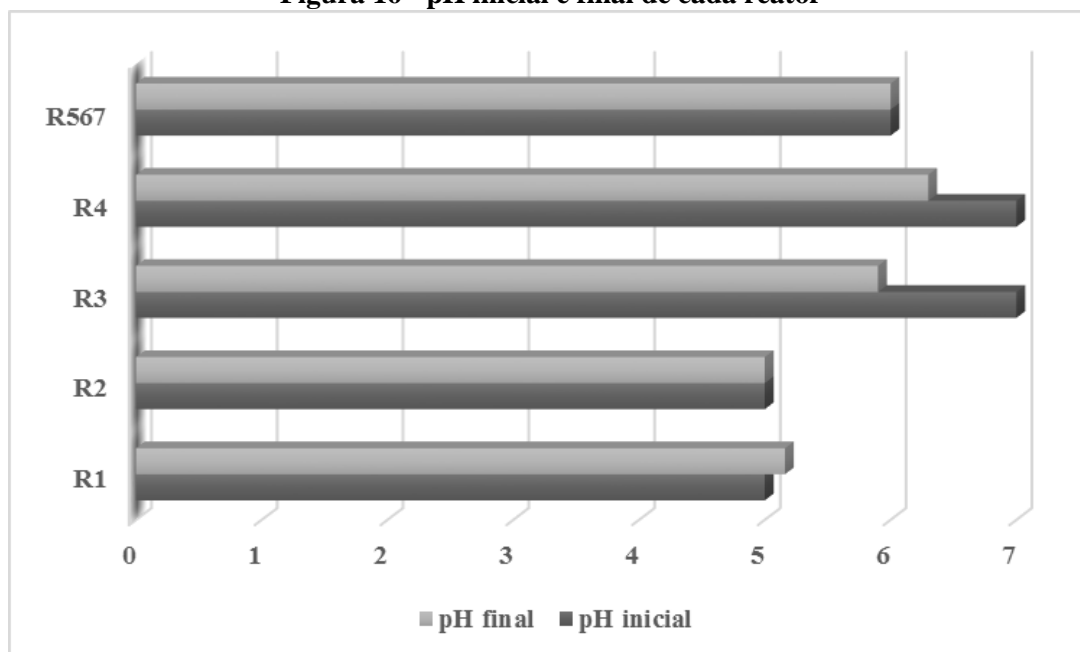
Fonte: Autora (2018)

Observando a influência dos fatores para os reatores que mais produziram hidrogênio acumulado, para os reatores R4, R567 e R1, os tempos de aquecimento na pré-hidrólise foram de 60, 30 e 0 min respectivamente, o que comprova que para este fator estudado, quanto maior o tempo de aquecimento maior será a produção de H<sub>2</sub>, outro fator estudado como influenciador na produção de H<sub>2</sub> foram os pHs iniciais, é possível perceber após a realização do experimento, que a produção de H<sub>2</sub> está bastante relacionada com os valores de pH dos reatores, que ficaram entre 5,0 e 7,0 (valores médios de pH), demonstrando ser a faixa ideal para promover o consumo do substrato devido ao aumento da taxa de fermentação anaeróbia provocado por esses valores de pHs, valores estes que estão de acordo com Infantes et al. (2011), pois as bactérias que realizam as quatro fases da digestão, possuem exigências individuais quanto ao pH. Para os reatores que melhor apresentaram produção, o pH inicial e final foram: 7/6,3, 6/6 e 5/5,2 respectivamente,

confirmando assim, que o parâmetro pH também é um dos principais interferentes na produção de hidrogênio a partir da digestão anaeróbia, uma vez que valores abaixo de 4,0 inibem a atividade da hidrogenase, e conseqüentemente a produção de H<sub>2</sub> e valores altos como 9,0 também causam queda na produção específica do H<sub>2</sub> (ZHANG et al., 2008).

O pH ideal para as hidrolíticas e fermentativas varia de 4,5 – 6,3 (BACKES, 2011). No entanto o pH pode sofrer alterações durante o processo de digestão, devido aos metabolitos que se acumulam no sistema fazendo com que o meio fique mais ácido ou alcalino (CAMPOS et al., 2006), conforme podemos observar a mudança dos pHs iniciais e finais na Figura 15.

**Figura 16 - pH inicial e final de cada reator**



Fonte: Autora (2018)

Na Etapa 2 do experimento, avaliamos os fatores: tempo de aquecimento (min) no pré-tratamento e pH inicial, e plotamos o gráfico no Origin 2018b utilizando o modelo de Gompertz Modificado para ajustar nossos dados experimentais, obtivemos as maiores taxas de produção de H<sub>2</sub> para os reatores R567 (2,07 mmol/dia), R3 (2,04 mmol/dia) e R4 (1,97 mmol/dia), conforme nos mostra a Tabela 22.

Para todos os reatores, com o ajuste do modelo, obtivemos um coeficiente de correlação (R) entre as variáveis forte a perfeita, conforme Tabela 18, o que nos mostra que as variáveis estudadas interferem juntas perfeitamente na produção de hidrogênio.

Avaliando a produção específica dos reatores dessa etapa, as maiores produções específicas, conforme Figura 16, foram para os reatores R567, R3 e R4 e, com 2,59, 2,55 e 2,46 mmolH<sub>2</sub>/gSSVdia, respectivamente. Observando a fase lag desses reatores, nos mostra, que quanto maior a fase lag (7,92, 3,36 e 7,68 h), maior será a taxa de produção de hidrogênio por dia e maior será a produção específica de hidrogênio, ou seja, a produção específica de hidrogênio depende do crescimento microbiano no meio, onde representa a capacidade que uma determinada comunidade microbiológica em converter o substrato em gás.

Utilizando a produção específica para comparação de sistemas, o reator que apresentou o melhor desempenho considerando a simultaneidade das variáveis para produção de hidrogênio, foi o reator R567, com tempo de aquecimento da pré-hidrólise=30 min e pH inicial=6.

**Tabela 19 - Dados cinéticos do modelo de Gompertz Modificado nos reatores – Etapa 2**

Constantes	R1	R2	R3	R4	R567
<b>Xc (hora)</b>	3,12	2,16	3,36	7,68	7,92
<b>K (mmol/dia)</b>	0,33	0,34	2,04	1,97	2,07
<b>R<sup>2</sup></b>	0,97	0,99	0,98	0,96	0,96
<b>R</b>	0,98	0,99	0,99	0,98	0,98
<b>PeH<sub>2</sub> (mmolH<sub>2</sub>/gSSVdia)</b>	0,41	0,43	2,55	2,46	2,59

Fonte: Autora (2018)

### 5.3.1 Planejamento fatorial

A Tabela 20 apresenta a saída do Statistic 7 para a ANOVA, referente à produção de hidrogênio utilizando bagaço de cana-de-açúcar, usada para determinar ao nível de 5% de significância se as médias foram ou não significativamente diferentes entre si.

Tabela 20 - Análise de variância (ANOVA)

Fontes de Variação	G.L	Soma Quadrática (SQ)	Quadrado Médio Ajustado (QM <sub>aj</sub> )	p- valor
<b>A – Tempo de aquecimento na pré-hidrólise (min)</b>	1	0,0169	0,0169	0,733
<b>B – pH inicial</b>	1	0,0256	0,0256	0,677
<b>AB - Interação Tempo x pH</b>	1	0,1089	0,1089	0,424
<b>Falta de ajuste</b>	1	0,0289	0,0289	0,659
<b>Puro Erro</b>	2	0,2198	0,1099	
<b>Total</b>	6	0,4002		
		$R^2 = 37,83$		

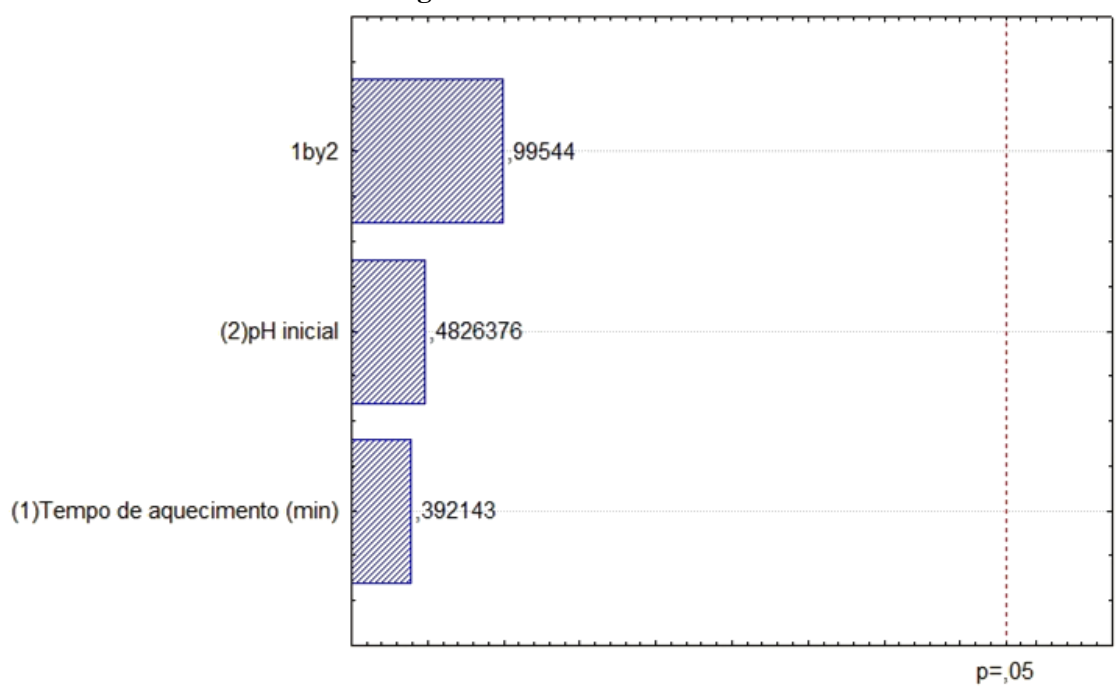
LEGENDA: G.L: Graus de liberdade.

Fonte: Statistic 7

A ANOVA apresentou para os fatores, tempo de aquecimento na pré-hidrólise e pH inicial (fatores A, B e AxB) o valor de  $p$  igual a 0,733, 0,677 e 0,424 que é maior que 0,05. Pode-se afirmar, então, com 95 % de confiança, que as médias são iguais entre si. Portanto, não influenciaram na variável resposta (Produção de H<sub>2</sub>). Isso significa que, para o intervalo estudado nos fatores não há qualquer influência na variável resposta. Como não obteve curvatura, o modelo a ser adotado não deve ser o quadrático e sim o linear, conforme a Equação 7.

A Figura 17 apresenta o gráfico de pareto que mostra a significância dos fatores em relação a probabilidade normal dos efeitos, em que todos os fatores e a interação foram não significativos, confirmando a Tabela 20.

Figura 17 Gráfico de Pareto



Fonte: Statistic 7

A partir da ANOVA e do gráfico de probabilidade pode-se obter o modelo que está expresso na Equação 7:

$$\hat{Y}(H_2) = 0,484286 + 0,065 * \text{Tempo} + 0,08 * \text{pH} + 0,165 * \text{Tempo} * \text{pH} \quad (7)$$

Segundo a Tabela 20, o valor do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi igual a 37,83%, dessa forma 37,83% dos dados são explicados pelo modelo.

Substituindo os níveis dos tempos de aquecimentos e do pH inicial de cada ensaio (-1 e -1; +1 e -1; -1 e +1; +1 e +1) no modelo encontrado representado pela Equação 7, as melhores condições previstas pelo modelo foi para o ensaio 4, onde  $\hat{Y}_4 = 80\%$ , o que significa que as melhores condições para produção de  $H_2$  foi para o reator R4 tempo de aquecimento de 60min e pH inicial 7, o que não confirma o melhor resultado exposto no item anterior que seria o reator R567, isso explica-se pelo fato de o modelo para esta parte 2 não ser tão confiável, visto que o modelo explica apenas 37,83% dos dados, o que não podemos considerar um modelo representativo.

#### 5.4 Metabólitos solúveis produzidos

Durante a acidogênese dos açúcares, vários metabólitos foram produzidos junto com o hidrogênio, em diferentes concentrações. Após a realização da etapa da cromatografia para analisar e quantificar a presença de ácidos e álcoois via headspace, foi possível chegar à algumas conclusões a partir dos resultados mostrados na Tabela 19, onde são expostas as concentrações médias em  $\text{mg.L}^{-1}$  dos metabólitos solúveis produzidos nos reatores.

Os principais subprodutos gerados nesse trabalho foram: ácido acético, ácido propiônico, etanol e metanol. A presença do ácido propiônico como o segundo metabólito em maior quantidade nas amostras verificadas (R2 e R567), indica que o pré-tratamento básico pode ter relação com a formação deste, e que o aprimoramento de técnicas para controlar esses inibidores é necessário, confirmando estudos realizados por Siqueira e Reginatto (2015).

Em todos os reatores o metabólito produzido em maior quantidade foi o ácido acético, reator R567 com 1374,20  $\text{mg/L}$ , em seguida o R2 1162,10  $\text{mg/L}$ , e em terceiro o R4 com 1083,91  $\text{mg/L}$ . O que é um fator importante por indicar que a rota fermentativa utilizada pelos microrganismos para a produção de hidrogênio foi a do ácido acético, proporcionando o maior rendimento possível de  $\text{H}_2$  por mol de glicose, quando comparada às rotas do etanol, ácido butírico e ácido propiônico (ANTONOPOULOU et al. 2008).

Andrade (2017), Tavares (2016) e Chaves (2018), também concluíram que em seus metabólitos, a maior produção também foi para o ácido acético chegando a alcançar concentrações de 445 a 2329  $\text{mg/L}$ .

Segundo Reis (2010) quanto maior a formação de ácido acético maior será a quantidade de hidrogênio obtido, pois ele é um indicador, já que a produção desse ácido leva a formação de 4 mol de hidrogênio por mole de glicose conforme a Equação 6.

Produção do ácido acético:





**Tabela 21 - Concentrações médias, em mg/L, dos metabólitos solúveis produzidos nos reatores.**

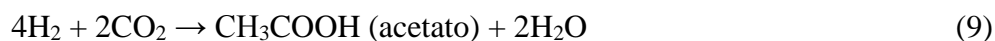
Metabólitos	R1	R2	R3	R4	R567
	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L
Acetona	21,53	0,00	0,00	0,00	0,00
Metanol	79,88	33,71	34,49	33,73	34,63
Etanol	79,13	26,46	83,29	39,51	36,46
n-Butanol	24,49	13,12	13,21	13,04	13,23
Ácido acético	<b>478,41</b>	<b>1162,10</b>	<b>660,42</b>	<b>1083,91</b>	<b>1374,20</b>
Ácido propiônico	0,00	56,92	0,00	0,00	59,45
Ácido isobutírico	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Ácido butírico	0,00	0,00	76,09	0,00	0,00
Ácido isovalérico	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Ácido valérico	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Ácido capróico	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

<sup>(a)</sup>LD<sub>1</sub> – Limite de detecção da acetona = 14,9 mg/L; <sup>(b)</sup>LD<sub>2</sub> – Limite de detecção do metanol = 19,3 mg/L; <sup>(c)</sup>LD<sub>3</sub> – Limite de detecção do etanol = 15,6 mg/L; <sup>(d)</sup>LD<sub>4</sub> – Limite de detecção do n-butanol = 12,0 mg/L; <sup>(e)</sup>LD<sub>5</sub> – Limite de detecção do ácido acético = 63,8 mg/L; <sup>(f)</sup>LD<sub>6</sub> – Limite de detecção do ácido propiônico = 49,3 mg/L; <sup>(g)</sup>LD<sub>7</sub> – Limite de detecção do ácido isobutírico = 54,6 mg/L; <sup>(h)</sup>LD<sub>8</sub> – Limite de detecção do ácido butírico = 51,9 mg/L; <sup>(i)</sup>LD<sub>9</sub> – Limite de detecção do ácido isovalérico = 54,9 mg/L; <sup>(j)</sup>LD<sub>10</sub> – Limite de detecção do ácido valérico = 62,4 mg/L; <sup>(k)</sup>LD<sub>11</sub> – Limite de detecção do ácido caproico = 11,1 mg/L.

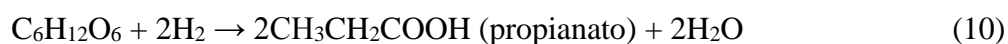
Fonte: Autora (2018)

Observando a Tabela 20 e a Figura 16, verificamos que para o R4 apresentou a maior porcentagem em moles (89,64%) de ácido acético, juntamente com R567(88,91%). O R2 que obteve 88,27% de ácido acético, a terceira maior porcentagem, deve-se ao fato de que, apesar da rota do ácido acético ser a mais favorável quando se tem como objetivo produzir o hidrogênio, precisamos ter cuidado com a homoacetogênese, onde os microrganismos homoacetogênicos, que resistiram ao tratamento térmico do inóculo consomem o hidrogênio e o gás carbônico para produzir o ácido acético, e devido às suas altas concentrações, se torna um inibidor da fermentação, desfavorecendo o objetivo do trabalho, conforme equações 8 e 9 (ARGUN et al. 2008).





Como também pode ser justificada pela presença da concentração do ácido propiônico, que atingiu seu ápice (3,5 %) no R2, também pode ter contribuído para a diminuição da sua eficiência em relação aos outros reatores, pois na rota fermentativa deste metabólito são consumidos 2 mols de  $\text{H}_2$  para produzir 2 mols do mesmo como nos mostra a equação 10 (LEVIN et al. 2004; VARDAR et al. 2007).



Já para o R1, apresentou a menor produção de ácido acético (61,86%), além de observar que houve uma grande produção de metanol (19,36%) e etanol (13,34%) para este reator em relação aos outros reatores, o que nos leva a entender que também foi utilizada a rota do etanol, o mesmo comportamento podemos observar para o R3 com 73,69% de ácido acético, e produção de metanol (7,21%) e etanol (12,11%).

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 23 e na Figura 16 as concentrações molares médias produzidos nos reatores e a porcentagem molar de cada um em relação aos metabólitos totais produzidos (SMPs).

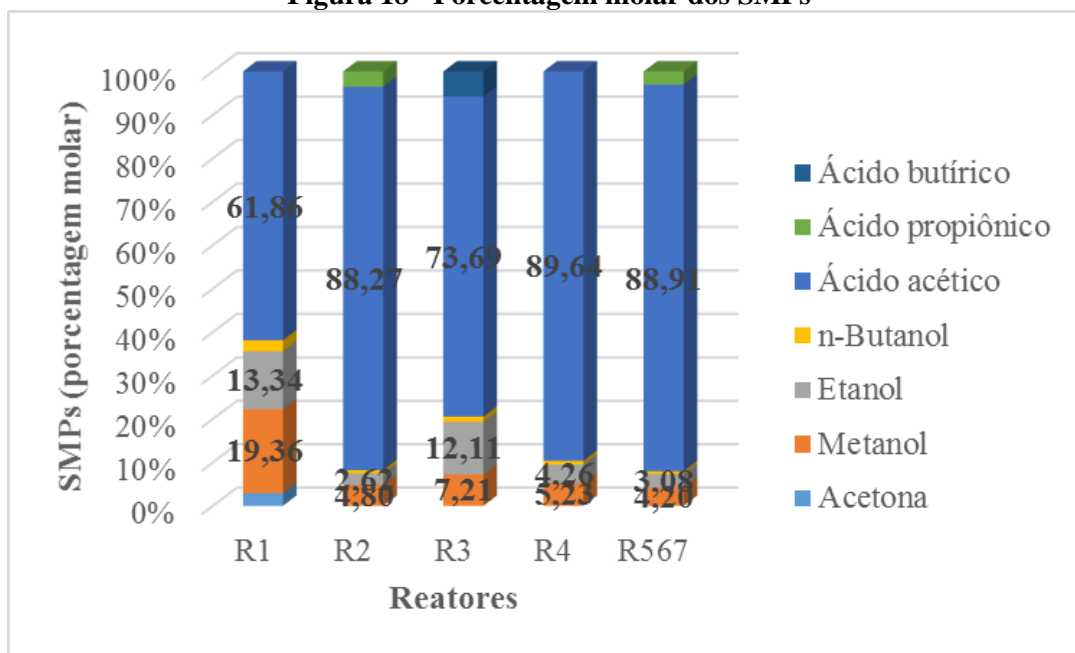
Tabela 22 - Concentração molar, em mmol/L, e porcentagem dos metabólitos produzidos nos reatores

Metabólitos	R1		R2		R3		R4		R567	
	C(mmol/L)	%	C(mmol/L)	%	C(mmol/L)	%	C(mmol/L)	%	C(mmol/L)	%
<b>Acetona</b>	0,37	2,88	---	---	---	---	---	---	---	---
<b>Metanol</b>	2,49	19,36	1,05	4,80	1,08	7,21	1,05	5,23	1,08	4,20
<b>Etanol</b>	1,72	13,34	0,57	2,62	1,81	12,11	0,86	4,26	0,79	3,08
<b>n-Butanol</b>	0,33	2,57	0,18	0,81	0,18	1,19	0,18	0,87	0,18	0,69
<b>Ácido acético</b>	<b>7,97</b>	<b>61,86</b>	<b>19,35</b>	<b>88,27</b>	<b>11,00</b>	<b>73,69</b>	<b>18,05</b>	<b>89,64</b>	<b>22,88</b>	<b>88,91</b>
<b>Ácido propiônico</b>	---	---	0,77	3,50			---	---	0,80	3,05
<b>Ácido butírico</b>	---	---	---	---	0,86	5,79	---	---	---	---
<b>SMP</b>	<b>12,88</b>	<b>100,00</b>	<b>21,92</b>	<b>100,00</b>	<b>14,92</b>	<b>100,00</b>	<b>20,14</b>	<b>100,00</b>	<b>25,74</b>	<b>100,00</b>

SMP = metabólitos solúveis totais produzidos.

Fonte: Autora (2018)

**Figura 18 - Porcentagem molar dos SMPs**



Fonte: Autora (2018)

## 6 CONCLUSÕES

Há uma grande influência na proporção de massa de substrato e % de inóculo para a produção de hidrogênio, onde a melhor proporção é 1:1.

A produção específica dos reatores da etapa 1, confirmou que o reator R1 (0,5g de bagaço e 10% de lodo de ETE), com 2,51 mmolH<sub>2</sub>/gSSVdia, apresentou a melhor capacidade microbiológica para converter o substrato em H<sub>2</sub>, sendo considerado o melhor resultado nesta etapa.

Na etapa 2, os reatores que apresentaram os melhores resultados na produção acumulada de H<sub>2</sub>, foram para os reatores R4 com 0,85 mmol de H<sub>2</sub> acumulado, e o reator R567 com 0,83 mmol de H<sub>2</sub> acumulado

Utilizando a produção específica para comparação de sistemas, o reator que apresentou o melhor desempenho considerando a simultaneidade das variáveis para produção de hidrogênio, foi o reator R567, com tempo de aquecimento da pré-hidrólise=30 min e pH inicial=6.

De acordo com o coeficiente de correlação entre as variáveis, para todos os reatores a interferência dos fatores é de forte a perfeita.

Conforme a ANOVA realizada, para as duas etapas, as médias dos fatores foram não significativa, isso significa que o intervalo dos fatores estudados não interfere na variável resposta, para isso, o intervalo deve ser ampliado para que as médias sejam diferentes.

Os principais subprodutos gerados nesse trabalho foram: ácido acético, etanol e metanol. Em todos os reatores o metabólito produzido em maior quantidade foi o ácido acético. O que indica que a rota fermentativa utilizada pelos microrganismos para a produção de hidrogênio foi a do ácido acético, proporcionando o maior rendimento possível de H<sub>2</sub> por mol de açúcar, quando comparada as outras rotas.

O R4 obteve a maior porcentagem em moles (89,64%) de ácido acético, juntamente com R567 (88,91%).

O R2 que obteve 88,27% de ácido acético, a terceira maior porcentagem, apresentou uma das menores produções específicas de hidrogênio, isso deve-se ao fato de que, apesar da rota do ácido acético ser a mais favorável quando se tem como objetivo produzir o hidrogênio, precisamos ter cuidado com a homoacetogênese. A presença da concentração do ácido propiônico neste reator, que atingiu seu ápice (3,5%), também pode

ter contribuído para a diminuição da sua eficiência em relação aos outros reatores, pois na rota fermentativa deste metabólito são consumidos 2 mols de  $H_2$  para produzir 2 mols do mesmo.

Os reatores R1 e R3, por apresentarem uma grande presença de etanol (13,34%/12,11%) e metanol (19,36%/7,21%) além do ácido acético (61,86%/73,69) nos leva a entender que a rota do etanol também foi utilizada.

O pH foi também um influenciador nos metabólitos, visto que o nosso melhor resultado, foi para o reator R567 com pH inicial/final de 6/6 respectivamente, pois pH abaixo de 6 favorece a formação de ácido acético e conseqüentemente a produção de  $H_2$ ;

Como as melhores condições avaliadas para este projeto, os melhores fatores foram: massa de substrato de 0,5g, 10% de inóculo, pH inicial de 6 e tempo de aquecimento na pré-hidrólise de 30 min.

## 7 SUGESTOES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Ampliar o intervalo dos fatores estudados;
- ✓ Estudar a produção de hidrogênio em reator batelada a partir do pré-tratamento ácido;
- ✓ Estudar a produção de hidrogênio em reator batelada a partir do bagaço da cana de açúcar com a utilização de diferentes fontes de inóculo;
- ✓ Analisar após o pré-tratamento básico e ácido e operação do reator, a porcentagem de lignina, hemicelulose e celulose no material lignocelulósico;
- ✓ Estudar com as condições ótimas encontradas (massa de substrato, % de inóculo, pH inicial e tempo de aquecimento na pré-hidrólise) para outros tipos de biomassa lignocelulósica.

## REFERÊNCIAS

AÇMA, H. H. Combustion characteristics of different biomass materials. **Energy Conversion e Management**. Istambul: pergamon, v. 44, p. 155-162, 2003.

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.

AHMAD, F. **Methane production in response to sulfuric acidic and hydrogen peroxide assisted hydrothermal pretreatment of sugarcane bagasse**. 2017. 224f. Tese. Universidade de São Paulo, São Carlos. 2017.

AIRES, A. M. A. **Biodigestão anaeróbia da cama de aviários de corte com ou sem separação das frações sólida e líquida**. 2009. 134f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)–Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2009.

ALVES, M.; ABREU, Â. **Produção de Hidrogênio a partir de resíduos**. Universidade do Minho, Portugal, 2006.

ANDRADE, S. L. P. **Produção biológica de hidrogênio a partir de biomassa lignocelulósica**. Dissertação. Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2017.

ANGELIDAKI, I. et al.. Thermophilic anaerobic digestion of livestock waste: the effect of ammonia. **Appl Microbiol Biotechnol**, n. 38, p. 560-564, 1993.

ANTONOPOULOU, G.; STAMATELATOU, K.; VENETSANEAS, N.; KORNAROS, M.; LYBERATOS, G.; **Ind. Eng. Chem. Res.** 47, 5227. 2008.



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.

AQUINO, S. F et al. Metodologias para determinação da Atividade Metanogênica Específica (AME) em Lodos Anaeróbios. **Revista Engenharia e Sanitária Ambiental**, v.12, n. 2, p. 192-291, 2007.

ARGUN, H.; KARGI, F.; **Int. J. Hydrogen Energy** 35, 1604. 2010.

BALAT, H.; KIRTAY, E.; **Int. J. Hydrogen Energy**. 35, 7416. 2010.

BARCELOS, B. R. **Avaliação de diversos inoculos na digestão anaeróbia da fração orgânica de resíduos sólidos orgânicos domésticos**. 2009. 7f. Dissertação (mestrado em engenharia civil)– Faculdade de engenharia civil e ambiental da Universidade de Brasília, 2009.

BATSTONE, D. J. et al.. Modelling anaerobic degradation of complex wastewater. II: parameter estimation and validation using slaughterhouse effluent. **Bioresource Technology**, n. 75, p. 75-85, 2000.

BECKERS, L.; HILIGSMANN, S.; HAMILTON, C.; MASSET, J.; THONART, P.; **Bio-technology Agronomie Societe et Environmental**, 14, 541. 2010.

BERBEROGLU, H.; JAY, J.; PILON, L.; **Int. J. Hydrogen Energy**, 33, 1172. 2008.

BOXMA, B.; DE GRAAF, R. M.; VAN DER STAAY, G. W. M; VAN ALEN, T. A; RICARD, G.; GABALDON, T; VAN HOEK, A. H. A. M.; MOON-VAN DER, S. T. A. A. Y. S. Y.; KOOPMAN, W. J. H; VAN HELLEMOND, J. J.; TIELENS, A. G. M; FRIEDRICH, T.; VEENHUIS, M.; HUYNEN, M. A.; HACKSTEIN, J. H. P. An anaerobic mitochondrion that produces hydrogen. **Nature**. 434 (7029): 74-79. 2005.

BRAGA, J. K.; SOARES, L. A.; VARESCHE, M. B. A. Influência da origem do inóculo na produção de hidrogênio em condição mesofílica. **1º Workshop Latino-Americano de Bio-Hidrogênio**, São Carlos - SP, Brasil, 2014.

BRASIL. Ministério de Minas e Energia. **Relatório Final do Balanço Energético Nacional**. Brasília. 296p, 2017.

BRAUNA, C. H . C. **Co-digestão anaeróbia de tortas de oleaginosas visando à produção de metano**. 2012. 157f. Tese (Doutorado em recursos hídricos e saneamento ambiental)–Programa de Pós-Graduação em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental, Universidade Federal do Ceara, 2012.

CALBO, A.G; SILVA, W.L.C; TORRES, A.C. Ajuste de funções não lineares de crescimento. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v. 1, p. 9-18, 1989.

CAMPOS, C. M.M. Desenvolvimento e operação de reator anaeróbio de manta de lodo (UASB) no tratamento dos efluentes da suinocultura em escala laboratorial. **Ciênc. agrotec. Lavras**, v. 30, n. 1, p. 140-147, 2006 . Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1413-70542006000100020&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-70542006000100020&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 21 jan 2017.

CANILHA, L.; MILAGRES, A. M. F.; SILVA, S. S.; SILVA, J. B. A.; FELIPE, M. G. A.; ROCHA, G. J. M.; CARVALHO, W.; **Rev. Anal.**, 44, 48. 2010.

CHAGANTI, S.R.; KIM, D-H.; LALMAN, J.A.; **Renewable Energy**, 48, 117. 2012.

CHAIRATTANAMANOKORN, P.; PENTHAMKEERATIA, P.; REUNGSANG, A.; CHANG, S.; LI, J-Z.; LIU, F.; **Renewable Energy**, 36, 1517. 2011.

CHANG, V. S.; HOLTZAPPLE, M. T.; **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 5, 37. 2000.

CHAVES, T. C. **Produção de hidrogênio a partir do melaço de cana-de-açúcar em reator anaeróbio de leite fluidificado**. 2018. 108f. Dissertação. Universsidade Federal de Alagoas, Maceió. 2016.

CHEN, C.C.; LIN, C.Y. Using sucrose as a substrate in an anaerobic hydrogen-producing reactor. **Advances in Environmental Research**. 7: 695-699, 2001.

CHEN, W.M.; TSENG, Z.J.; LEE, K.S.; CHANG, J.S.; **Int. J. Hydrogen Energy**, 30, 1063. 2005.

CHERNICHARO, C.A.L. et al.. **Reatores anaeróbios de manta de lodo**, In: CAMPOS, J. R. (Coord.) **Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbio e disposição controlada no solo**. Rio de Janeiro: ABES/ PROSAB,. p.155-197. 1999.

CHIN H-L, CHEN Z-S, CHOU CP. Fedbatch operation using *Clostridium acetobutylicum* suspension culture as biocatalyst for enhancing hydrogen production. **Biotechnol Prog**; 19:383–8. 2003;

CHONG, M-L.; SABARATNAM, V.; SHIRAI, Y.; HASSAN, A.; **Int. J. Hydrogen Energy**, 34, 3277. 2009.

CONVERSE, A. O.; WARE, W.; **Workshop on Applications of Biotechnology in Bioenergy Systems**, Ottawa, Canadá, 1994.

CRESPO, E. J. M. **Digestão Anaeróbia de resíduos agroalimentares: Reutilização das frações líquidas e sólidas (state-of-art)**. 2013. 92f. Dissertação (mestrado em Energia e Bioenergia)-Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de ciências e Tecnologias, Lisboa, 2013.

CUI, M; SHEN, J. Effects of acid and alkaline pretreatments on the biohydrogen production from grass by anaerobic dark fermentation. **Int. J. Hydrogen Energy**, v.37, p. 1120-1124, 2012.

DAS, D.; VEZIROGLU, T.N.; **Int. J. Hydrogen Energy**, 26, 13, 2001.

DAS, D.; VEZIROGLU, T.N.; **Int. J. Hydrogen Energy**, 33, 6046, 2008.

DAVILA-VAZQUEZ, G.; ALATRISTE-MONDRAGIN, F.; DE LEON-RODRIGUEZ, A.; RAZO-FLORES, E.; **Int. J. Hydrogen Energy**, 33,4989. 2008.

DE SÁ, L.R.V.; CAMMAROTA, M.C.; OLIVEIRA, T.C.; OLIVEIRA, E.M.M.; MATOS, A.; FERREIRA-LEITÃO, V.S.; **Int. J. Hydrogen Energy** 2013, 38, 2986.

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.

ESTÊVÃO, T. E. R. **O Hidrogénio como combustível**. Dissertação. Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, 2008.

FANG, H. H. P.; LIU, H.; ZHANG, T. Characterization of a hydrogen-producing granular sludge. **Biotechnol Bioeng**; 78: 44–52. 2002.

FANG, H.H.P.; *Environmental Anaerobic Technology: applications and new developments*, **Imperial College Press**: London, 2010.

FANG, H.H.P.; LIU, H.; **Bioresour. Technol.**, 82, 87. 2002.

FELIPE, M. G. A. Em Bioetanol de Cana-de-Açúcar: P&D para Produtividade Sustentabilidade; Cortez, L. A. B., ed.; **Edgard Blücher Ltda**: São Paulo, cap. 7, 2010.

FERNANDES, B. S. **Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo**. Tese. Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

FLORENTINO, H. O; BISCARO, A.F.V; PASSOS, J.R.S. Funções sigmoidais aplicadas na determinação da atividade metanogênica específica – ame. **Revista Brasileira de Biometria**, São Paulo, v. 28, n.1, p. 141-150, 2010.

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.

GHOSH, D.; HALLENBECK, P.C.; **Int. J. Hydrogen Energy** 2009, 34, 7979.

GOMEZ, E. O.; SOUZA, R. T. G.; ROCHA, G. J. M.; ALMEIDA, E.; CORTEZ, L. Bioetanol de Cana-de-Açúcar: P&D para Produtividade Sustentabilidade; ed.; **Edgard Blücher Ltda**: São Paulo, cap. 9, 2010.

GÓMEZ, S. M. R. **Pré-tratamento e Hidrólise Enzimática do Bagaço de Cana-de-açúcar**. Campinas, SP: [s.n.], 2010. Disponível em: <<http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=000771602>>. Acessado dia 05 de abril de 2017.

GRAY, K. A.; ZHAO, L.; EMPTAGE, M. Bioethanol. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.10, p.1-6, 2006.

GUILHERME, A. DE A. **Estudo experimental e modelagem do processo de sacarificação e fermentação simultânea utilizando bagaço de cana-de açúcar para produção de etanol**. Tese. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2014.

GUO, X.M.; TRABLY, E.; LATRILLE, E.; CARRÈRE, H.; STEYER, J-P.; **Int. J. Hydrogen Energy**, 35, 10660, 2010.

GUWY, A. J.; HAWKES, F. R.; HAWKES, D. L.; ROZZI, A.G. Hydrogen Production In A High Rate Fluidised Bed Anaerobic Digester. **Wat. Res.** 31(6): 1291-1298. 1997.

HACKSTEIN, J. H. P. Eukaryotic Fe-hydrogenases – old eukaryotic heritage or adaptive acquisitions. **International Hydrogenases Conference.**; 47. 2004.

HALLENBECK, P.C.; BENEMANN, J.R.; **Int. J. Hydrogen Energy**, 27, 1185. 2002.

HASSUANI, S. J., LEAL, M. R. L. V., MACEDO, I. C. Biomass power generation: sugar cane bagasse and trash - Piracicaba: PNUD-CTC, **Série Caminhos para Sustentabilidade**, 2005.

HOTZA, D.; COSTA, J. C. D.. **Int. J. Hydrogen Energy**. 33, 4915, 2008.

HUANG, G. H.; HSU, S. F.; LIANG, T.M.; HUANG, Y.H. Study on hydrogen production with hysteresis in UASB, **Chemosphere.**; 54: 815-821. 2004.

HUESEMANN, M.H.; HAUSMANN, T.S.; CARTER, B.M.; GERSCHLER, J.J.; BEN-EMANN, J.R.; **Appl. Biochem. Biotechnol.** 162, 208. 2010.

INFANTES et al. Influence of pH, temperature and volatile fatty acids on hydrogen production by acidogenic fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, Ciudad Real, v.36, p. 15595-15601, 2011.

JAYASINGHEARACHCHI, H.S.; SARMA, P.M.; SINGH, S.; AGINIHOTRI, A.; MAN-DAL, A.K.; LAL, B.; **Int. J. Hydrogen Energy**, 34, 7197. 2009.

KAMALASKAR, L.B.; DHAKEPHALKAR, P.K.; MEHER, K.K.; RANADE, D.R.; **Int. J. Hydrogen Energy**, 35, 10639. 2010.

KARADAG, D.; PUHAKKA, J.A.; **Int. J. Hydrogen Energy**, 35, 10954. 2010.

KAWAGOSHI, Y.; OKI, Y.; NAKANO, I.; FUJIMOTO, A.; TAKAHASHI, H.; **Int. J. Hydrogen Energy**, 35, 13365. 2010.

KHETKORN, W.; LINDBLAD, P.; INCHAROENSAKDI, A.; **Int. J. Hydrogen Energy**. 2010.

KIM, J.P; KIM, K.R.; CHOI, S.P.; HAN, S.J.; KIM, M.S.; SIM, S.J.; **Int. J. Hydrogen Energy**, 35, 13387. 2010.

KIM, S.; HOLTZAPPLE, M. T. Delignification kinetics of corn stover in lime pretreatment. **Bioresource Technology**, v.97, p.778-785, 2006.

KIM, S.; SEOL, E.; RAJ, S. M.; PARK, S.; OH, Y. K.; RYU, D. D. Y. Various hydrogenases and formate- dependent hydrogen production in *Citrobacter amalonaticus* Y19. **International Journal of Hydrogen energy**. 2008.

KIRTAY, E.; *Energy Convers. Manage.* 52, 1778. 2011.

KONDO, T.; POLYM, J. Sci.: Part B: Polym. **Physics**, 35, 717. 1997.

KOTAY, M.K.; DAS, D.; **Int. J. Hydrogen Energy**, 33, 258, 2008.

KUMAR, R.; WYMAN, C. E. Effects of cellulase and xylanase enzymes on the deconstruction of solids from pretreatment of poplar by leading technologies. **Biotechnology Progress**, v.25, p.302-314, 2009.

LAMAISON, F. DO C.; ANTÔNIO, R. V.; REGINATTO, V. Enriquecimento de cultura mista em bactérias produtoras de hidrogênio por tratamento térmico e ácido: efeito em longo prazo. **1º Workshop Latino-Americano de Bio-Hidrogênio** , São Carlos - SP, Brasil, 2014.

LAY, J-J.; FAN, K-S.; CHANG, I.J.; KU,C-H.; **Int. J. Hydrogen Energy**, 28, 1361. 2003.

LEE, K.S.; LIN, P.J.; CHANG, J.S.; **Int. J. Hydrogen Energy**, 31, 465. 2006.

LEVIN DB, PITT L, LOVE M. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. **Int J Hydrogen Energy** 2004;29:173–89.

LEVIN, D.B.; PITT, L.; LOVE, M.; **Int. J. Hydrogen Energy**, 29, 173. 2004.

LI, C.; FANG, H.H.P.; Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. **Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.** 37, 1. 2007.

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**.; 32: 3274 – 3283. 2007.

LIMA, U. A., AQUARONE, E., BORZANI, W., SCHMIDELL, W. *Biotecnologia Industrial: Processos fermentativos e enzimáticos*. São Paulo: Editora **Edgard Blucher LTDA**, V.2, 2001.

LIN, C.Y.; CHANG, C.C.; HUNG, C.H.; **Int. J. Hydrogen Energy**, 33, 2445. 2008.

LIN, C.Y.; CHENG, C.H.; **Int. J. Hydrogen Energy**, 31, 832. 2006.

LIN, C.Y.; HUNG, C.H.; CHEN, C.H.; CHUNG, W.T.; CHENG, L.H.; **Process Biochem.**, 41, 1383. 2006.

LIN, C.Y.; LAY, C.H.; **Int. J. Hydrogen Energy**, 29, 275. 2004.

LIN, C.Y.; WU, C.C.; HUNG, C.H.; **Int. J. Hydrogen Energy**, 33, 43. 76. 2008.

LUO, G.; KARASHEV, D.; XIE, L.; ZHOU, Q.; ANGELIDAKI, I.; **Biotechnol. Bioeng**, 108, 1816. 2011.

LUO, L.; VOET, E. V .D.; HUPPES, G. Biorefining of lignocellulosic feedstock – Technical, economic and environmental considerations. **Bioresource Technology**, v.101, p.5023-5032, 2010.

MACHADO, D. de S. **Seleção de fungos capazes de hidrolisar bagaço de cana-de-açúcar pré- tratado**. Piracicaba, 2009. Disponível em: <[www.teses.usp.br/teses/.../11/...09112009.../Denise\\_Machado.pdf](http://www.teses.usp.br/teses/.../11/...09112009.../Denise_Machado.pdf)> Acessado dia 05 de abril de 2017;

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**. Vol 33. P. 4309-4317. 2008.

MANDAL, B.; NATH, K.; DAS, D.; **Biotechnol. Lett**, 28, 831. 2006.

MASIERO, G.; LOPES, H. Etanol e biodiesel como recursos energéticos alternativos: perspectivas da América Latina e da Ásia. **Revista Brasileira de Política Internacional**, v. 51, p. 60-79, 2008.

MATHEWS, J.; WANG, G.; **Int. J. Hydrogen Energy**, 34, 7404. 2009.

MIN, H.T.; SHERMAN, L.A.; **Appl. Environ. Microbiol.** 76, 4293. 2010.

MOHAN, S. V.; BABU, V.L.; SARMA, P. N. Effect of various pretreatment methods on anaerobic mixed microflora to enhance biohydrogen production utilizing dairy wastewater as substrate. **Bioresource Technology**. 99: 59–67. 2008.

MOREIRA, R., CARVALHO, F. M. S. DE; BERGAMASCHI, V. S. R. P. Patentes depositadas em âmbito nacional como indicador de desenvolvimento das tecnologias de produção de hidrogênio. **Química Nova**, v. 36, n. 05, p. 748-751, 2013.

MOREIRA, R.; CARVALHO, F. M. S. DE; BERGAMASCHI, V. S. E POLITANO, R. Patentes depositadas em âmbito nacional como indicador de desenvolvimento das tecnologias de produção de hidrogênio. **Quim. Nova**, Vol. 36, No. 5, 748-751, 2013.

MU, Y.; YU, H.Q.; WANG, Y.; **Chemosphere**, 64, 350. 2006.

MU, Y.; YU, H-Q.; WANG, G.; **Enzyme Microb. Technol.** 40, 947. 2007.

MU, Y.; ZHENG, X.J.; YU, H.Q.; ZHU, R.F.; **Int. J. Hydrogen Energy**, 2006.

NAVARRO, E.; MONTAGUD, A.; DE CORDOBA, P.F.; URCHUEGUIA, J.F.; **Int. J. Hydrogen Energy**, 34, 8828. 2009.

NGUYEN, T. A. D.; KIM, J. P.; KIM, M. S.; OH, Y. K.; SIM, S. J. Optimization of hydrogen production by hyperthermophilic eubacteria, *Thermotoga maritima* and *Thermotoga neapolitana* in batch fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**. 2008.

NIU, K.; ZHANG, X.; TAN, W.S.; ZHU, M.L.; **Int. J. Hydrogen Energy** 2010.

OBEID, J.; FLAUS, J.M.; ADROT, O.; MAGNIN, J.P.; WILLISON, J.C.; **Int. J. Hydrogen Energy**, 35, 10719. 2010.

OH, S-E.; GINKEL, S.V.; LOGAN, B.E. The relation effectiveness of pH control and heat treatment for enhancing biohydrogen gas production. *Environ. Sci. Technol.* 37: 5186-5190. 2003.

O-THONG, S.; PRASERTAN, P.; BIRKELAND, N-K.; **Bioresour. Technol.** 100, 909. 2009.

PACHIEGA, R.; TORQUATO, L.; SAKAMOTO, I.; VARESCHE, M. B. A.; OLIVEIRA, J. E.; SEQUINEL, R.; MAINTINGUER, S. I. Diversidade microbiana de lodos de estação de tratamento aplicados na produção biológica de H<sub>2</sub>. **1º Workshop Latino-Americano de Bio-Hidrogênio**, São Carlos - SP, Brasil, 2014.

PAGE, S.; KRUMDIECK, S.; **Energy Policy**, 37, 3325, 2009.

PARK, W.; HYUN, S.H.; OH, S-E.; LOGAN, B.E.; KIM, I.S.; *Environ. Sci. Technol.* 39, 4416. 2005.

PENDYALA, B.; CHAGANTI, S.R.; LALMAN, J.A.; SHANMUGAM, S.R.; HEATH, D.D.; LAU P.C.K.; **Int. J. Hydrogen Energy**, 37, 12175. 2012.

RABELO, S. C. **Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar**. 180f.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química, Unicamp, Campinas. 2007.

RAN, C.Q.; ZHANG, F.J.; SUN, H.J.; ZHAO, B.D.; **Biotechnol. Bioprocess Eng.**, 14, 835. 2009.

RATTI, R. P.; DELFORNO, T. P.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B. A. Produção de bio-hidrogênio a partir do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado. **1º Workshop Latino-Americano de Bio-Hidrogênio**, São Carlos - SP, Brasil, 2014.

REIS, C.M. **Efeito da velocidade ascensional na produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidificado**. 2010. 97 f. Dissertação (Mestrado em engenharia química) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

REITH, J.H. WIJFFELS, R.H. BARTEN, H. Introduction: the perspectives of biological methane and hydrogen production. In: Bio-methane & Bio hydrogen. **Dutch Biological Hydrogen Foundation**. 2003.

REN, N-Q.; GUO, W-Q.; WANG, X-J.; XIANG, W-S.; LIU, B-F.; WANG, X-Z.; DING, J.; CHEN, Z-B.; **Int. J. Hydrogen Energy**, 33, 4318. 2008.

REN,N.; LI,J.; LI,B.; WANG,Y.; LIU,S.; **Int. J. Hydrogen Energy**, 31, 2147. 2006.

ROSA, P.R.F.; SILVA, E.L. Produção de hidrogênio em reatores anaeróbio de leito fluidificado: impacto da proporção de glicose e soro de queijo. **II seminário do projeto temático**, p. 222 – 228, 2012.

ROSILLO-CALLE, F., BAJAY, S. V., ROTHMAN, H. Uso da biomassa para produção de energia na indústria brasileira. Campinas, SP: **Editora da UNICAMP**, 2005.

SÁ, L. R. V.; CAMMAROTAC, M C.; LEITÃO, V. S. F. Produção de hidrogênio via fermentação anaeróbia – aspectos gerais e possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais brasileiros. **Química Nova**, v. 37, n. 05, p. 857-867, 2014.

SANTOS FILHO, E. N. **Produção de metano com resíduos de biotério utilizando fluido ruminal como inóculo.** Dissertação. Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, 2015.

SANTOS, F. A., QUEIRÓZ, J. H., COLODETTE, J. L., FERNANDES, S. A., GUIMARÃES, V. M. E REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Quim. Nova**, Vol. 35, No. 5, 1004-1010, 2012.

SCHLITTLER, L. A. F. S. **Engenharia de um bioprocesso para a produção de etanol de cana de açúcar.** Dissertação. Rio Janeiro: Escola de Química, Universidade Federal do Rio Janeiro, 2006.

SCHRÖDER U, SCHOLZ F. Bacterial batteries. **Nature Biotechnology**. 21(10): 1151-1152. 2003.

SEABRA, J. E. A. **Avaliação técnico-econômica de opções para o aproveitamento integral da biomassa de cana no Brasil.** 298f. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica), Faculdade de Engenharia Mecânica, Unicamp, Campinas. 2008.

SHELL INTERNATIONAL. **Energy Needs, Choices and Possibilities. Scenarios to 2050.** 2001.

SHIN, H-S.; Youn, J-H.; Kim, S-H.; **Int. J. Hydrogen Energy**, 29, 1355. 2004.

SHIN, J. H.; YOON, J. H.; AHN, E. K.; KIM, M. S.; SIM, S. J.; PARK, T. H. Fermentative hydrogen production by the newly isolated *Enterobacter asburiae* SNU-1. **International Journal of Hydrogen Energy**. 32: 192 – 199. 2007.

SILVERSTEIN, R. A.; CHEN, Y., SHARMA-SHIVAPPA, R. R.; BOYETTE, M. D. J. O. A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks. **Bioresource Technology**, v.98, p.3000-3011, 2007.

SIQUEIRA, M. R.; LORENCINI, P.; TAPIA, D. R.; REGINATTO, V. Pré-tratamento ácido de bagaço de cana para o uso como substrato na produção de hidrogênio por fermentação. **1º Workshop Latino-Americano de Bio-Hidrogênio**, São Carlos - SP, Brasil, 2014.

SIQUEIRA, M.R; REGINATTO, V. Inhibition of fermentative H<sub>2</sub> production by hydrolysis by products of lignocellulosic substrates. **Renewable Energy**, Ribeirão Preto, v. 80, p. 109-116, 2015.

SKONIECZNY, M.T.; YARGEU, V.; *Int. J. Hydrogen Energy*, 34, 3288. 2009.

SOARES, L. A.; RATTI; VARESCHE, R. E M. B. A. Influência do pré-tratamento do inóculo na produção de hidrogênio em condição termofílica. **1º Workshop Latino-Americano de Bio-Hidrogênio**, São Carlos - SP, Brasil, 2014.

SOUSA, L. C.; CHUNDAWAT, S. P. S.; BALAN, V.; DALE, B. E. Cradle-to-grave' assessment of existing lignocelluloses pretreatment Technologies. **Current Opinion in Biotechnology**, v.20, p.339-347, 2009.

STEIL, L. **Avaliação da atividade microbiana metanogênica na lagoa de estabilização anaeróbia da estação de tratamento de esgotos sanitários do município de Cajati, Vale do Ribeira do Iguape**, Estado de São Paulo. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, Araraquara, 2001.

STERLING, M.C.; LACEY, R.E.; ENGLER, C.R.; RICKE, S.C.; *Bioresour. Technol.* 77, 9. 2001.

SUWANSAARD, M.; CHOORIT, W.; ZEILSTRA-RYALLS, J.H.; PRASERTAN, P.; *Bio-technol. Lett.* 32, 1667. 2010.

TAI, J.; ADAV, S.S.; SU, A.; LEE, D.J.; *Int. J. Hydrogen Energy*, 35, 13345. 2010.

TAVARES, T. de G. A. **Produção de hidrogênio a partir da manipueira em reator anaeróbio de leito fluidificado sob condições termofílicas**. 2016. 65f. Dissertação. Universidade Federal de Alagoas, Maceió. 2016.

TEMUDO, M.; MUYZER, G.; KLEEREBEZEM, R.; VAN LOODRECHT, M.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80, 1121. 2008.

TEMUDO, M.F.; KLEEREBEZEM, R.; LOOSDRECHT, M.V.; *Biotechnol. Bioeng.* 2007.

TORQUATO, L. D. M.; BRAHIM, G.; PACHIEGA, R.; SEQUINEL, R.; OLIVEIRA, J. E.; MAINTINGUER, S. I. Produção biológica de H<sub>2</sub> em reatores anaeróbios em batelada alimentados com concentrações crescentes de sacarose. **1º Workshop Latino-Americano de Bio-Hidrogênio**, São Carlos - SP, Brasil, 2014.

UNICA. **União da Indústria de Cana-de-açúcar**. São Paulo. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/>>, Acesso em: 02 de julho. 2018.

VALDEZ-VAZQUEZ, I.; POGGI-VARALDO, H.M.; *Renewable Sustainable Energy Rev.*, 13, 1000. 2009.

VARDAR-SCHARA G, MAEDA T, WOOD TK. Metabolically engineered bacteria for producing hydrogen via fermentation. *Microbiol Biotechnol* 2007;1:107–25.

VIJAYARAGHAVAN, K.; AHMAD, D.; *Int. J. Hydrogen Energy*, 31, 1284. 2006.

WALKER, E. **Estudo da viabilidade econômica na utilização de Biomassa como fonte de energia renovável na Produção de biogás em propriedades rurais**. Dissertação de mestrado do Departamento de Física, Estatística e Matemática da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, 2009.

WANG, G.; MU, Y.; YU, H.Q.; *Biochem. Eng. J.* 23, 175. 2005.

WANG, J.L.; WAN, W.; *Int. J. Hydrogen Energy*, 33, 2934. 2008.

WANG, J.; WAN, W. Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. **International journal of hydrogen energy**. Vol 34. P. 799-811. 2009.

WEJIMA, J.; GUBBELS, F.; HULSHOFF, P.L.W.; STAMS, A.J.M.; LENS, P.; LETTINGA, G.; **Water Sci. Technol.** 45, 75. 2002.

WOOLEY, R.; RUTH, M.; GLASSNER, D.; SHEEHAN, J.; **Biotechnol. Prog.** 15, 794. 1999.

WU, S. Y.; LIN, C. N.; CHANG, J. S.; LEE, K. S.; LIN, P. J. Hydrogen production with immobilized sewage sludge in three-phase fluidized-bed bioreactor, **Biotechnol. Prog.**, 19: 828- 832. 2003.

XING, D.F.; REN, N.Q.; WANG, A.J.; LI, Q.B.; FENG, Y.J.; MA, F.; **Int. J. Hydrogen Energy** 33, 1489. 2008.

XU, F.; SUN, J. X.; LIUB, C. F.; SUNB, R. C. Comparative study of alkali- and acidic organic solvent-soluble hemicellulosic polysaccharides from sugarcane bagasse. **Carbohydrate Research**, v.341, p.253-261, 2006.

YE, N.F.; LU, F.; SHAO, L.M.; GODON, J-J.; HE, P.J.; **J. Appl. Microbiol.** 2007.

YOSHINO, F.; IKEDA, H.; MASUKAWA, H.; SAKURAI, H.; **Mar. Biotechnol.**

Zang T, Fang HHP. Digitization of DGGE profile and cluster analysis of microbial communities. **Biotechnol. Lett.** 22: 399-404. 2000.

ZHANG, Y. H. P.; **J. Ind. Microbiol Biotechnol.** 2008, 35, 367.  
<http://www.genomics.energy.gov>, acessada em janeiro 2017.

ZHANG, Y. H. P.; LYND, L. R.; **Biotechnol. Bioeng.** 88, 797. 2004.

ZHU, H.G.; BÉLAND, M.; **Int. J. Hydrogen Energy**, 31, 1980. 2006.

ZHU, Z.N.; SHI, J.P.; ZHOU, Z.H.; HU, F.X.; BAO, J.; **Process Biochem.** 45, 1894-2010.

ZWIETERING, M. H. **Modeling of the Bacterial Growth Curve. Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1875-1881, 1990. ISSN 0099-2240 1098-5336. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC184525/> >.