

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

NADJANE LEITE DOS SANTOS TELLES

**Influência do inóculo na produção de hidrogênio a partir de resíduo de cervejaria
artesanal**

MACEIÓ

2023

NADJANE LEITE DOS SANTOS TELLES

Influência do inóculo na produção de hidrogênio a partir de resíduo de cervejaria artesanal

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química (PPGEQ) da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do grau de Doutora em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Lucena Cavalcante de Amorim

MACEIÓ

2023

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecário: Jorge Raimundo da Silva – CRB-4 – 1528

T274i Telles, Nadjane Leite dos Santos.
 Influência do inóculo na produção de hidrogênio a partir de resíduo de
 cervejaria artesanal / Nadjane Leite dos Santos Telles. – 2023.
 108 f. : il. color.

Orientador: Eduardo Lucena Cavalcante de Amorim.

Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de
Alagoas. Centro de Tecnologia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Química. Maceió, 2023.

Bibliografia: f. 97-106.
Apêndices: f. 107-108.

1. Planejamento experimental. 2. Fermentação natural – Energia.
I. Título.

CDU: 66.0

Nadjane Leite dos Santos Telles

**Influência do inóculo na produção de hidrogênio a partir de
resíduo de cervejaria artesanal**

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

Aprovada em: Maceió, 12 de dezembro de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **EDUARDO LUCENA CAVALCANTE DE AMORIM**
Data: 12/12/2023 17:26:29-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

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

Documento assinado digitalmente
 **RENATA MARIA ROSAS GARCIA ALMEIDA**
Data: 13/12/2023 14:08:46-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

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

Documento assinado digitalmente
 **RODOLFO JUNQUEIRA BRANDAO**
Data: 13/12/2023 19:07:41-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Rodolfo Junqueira Brandão (PPGEQ/UFAL)

Documento assinado digitalmente
 **AMANDA SANTANA PEITER**
Data: 13/12/2023 15:11:34-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Dr^a. Amanda Santana Peiter (CECA/UFAL)

Documento assinado digitalmente
 **ANTONIO PEDRO DE OLIVEIRA NETTO**
Data: 13/12/2023 17:14:05-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Antonio Pedro de Oliveira Netto (CTEC/UFAL)

Dedico este trabalho as minhas filhas Julia e Ana Lis. Que transformou minha vida, me mostrou um AMOR incondicional e me impulsiona a seguir todos os dias.

AGRADECIMENTOS

Sou imensamente Grata à Deus, pelo dom da vida, por me conceder a sabedoria de reconhecer que todos os dias precisamos melhorar como ser humano e por ter me dado a dádiva da maternidade. Obrigada Senhor, por cada dia de vida, pela minha saúde, força e iluminação para que eu possa vencer todos os obstáculos.

Aos meus pais Sebastião e Jane, por terem me ensinado a ser uma pessoa honesta e lutar pelos meus objetivos com honestidade. Sou imensamente grata pelo investimento em educação, por terem me ensinado a valorizar a família e tratar as pessoas com humanidade. Por dedicar aos filhos o amor, capaz de renunciar suas próprias escolhas pelo bem-estar dos filhos.

As minhas irmãs Janyne e Julyane pelo estímulo, apoio, incentivo, carinho e amor que sempre me deram. Por apesar de sermos diferentes, sempre seguimos unidas e nos colocando como uma rede de apoio umas as outras.

Ao meu esposo, pela compreensão e carinho. Pelo apoio e paciência nos momentos que eu estava mais estressada e por entender os momentos que tive que renunciar a família para concluir meu projeto. Obrigada pelo amor que dedica a nossa família e por me ajudar a edificar nosso lar.

As minhas filhas lindas que mesmo tão pequeninas tiveram que aceitar tantos momentos que a mamãe não estava presente ou estava ocupada estudando, escrevendo, lendo, me dedicando para o andamento desse projeto. Mas apesar de toda correria sempre ao dormir, o beijo era doce e o Eu te Amo era caloroso, para que elas nunca sentissem falta do amor, do afeto e da certeza que tudo que faço também é pensando nelas.

Ao meu orientador Prof. Dr. Eduardo Lucena, pelo aceite de orientação, pela paciência, pelo incentivo e apoio quando sinalizei meu interesse em realizar esse estudo. Pelas palavras positivas, principalmente quando estava preocupada com o andamento da pesquisa.

Aos docentes, servidores e pesquisadores do Programa de Pós-graduação em Engenharia Química que contribuíram no andamento e formação de ampla aprendizagem.

Aqueles que fazem parte do Laboratório de Saneamento ambiental e Laboratório de Controle Ambiental por contribuir no andamento da pesquisa, em especial a Taciana, Georgia e Fernanda pelo apoio durante todo o processo.

À Raphaela que me ajudou muito com a parte de biologia molecular, pela disponibilidade e incentivo.

Ao amigo Elvan que sempre está disponível para me ajudar e por todo apoio.

A Cervejaria que abriu a porta para conhecermos o processo de fabricação da cerveja e coletarmos resíduos para desenvolvimento desse trabalho.

Ao grupo de pesquisa pelos auxílios e cooperação.

A todos aqueles que mesmo não citados, fizeram e fazem parte desta etapa de crescimento.

Meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

O desenvolvimento tecnológico e as mudanças nos hábitos das pessoas vêm aumentando a necessidade global por energia e tem sido uma preocupação da sociedade moderna. A busca pelo desenvolvimento de energia sustentável é uma questão importante a fim de evitar uma crise energética e minimizar os impactos ambientais ocorridos em virtude da utilização dos combustíveis fósseis durante muitos anos. Diante desse cenário, o hidrogênio surge como fonte alternativa de energia, já que sua combustão gera apenas vapor de água, sem agredir ao meio ambiente e nem contribuir para o efeito estufa, sendo assim, considerado um combustível renovável. A produção biológica de hidrogênio, por meio da digestão anaeróbia aparece como alternativa para o processamento do resíduo de cervejaria artesanal, sendo possível aliar a geração de energia (hidrogênio) ao enquadramento ambiental deste resíduo sem interferir em sua qualidade. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar a produção de hidrogênio a partir do resíduo de cerveja coletado do tanque de fermentação como fonte de carbono, procurando avaliar os efeitos da Demanda Química de Oxigênio – DQO (5 e 10 g. L⁻¹), tipo de inóculo (Fermentação natural e lodo anaeróbio) e agitação (sem agitação e 120 rpm). Os efeitos das variáveis dependentes na produção de H₂ foram examinados pela análise de variância (ANOVA) e a produção acumulada foi ajustada por meio da função de Gompertz modificado, utilizando a média dos valores obtidos pelas réplicas dos reatores em cada tratamento do planejamento experimental. O efeito linear da DQO e tipo de inóculo; o efeito da interação da DQO e tipo de inóculo e a interação do tipo de inóculo e agitação foram altamente significativos na produção máxima de hidrogênio, indicando que esses termos tiveram grande impacto na variável resposta. O efeito da agitação e a interação entre DQO e agitação apresentaram pouco impacto na produção de hidrogênio. Os coeficientes de determinação (R²) de todos os ajustes foram de 0,9916 a 0,9975, indicando que o modelo aplicado descreve satisfatoriamente o progresso da produção acumulativa de hidrogênio. O máximo potencial de produção de hidrogênio e a taxa de produção foram obtidos nas condições (DQO de 5 g. L⁻¹, inóculo de fermentação natural e agitação de 120 rpm) nos valores de 163,30 mL, e 0,52 mL.h⁻¹, respectivamente. Os principais metabólitos produzidos foram metanol, etanol, ácido acético, ácido propiônico, ácido butírico e ácido valérico. A análise de sequenciamento genético relevou que a espécie *Enterobacter* sp. foi a que apresentou maior similaridade no reator inoculado com fermentação natural com maior produção de hidrogênio e que as bactérias não cultivadas foram as que apresentaram maior similaridade com o reator inoculado com lodo de ETE de menor produção de H₂.

Palavras-chave: Planejamento experimental, Fermentação natural, Energia.

ABSTRACT

Technological development and changes in people's habits have increased the global need for energy and have been a concern for modern society. The search for the development of sustainable energy is an important issue in order to avoid an energy crisis and minimize the environmental impacts that have occurred due to the use of fossil fuels for many years. Given this scenario, hydrogen emerges as an alternative source of energy, as its combustion only generates water vapor, without harming the environment or contributing to the greenhouse effect, thus being considered a renewable fuel. The biological production of hydrogen, through anaerobic digestion, appears as an alternative for the processing of craft brewery waste, making it possible to combine the generation of energy (hydrogen) with the environmental framework of this waste without interfering with its quality. In this sense, the objective of this study was to evaluate the production of hydrogen from beer residue collected from the fermentation tank as a carbon source, seeking to evaluate the effects of Chemical Oxygen Demand – COD (5 and 10 g. L⁻¹), type of inoculum (Natural fermentation and anaerobic sludge) and agitation (without agitation and 120 rpm). The effects of the dependent variables on H₂ production were examined by analysis of variance (ANOVA) and the accumulated production was adjusted using the modified Gompertz function using the average of the values obtained by the reactor replicates in each treatment of the experimental design. The linear effect of COD and type of inoculum; the effect of the interaction of COD and inoculum type and the interaction of inoculum type and agitation were highly significant on maximum hydrogen production, indicating that these terms had a great impact on the response variable. The effect of agitation and the interaction between COD and agitation had little impact on hydrogen production. The coefficients of determination (R²) of all adjustments ranged from 0,9916 to 0,9975, indicating that the applied model satisfactorily describes the progress of cumulative hydrogen production. The maximum hydrogen production potential and production rate were obtained under the conditions (COD of 5 g. L⁻¹, natural fermentation inoculum and agitation of 120 rpm) at values of 163,30 mL and 0,52 mL. h⁻¹, respectively. The main metabolites produced were methanol, ethanol, acetic acid, propionic acid, butyric acid and valeric acid. Genetic sequencing analysis revealed that the species *Enterobacter* sp. was the one that showed the greatest similarity in the reactor inoculated with natural fermentation with the highest hydrogen production and the uncultured bacteria were the ones that showed the greatest similarity with the reactor inoculated with ETE sludge with the lowest H₂ production.

Keywords: Experimental design, natural fermentation, Energy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Gráfico do total de cervejarias registradas no Brasil.....	23
Figura 2: Percentual de cervejarias por região	23
Figura 3: Total de produtos registrados por Unidade da Federação.....	24
Figura 4: Matéria prima básica para composição da cerveja	26
Figura 5: Fluxograma das etapas básicas do processo produtivo de cerveja	30
Figura 6: Setores responsáveis pela geração da água residuária da indústria de cerveja	32
Figura 7: Rotas metabólicas e grupos microbianos envolvidos no processo de digestão anaeróbia	36
Figura 8: Fluxograma geral das etapas do estudo	51
Figura 9: Resíduo coletado de cerveja tipo <i>Pilsen</i>	53
Figura 10: Local de coleta do resíduo: tanque cônico de fermentação.....	53
Figura 11: Exposição do resíduo de cervejaria para Fermentação Natural	55
Figura 12: Tratamento Térmico do Lodo de ETE	56
Figura 13: Torneiras de 3 vias acopladas aos reatores anaeróbios utilizados no estudo	59
Figura 14: Desenho esquemático do primeiro ensaio experimental	60
Figura 15: Frasco padrão de vidro com tampa rosqueável e septo de silicone	64
Figura 16: Gráfico comparativo da produção acumulada de hidrogênio de todos os reatores...	74
Figura 17: Gráfico de Pareto em resposta a produção máxima de hidrogênio usando parâmetro $\alpha = 0,05$	79
Figura 18: Gráfico do efeito principal da DQO para produção máxima de H ₂ (médias ajustadas)	80

Figura 19: Gráfico do efeito principal tipo de inóculo para produção máxima de H ₂ (médias ajustadas)	81
Figura 20: Gráfico do efeito principal tipo da agitação para produção máxima de H ₂ (médias ajustadas)	82
Figura 21: Gráfico do efeito das interações para produção máxima de H ₂ (médias ajustadas)	83
Figura 22: Distribuição percentual de cada metabólito produzido nos diferentes reatores	88
Figura 32: Distribuição percentual de cada metabólito produzido nos reatores inoculados com fermentação natural.....	90
Figura 24: Distribuição percentual de cada metabólito produzido nos reatores inoculados com lodo anaeróbio de ETE	91
Figura 25: Produção temporal acumulada de hidrogênio por reator, ajustado ao modelo de Gompertz Modificado	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características Físico-química do efluente de cervejaria	33
Tabela 2: Comparação do rendimento na produção de hidrogênio através da fermentação natural e de outros inóculos a partir de várias fontes de substrato.....	47
Tabela 3: Caracterização de amostra de resíduo de cervejaria	54
Tabela 4: Variáveis e níveis para o estudo.....	57
Tabela 5: Matriz do planejamento experimental 2 ³ completo.....	58
Tabela 6: Variáveis analisadas, frequência e metodologia de análise	61
Tabela 7: Composição dos reagentes utilizados na amplificação de DNA por PCR	67
Tabela 8: Composição físico-química dos reatores em cada tratamento.....	69
Tabela 9: pH inicial e média do pH final dos reatores	70
Tabela 10: Concentrações iniciais e finais de DQO e carboidratos totais, eficiência de remoção de DQO e eficiência de consumo de carboidratos totais	71
Tabela 11: Dados dos reatores para produção de hidrogênio calculado a partir do Modelo de Gompertz Modificado	75
Tabela 12: Comparação dos resultados obtidos neste trabalho e resultados da literatura para o rendimento de hidrogênio.....	77
Tabela 13: Coeficientes de regressão, erros padrão e valor de p do planejamento experimental 2 ³	78
Tabela 14: Análise da variância para o ajuste do modelo linear aos dados da Tabela 13	84
Tabela 15: Concentrações iniciais e finais dos metabólitos solúveis produzidos em cada reator	87
Tabela 16: Microrganismos com maior similaridade	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C	Antes de cristo
ΔG	Variação de energia livre de Gibbs
ΔH	Variação de entalpia
AGV	Ácidos Graxos Voláteis
Art.	Artigo
CEPRAM	Conselho Estadual de Meio Ambiente
CERVBRASIL	Associação Brasileira da Indústria de Cerveja
CH ₄	Metano
CO ₂	gás carbônico
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
COD	<i>Chemical Oxygen demand</i>
CSTR	<i>continuous stirred tanck reactor</i>
CTEC	Centro de Tecnologia
<i>dark fermentation</i>	fermentação no escuro
DBO	Demanda Biológica de Oxigênio
DQO	Demanda Química de Oxigênio
ETA	Estação de Tratamento de Água
ETE	Estação de tratamento de Esgoto/Efluente
EUA	Estados Unidos da América
GC	Cromatografia gasosa
H ₂	gás hidrogênio

HCl	Ácido clorídrico
HY	Rendimento de hidrogênio
IEA	International Energy Agency
IMA/AL	Instituto do Meio Ambiente de Alagoas
LSA	Laboratório de Saneamento Ambiental
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
N.D	Não detectado
N ₂	gás nitrogênio
NaOH	Hidróxido de sódio
NTK	Nitrogênio de Kjeldahl Total
O.D.	Oxigênio Dissolvido
O ₂	gás oxigênio
PIB	Produto Interno Bruto
R1	Reator 1
R2	Reator 2
R3	Reator 3
R4	Reator 4
R5	Reator 5
R6	Reator 6
R7	Reator 7
R8	Reator 8
SINDCERV	Sindicato Nacional da Indústria de Cerveja
UASB	Upflow Anaerobic Sludge Blanket (reator anaeróbio de fluxo ascendente de alta eficiência)

LISTA DE SÍMBOLOS

C	carbono
Ca	cálcio
cm	centímetro
g	gramas
h	hora
K	potássio
KJ	QuiloJoule
L	litros
m	metro
Mg	magnésio
mg	miligrama
min.	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
mmol	milimol
mol	mol
N	nitrogênio
°C	grau Celsius
P	fósforo
pH	potencial hidrogeniônico
s	segundo

SO_4^{-2} Sulfato (íon)

> maior

μ microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo geral.....	20
2.2 Objetivos específicos	20
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
3.1 Indústria Cervejeira.....	22
3.2 Processo de produção da cerveja	25
3.2.1 Água.....	27
3.2.2 Malte	27
3.2.3 Lúpulo.....	27
3.2.4 Levedura	28
3.2.5 Etapas de produção da cerveja.....	28
3.3 Resíduo de Cervejaria: Características e problematização	31
3.4 Digestão Anaeróbia.....	35
3.4.1 Hidrólise	37
3.4.2 Acidogênese.....	37
3.4.3 Acetogênese	37
3.4.4 Metanogênese	37
3.4.5 Sulfetogênese	38
3.5 Rotas fermentativas.....	38
3.6 O Hidrogênio como fonte de energia.....	39

3.7 Produção de hidrogênio	41
3.8 Parâmetros que influenciam a produção de hidrogênio	43
3.8.1 pH	43
3.8.2 Substrato	43
3.8.3 Temperatura	45
3.8.4 Inóculo	45
3.9 Planejamento Experimental	48
3.10 Considerações acerca da Revisão bibliográfica	49
4 MATERIAL E MÉTODOS	50
4.1 Descrição geral do experimento.....	50
4.2 Caracterização da Indústria: Área de Estudo	52
4.3 Substrato.....	52
4.4 Inóculos	54
4.4.1 Inóculo misto gerado por fermentação natural	54
4.4.2 Inóculo de reator UASB	55
4.5 Planejamento Experimental	56
4.6 Montagem dos Reatores: Ensaio de produção de hidrogênio em reatores em batelada	59
4.7 Métodos Analíticos	60
4.7.1 Análises Cromatográficas.....	62
i. Determinação de Hidrogênio.....	62
ii. Determinação dos Metabólitos produzidos	61
4.8 Análise Cinética	64

4.9 Análise da Comunidade Microbiana.....	66
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	68
5.1 Caracterização do Resíduo de Cervejaria Artesanal e correlação com a composição dos reatores para produção de hidrogênio	68
5.2 Remoção de DQO e Eficiência de Consumo de Carboidratos nos reatores	70
5.3 Estudo dos parâmetros cinéticos na produção de hidrogênio	73
5.4 Análise estatística	77
5.4.1 Influência da Matéria orgânica em termos de DQO, Tipo de inóculo e Agitação no Potencial máximo de produção P (mL)	79
i. Influência da Matéria Orgânica em termos de DQO	80
ii. Influência do Tipo de inóculo	82
iii. Influência da agitação.....	82
5.4.2 Influência das interações das variáveis aplicadas no planejamento experimental	82
5.4.3 Análise da Variância e teste-f	83
5.5 Composição dos Metabólitos Solúveis Produzidos (SMPs).....	85
5.6 Avaliação da diversidade microbiana através da técnica de Biologia Molecular	91
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	94
7 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	96
REFERÊNCIAS.....	97
APÊNDICE I – DADOS DA PRODUÇÃO ACUMULADA DE H₂ AO LONGO DO TEMPO PARA OS REATORES	107

1 INTRODUÇÃO

A demanda global por energia tem crescido de maneira acelerada, vários estudos têm sido realizados para encontrar alternativas energéticas viáveis que possibilitem a redução da dependência dos combustíveis fósseis que representam hoje, cerca de 85% das fontes não renováveis em relação a matriz energética mundial e 52,6% em relação a matriz brasileira (EPE, 2023). Nesta perspectiva, houve um avanço na participação de energias renováveis na matriz energética brasileira ao longo dos últimos anos, em 2013, a participação de energia renovável na matriz era cerca de 40,6% e atualmente esse número aumentou para 47,4% (EPE, 2023).

Diante da questão ambiental e da necessidade energética, vários estudos vêm sendo desenvolvidos na busca de fontes de energia renovável e o processo de digestão anaeróbia apresenta-se como uma interessante opção, pois, além de viabilizar o tratamento de efluentes, possibilita a produção de energia renovável pela bioconversão de matéria orgânica em biogás (SILES et al., 2010). Os processos biológicos apresentam como vantagem o baixo custo e a utilização de diversos resíduos industriais e domésticos ricos em carboidratos como substrato, minimizando os problemas causados decorrente do descarte inadequado desse material (DAS e VERZIROGLU, 2001).

O Brasil ocupa atualmente o terceiro lugar entre os maiores produtores de cerveja do mundo, onde a produção atingiu a marca de 14,1 bilhões de litros por ano, o que representa 1,6% do Produto Interno Bruto (PIB) nacional (CERVBRASIL, 2023). O setor cervejeiro vem ganhando destaque na última década, principalmente no mercado das microcervejarias e cervejarias artesanais, por apresentarem produtos diferenciados que se utilizam de matéria prima de alta qualidade (nobre) e métodos de produção específicos para o estilo de cerveja proposto, tais como diferentes tempos e temperaturas utilizadas na etapa de mosturação, fermentação e o uso de ingredientes como milho, arroz, mel, frutas, trigo e outros que conferem aroma e sabor (SOARES, 2011).

Em contrapartida, esse grande incremento na produção acarreta o aumento dos resíduos gerados pelo setor, em decorrência do alto volume de água necessária no processo de fabricação, seja no resfriamento, geração de vapor e lavagem de embalagens e maquinário. De acordo com Maintinguer (2017), para cada litro de cerveja produzida é gerado de 3-10 litros de água residuária ou efluente, podendo variar sua composição e quantidade de acordo como o

tipo de cerveja produzida, tipo de levedura e outras matérias primas, além das etapas de limpeza utilizadas no processo produtivo.

Desse modo, o efluente de cervejaria pode ser considerado um substrato potencial para a produção de biogás, uma vez que apresenta elevada carga orgânica e alguns nutrientes que, geralmente não atendem aos padrões de lançamento determinados pelas leis ambientais (CONAMA, 2011). Em geral, os resíduos da cerveja são caracterizados pela alta concentração de matéria orgânica e alto teor de sólidos suspensos, além de outros elementos, evidenciando o alto poder poluidor do efluente. Sendo assim, é indispensável o tratamento desses efluentes após o processo de fabricação, antes de realizar seu descarte final (SHAO et al., 2008).

Embora tenha ocorrido avanços significativos no tratamento de efluentes, eles ainda são um problema crítico, do ponto de vista ambiental, pois é de difícil gerenciamento e encarado com frequência por muitas indústrias como uma obrigação onerosa (CHAN et al., 2009). Considerando os benefícios ambientais e energéticos por meio do tratamento anaeróbio, torna-se pertinente o presente trabalho visando uma avaliação da produção de hidrogênio por fermentação anaeróbia utilizando como substrato resíduo da indústria cervejeira.

Neste sentido, o trabalho utilizou o processo de digestão anaeróbica para produção de hidrogênio, demonstrando a viabilidade de produção de energia alternativa, além de contribuir no tratamento para o efluente líquido oriundo de cervejaria artesanal, utilizando a fermentação natural (autofermentação) como inóculo, minimizando os problemas ambientais gerados pela sua disposição inadequada. O tipo de inóculo é um aspecto importante no desempenho da digestão anaeróbia, uma vez que fornece a comunidade microbiana responsável pela degradação da matéria orgânica (SOUZA et al., 2020).

Muitos microrganismos produtores de hidrogênio podem ser encontrados em ambientes naturais (WANG e WAN, 2009), assim a fermentação natural se torna uma opção viável para ser usada como inóculo para digestão de diversos substratos. Alguns estudos vêm sendo desenvolvidos, como Penteado (2012) estudou a influência do inóculo na produção de hidrogênio, obtendo maiores rendimentos de hidrogênio quando utilizou a autofermentação comparado aos reatores inoculados com outros tipos de inóculos. Assim como, Fernandes (2008) utilizou a autofermentação na inoculação de reatores para produção de hidrogênio e obteve bons resultados. Entretanto, poucos estudos são encontrados utilizando a

autofermentação como inóculo em reatores de digestão anaeróbia, porém é possível utilizar o próprio substrato fermentado por meio de microrganismos encontrados na atmosfera e no próprio resíduo, principalmente nos substratos que são ricos em leveduras, como é o caso do resíduo de cervejaria, se apresentando como um benefício por não necessitar de outro tipo de inóculo para o processo. Dessa forma, é interessante analisar se a fermentação natural será de fato uma eficiente alternativa no processo de digestão anaeróbia, contribuindo na conversão de matéria orgânica em biogás.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a produção de hidrogênio em reator anaeróbio em batelada a partir do resíduo de cervejaria artesanal.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar os efeitos das variáveis Demanda Química de Oxigênio (DQO), tipo de inóculo e velocidade de agitação, procurando encontrar as melhores condições operacionais.
- Avaliar a eficiência do processo de digestão anaeróbia por meio da produção de hidrogênio.
- Determinar a eficiência de remoção de matéria orgânica e consumo de carboidratos no processo.
- Identificar os metabólitos solúveis produzidos na degradação anaeróbia do substrato.
- Caracterizar o consórcio microbiano através da biologia molecular.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

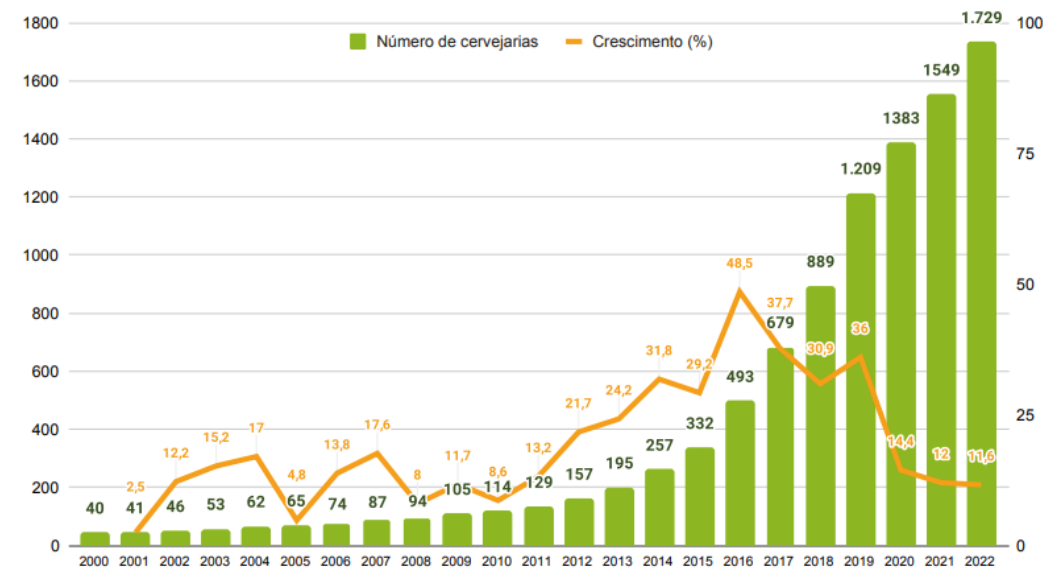
Nessa seção será apresentado o cenário geral da indústria cervejeira, o processo de produção da cerveja dentro de um contexto histórico até os dias atuais, assim como, o processo de produção e a problematização dos resíduos gerados nesse setor. Ademais, abordará o processo de digestão anaeróbia visando a produção de hidrogênio, além de estudos anteriores que nortearam e colaboraram com esse estudo.

3.1 Indústria Cervejeira

No contexto mundial, o mercado cervejeiro vem crescendo aceleradamente nos últimos anos e continua em constante ascensão. No cenário brasileiro, esse setor também está em expansão, movimentando uma grande cadeia produtiva, sendo responsável por cerca de 2% do PIB nacional (CERVBRASIL, 2023). A indústria cervejeira tem contribuído com o desenvolvimento do país por meio da criação de emprego e renda, aproximadamente 42 mil empregos diretos e 107 bilhões de faturamento foi gerado, segundo anuário divulgado de 2017 (CERVBRASIL, 2023).

De acordo com o anuário de 2022, divulgado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária de Abastecimento (MAPA, 2023), o Brasil já tem mais de 1729 estabelecimentos registrados como mostra a Figura 1, se consolidando como o terceiro maior fabricante mundial de cerveja, com produção de 14,1 bilhões de litros por ano, atrás somente da China (46 bilhões e dos Estados Unidos, 22,1 bilhões). Em 2020, houve o registro de 204 novas cervejarias e outras 30 cancelaram seus registros, o que representa um aumento de 174 cervejarias em relação ao ano anterior, alta de 14,4% (SINDCERV, 2021).

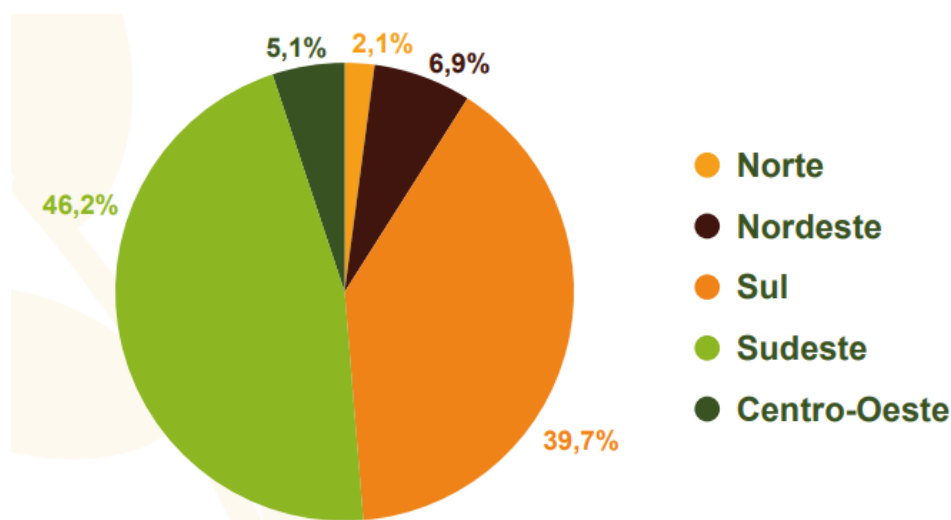
Figura 1: Gráfico do total de cervejarias registradas no Brasil



Fonte: MAPA (2023)

A região sul e sudeste apresenta o maior número de cervejarias, com 798 estabelecimentos, o que representa 46,2% do total de cervejarias do Brasil (Figura 2). O estado de São Paulo mantém a liderança como o estado com maior número de cervejarias registradas, com a marca de 387 cervejarias, enquanto os estados do Distrito Federal, Pernambuco, Maranhão, Mato Grosso do Sul, Alagoas, Tocantins, Acre, Amapá e Roraima mantiveram em 2022 o mesmo número de cervejarias registradas que apresentavam em 2021 (MAPA, 2023).

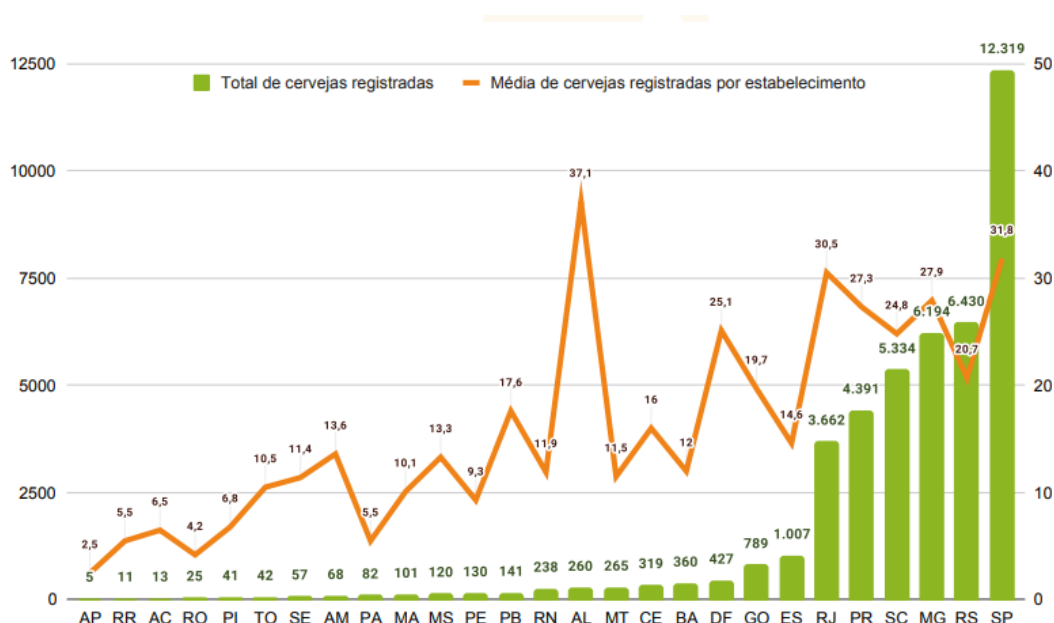
Figura 2: Percentual de cervejarias por região.



Fonte: MAPA (2023)

Após a concessão do registro da cervejaria, é necessário o registro do produto que pretende ser comercializado. Em 2022, O total de registros alcançou o número de 42.831 produtos por estabelecimentos (Figura 3), o que representa um crescimento de 19,8% em relação a 2021, tendo São Paulo liderando com maior número de produtos, cerca de 12.319. Alagoas apresenta uma elevação na média de 37,1 produtos registrados por estabelecimentos, atingindo a média mais elevada entre todos os estados, fato que pode ser analisando também na Figura 3.

Figura 3: Total de produtos registrados por Unidade da Federação



Fonte: MAPA (2023)

Segundo Matos (2011), existem as grandes empresas com capacidade de larga produção, visando produtos mais populares, em especial a cerveja tipo *pilsen*. E existe outra parcela de cervejarias que possuem produção mais específica, com produtos diferenciados, numa escala menor, produzindo produtos com alta qualidade, se destacando por apresentar características específicas, tais como a cor, o sabor, os aromas, o teor alcoólico, amargor, entre outros. Esse tipo de mercado vem ganhando adeptos, as cervejarias com conceito artesanal cresceram cerca de 37,7% no ano de 2017, segundo dados do MAPA (2018).

Diante dessa crescente, os produtores de cerveja artesanal vêm diversificando os produtos, oferecendo cada vez mais produtos distintos daqueles ofertados pelas grandes empresas, com diferencial no sabor e na qualidade, agregando mais valor à bebida. Importante

ressaltar, que esse tipo de produto não compete de forma direta com as grandes indústrias cervejeiras, pois atende um consumidor final com uma exigência sensível diferenciada, representando cerca de 1,5 % das vendas totais de cerveja no país (MAPA, 2018).

No Brasil, a legislação brasileira, mais precisamente na Instrução Normativa nº 65, de 10 de dezembro de 2019, conforme definido no art. 36, do Decreto nº 6.871, de 2009, conceitua cerveja como “bebida resultante da fermentação, a partir da levedura cervejeira, do mosto de cevada malteada ou de extrato de malte, submetido previamente a um processo de cocção adicionado de lúpulo ou extrato de lúpulo, hipótese em que uma parte da cevada malteada ou do extrato de malte poderá ser substituída parcialmente por adjunto cervejeiro” (BRASIL, 2019). As cervejas artesanais, especiais ou *premium* ainda não possuem legislação específica para regulamentação no Brasil.

Diferente do que se imagina, a cervejaria artesanal não se limita a produção caseira. O Brasil, já é conhecido internacionalmente pelos produtos de alta qualidade produzido, de forma que, hoje as cervejas traduzem um pouco da cultura local e a tradição de cada região do país. Uma das mais expressivas cervejas artesanais no cenário brasileiro é a Colorado, já recebeu vários prêmios pelos seus rótulos e hoje é conhecida mundialmente (D’AQUINO, 2019).

Em se tratando de um cenário local, o estado de Alagoas vem ganhando destaque em razão dos vários rótulos disponíveis e já é o terceiro estado do Nordeste com maior número de registros de cervejarias. Segundo MAPA (2019), o estado possui 136 tipos de cervejas artesanais registradas, além disso, Alagoas possui vários rótulos premiados nacionalmente. A primeira cervejaria está localizada no município de Maceió, foi inaugurada no ano de 2014 e atualmente conta com um portfólio de 7 (sete) estilos diferentes de chopp e cerveja.

3.2 Processo de produção da cerveja

A cerveja é uma bebida bem antiga, de acordo com Morado (2011), é possível que tenha surgido 9.000 a.C., porém só após o século VI começou a ser produzida em maior escala. Acredita-se que tenha sido descoberta por acaso, pelo fato de possuir os mesmos ingredientes do pão, e estes, sendo em uma determinada época da civilização os produtos que faziam parte da base alimentar e da cultura de vários povos. Vários registros, como desenhos rupestres e símbolos primitivos remetem a produção de bebida que se assemelham a cerveja, que de acordo

com estudiosos servia como moeda de troca, remédios e oferenda aos deuses (MORADO, 2011).

No Brasil a cerveja chegou com as colônias europeias, com vários comerciantes se instalando no país e daí iniciaram a comercialização de uma bebida que até então era desconhecida, influenciando na cultura local. Após a primeira Guerra Mundial, ficou difícil obter malte e lúpulo que vinham da Alemanha e Áustria e por consequência, os cervejeiros começaram a procurar no Brasil matéria prima que pudesse substituir esses insumos. Foi então, que iniciou a utilização de milho, arroz e trigo, mas tudo sem grande controle de fermentação.

A primeira cervejaria em escala industrial se consolida no estado de Porto Alegre, entre 1870 e 1880, após o surgimento das primeiras máquinas frigoríficas, possibilitando um maior controle na temperatura de fermentação, o que levou a migração e expansão das fábricas até os dias de hoje.

A cerveja é considerada uma bebida carbonata de teor alcoólico que pode variar de 3 a 8 % (v/v) de forma geral é produzida a partir da água, malte, lúpulo e levedura (fermento), permitindo também o uso de outras matérias primas como trigo, arroz, milho (ALMEIDA e SILVA, 2005; PEDROSO, 2012). A Figura 4, mostra as matérias primas para composição geral da cerveja.

Figura 4: Matéria prima básica para composição da cerveja



Fonte: Autora (2023).

3.2.1 Água

A água representa cerca de 90 % da composição da cerveja, sendo assim as características físico-química e microbiológica da água influenciam diretamente na qualidade da cerveja produzida. Para isso, é indispensável um criterioso acompanhamento dessa matéria prima, sendo necessário que tenha ausência de cor e turbidez, pois os sólidos presentes podem interferir no sabor e ainda servir de alimento para os microrganismos. Além disso, é importante que a água tenha um alto teor de cálcio e magnésio, nutrientes necessários para fermentação das leveduras (ROSA e AFONSO, 2015).

De acordo com a CERVBRASIL (2022), cerca de 4,5 L de água é utilizado para cada litro de cerveja produzido.

3.2.2 Malte

O malte é um ingrediente básico no processo de fabricação da cerveja, basicamente é um cereal que passa por um processo de malteação. Esse processo consiste na quebra do grão com o intuito de ativação de enzimas necessárias para hidrólise de polissacarídeos e amido presentes (BRIGGS, 1998). Esse processo ocorre em 3 etapas, inicia-se com a maceração, onde os grãos recebem água para iniciar a germinação; a germinação com controle de temperatura, umidade, oxigênio e CO₂ e finalizando com a secagem e armazenamento (SILVA e FARIA, 2008).

3.2.3 Lúpulo

O lúpulo é uma planta que possui os sexos feminino e masculino, porém, a parte de interesse para fins cervejeiros são as flores da planta fêmea. É considerado o ingrediente responsável por conferir amargor e aroma à cerveja, no entanto existem lúpulo com características aromáticas (composto por óleos essenciais) e outros com características mais amargas em virtude dos alfa-ácidos presentes, a dosagem dessa combinação é realizada de acordo com o tipo e aspecto de cerveja que se pretende produzir (REBELLO, 2009)

Uma característica importante é poder bactericida que possui, inibindo a proliferação de bactérias indesejáveis e favorecendo a conservação natural e prolongamento da vida útil da cerveja (PALMER, 2022)

3.2.4 Levedura

A levedura pode ser denominada como um agrupamento de fungos unicelulares e dentre a mais conhecida e utilizada está o gênero *Sacharomyces*, principalmente por realizar processo de fermentação, responsável pela fermentação de açúcares de arroz, trigo, malte para obtenção de bebidas alcoólicas (MATUO et al., 2012). Especialmente conhecida como a levedura da cerveja, a *Saccharomyces cerevisiae* se classifica como um fungo unicelular que se multiplica por gemulação, ou seja, através de brotos ou por esporulação.

Diversas linhagens do gênero *Saccharomyces* são capazes de produzir etanol e dióxido de carbono, dois dos principais metabólitos primários na produção de cerveja (VENTURINI FILHO, 2010). As cervejas podem ser classificadas quanto ao seu tipo de fermentação, sendo as *Ale* conhecidas como cervejas de alta fermentação, por utilizarem a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Enquanto, as *Lagers*, são cervejas de baixa fermentação, por serem fermentadas pela *Saccharomyces. Pastorianus* (GIBSON et al., 2017).

Após o processo de fermentação do malte, as leveduras de baixa fermentação (5 – 10 °C) decantam e vão para o fundo dos fermentadores; as de alta fermentação (12 – 15 °C), flutam para superfície (REBELLO, 2009). Strong e England (2015) caracterizam o estilo *Pilsen* como uma cerveja amarga, de corpo leve, de cor dourada e baixa fermentação, pois produz CO₂ lentamente, levando entre 10 a 14 dias para que ocorra todo processo fermentativo.

3.2.5 Etapas de produção da cerveja

O processo produtivo da cerveja pode variar de acordo com a planta de cada indústria, porém, existem etapas consideradas básicas para produção industrial de cerveja, que se inicia com moagem do malte por processos mecânicos, normalmente com auxílio de moinhos. Nessa etapa, ocorre a quebra das cascas deixando o amido exposto para etapa posterior.

Em seguida, é adicionada água quente a matéria prima moída com intuito de obter uma mistura açucarada por meio de reações químicas e enzimáticas, essa mistura é chamada de mosto e é deixada em repouso para mosturação (HUGHES, 2014). Após finalização da conversão de amido em açúcares fermentescíveis (maltose, glicose e maltotriose), o mosto é extraído e transferido para um tanque de cozimento, onde passará por fervura. A parte sólida, conhecida como *trub* pode ser reaproveitada para fabricação de ração animal.

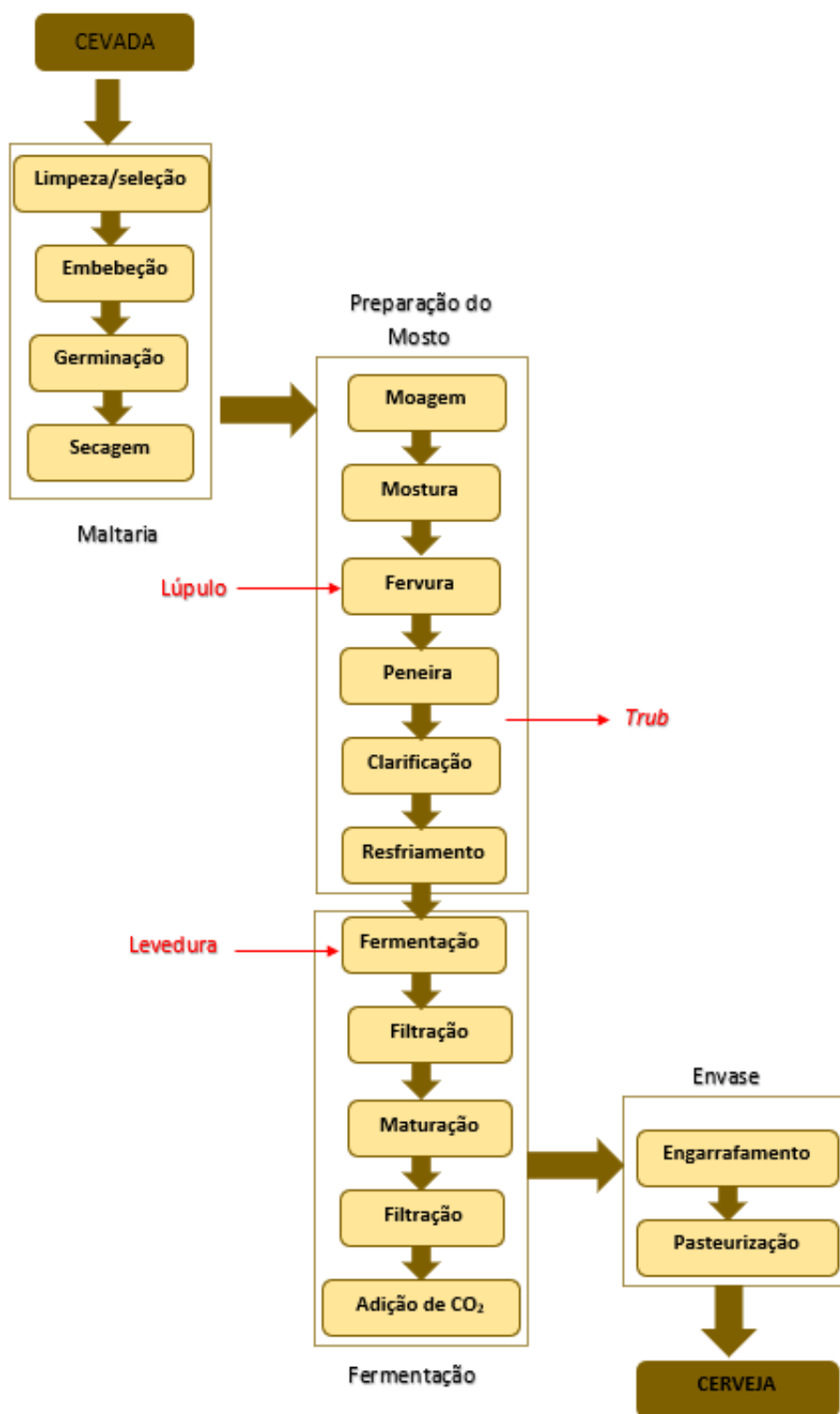
Nessa fase de cozimento é adicionado o lúpulo para desenvolver as características sensoriais de amargor e aroma da cerveja. É uma etapa essencial para esterilização da cerveja e evaporação de parte líquida (KUNZE, 2007).

Após fervura, o mosto é resfriado por trocadores de calor até a temperatura ideal para inoculação das leveduras e encaminhados para os fermentadores. Ao atingir a temperatura determinada pelo cervejeiro é realizada a aeração e então adicionado a levedura. Essa etapa é considerada a mais preocupante, visto que, quando se trabalha com microrganismos vivos, qualquer interferência ou contaminação pode interferir na qualidade do produto (MORADO, 2011).

Ao final da fermentação, a cerveja é resfriada, a levedura inativada é decantada e retirada posteriormente pela parte inferior dos fermentadores tendo início a maturação. Essa etapa pode levar de 6 a 30 dias a depender da cerveja que está sendo produzida. Na maturação ocorre o aprimoramento do aroma e do sabor do produto. Para finalizar, a cerveja é filtrada, removendo as partículas suspensas, principalmente leveduras e substâncias de cor desagradável para a cerveja, deixando a bebida com aspecto cristalino (KUNZE, 2007; ROSA e AFONSO, 2015).

Para finalizar o processo produtivo, a cerveja é armazenada e mantida a temperatura baixa em tanques pressurizado e adicionado CO₂ para incorporar a bebida. Em seguida, ocorre o envase em garrafas ou latas. Nesta etapa é fundamental evitar contaminações e para isso é realizado a higienização das garrafas e latas em que são armazenados a cerveja. O fluxograma das principais etapas do processo produtivo da cerveja é apresentado na Figura 5.

Figura 5: Fluxograma das etapas básicas do processo produtivo de cerveja



Fonte: Autora (2023).

3.3 Resíduo de Cervejaria: Características e problematização

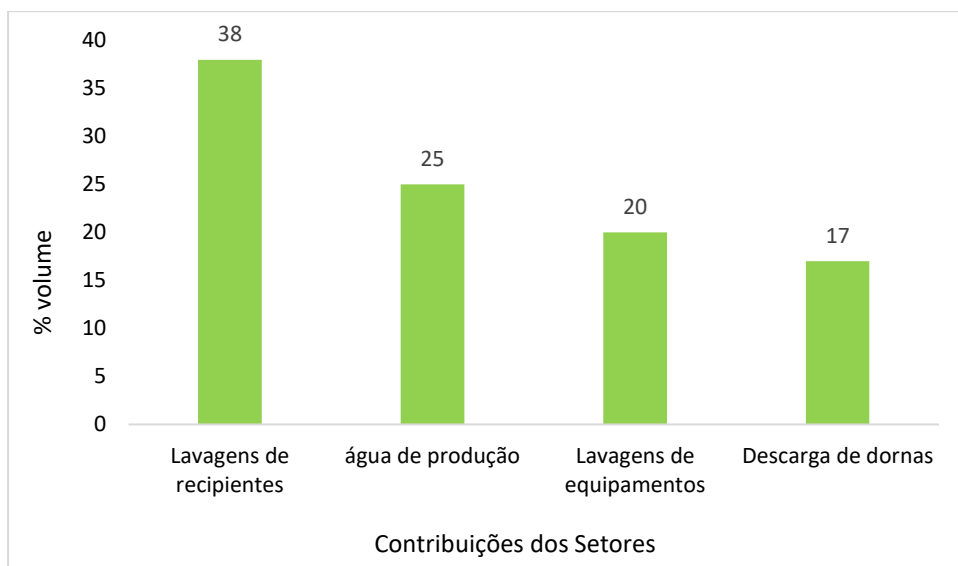
A grande expansão da indústria cervejeira impulsionada pelo alto consumo da bebida no mundo, proporciona um avanço no desenvolvimento econômico. Em contrapartida, a alta produção acarreta o aumento dos resíduos gerados pelo setor, em decorrência da grande quantidade de água necessária no processo de fabricação. De acordo com MAINTINGUER (2017), para cada litro de cerveja produzida é gerado de 3 - 10 litros de efluente, podendo variar sua composição e quantidade de acordo como o tipo de cerveja produzida, tipo de levedura e outras matérias primas, além das etapas de limpeza utilizadas no processo produtivo (GUERREIRO, 2006).

A água residuária de cervejaria é resultado de várias etapas do processo, desde o efluente gerado no beneficiamento da matéria prima, resíduos gerados nas lavagens de equipamentos, utensílios, higienização de dornas, filtros, pisos, entre outros (ARANTES, ALVES e SILVA, 2017). Além disso, há também os subprodutos gerados ao longo do processo, como bagaço de malte e levedura excedente provenientes da etapa de fermentação, bastante rico em compostos orgânicos (SIMATE, 2011) e quando misturados com o efluente potencializam as características poluidoras.

O bagaço de malte, constituído principalmente de celulose (16 - 21%), hemicelulose (15 - 29%), lignina (19 - 28%) e proteínas (24 - 39%) (SANTOS, 2014) corresponde cerca de 85% do total de resíduos obtidos da indústria cervejeira (DRAGONE e ROBERTO, 2010). A levedura excedente é resultante da floculação de partículas insolúveis e sedimentação natural da levedura constituindo um lodo presente nos fundos dos tanques de maturação e fermentação (FILLADEAU, 2006), representando apenas 3% do volume da água residuária.

As diversas operações que ocorrem nesse processo produtivo levam à geração de grandes quantidades de efluentes com alta carga orgânica e necessita de um tratamento antes de serem lançadas nos corpos d'água. A Figura 6, mostra os setores responsáveis pela geração de água residuária e a contribuição de cada um na indústria cervejeira, de acordo com Arantes, Alves e Silva (2017).

Figura 6: Setores responsáveis pela geração da água residuária da indústria de cerveja



Fonte: Adaptado a Arantes, Alves e Silva (2017).

A composição e as características da água residuária de cervejaria é bem diferenciada, de acordo com a literatura, apresenta uma ampla faixa de variação de alguns parâmetros como a DQO, pode variar de 2,00 a 32,50 g/L e proporcionalmente a quantidade de sólidos, visto que a DQO aumenta em razão da presença de sólidos. A Tabela 1, apresenta características físico-química da água residuária relatadas na literatura.

Tabela 1: Características Físico-química do efluente de cervejaria

Referência	pH	DQO (g. L⁻¹)	N-Total (g. L⁻¹)	P-Total (g. L⁻¹)	SST (g. L⁻¹)	SSV (g. L⁻¹)
SHAO et al. (2008)	3,20 – 3,90	22,50 – 32,50	0,32 - 0,45	0,14 – 0,22	-	1,40 – 4,80
SHI et al. (2010)	-	2,400	0,09		0,62	-
SIMATE (2011)	3,00 – 12,00	2,00 – 6,00	0,02 – 0,08		5,00 – 8,75	2,90 – 3,00
CHEN et al. (2015)	5,20 – 6,20	8,00 – 14,00	0,08 – 0,28	0,020– 0,09	0,50 – 1,30	0,38 – 1,10
ENITAN et al. (2015)	6,90	2,00	-	0,02	2,45	1,88
PACHIEGA et al. (2019)	5,65	2,55	-	-	-	-

(-) dados não disponíveis

Fonte: Autora (2023).

Em geral, os resíduos da cerveja são caracterizados pela alta concentração de matéria orgânica e alto teor de sólidos suspensos, além de outros elementos, evidenciando o alto poder poluidor do efluente. Sendo assim, é indispensável o tratamento desses efluentes após o processo de fabricação, antes de realizar seu descarte final (SHAO et al., 2008). Embora tenha ocorrido avanços significativos no tratamento de efluentes, eles ainda são um problema crítico, do ponto de vista ambiental, pois é de difícil gerenciamento e encarado com frequência por muitas indústrias como uma obrigação onerosa (CHAN et al., 2009),

Sendo assim é fundamental que exista várias alternativas para o tratamento e despejo adequado do efluente de cervejaria, visto que, parte dessas empresas ainda utilizam fossas sépticas como opção para o descarte. Demonstrando a grande relevância desse estudo em investigar o aproveitamento do resíduo para produção de energia atrelado a redução da carga poluidora por meio de tratamento biológico. Nesse sentido, é possível o tratamento do efluente e ainda a redução de custos da indústria com a produção de energia que possivelmente pode ser revertida para vários segmentos do processo industrial, tornando-se uma alternativa sustentável do ponto de vista ambiental, social e econômico.

De acordo com a Resolução CONAMA nº 237 de 1997, a fabricação de cerveja deve apresentar licenciamento ambiental para sua instalação e operação. O licenciamento ambiental foi estabelecido como um dos instrumentos da Política Nacional do Meio Ambiente, instituída pela Lei nº 6.938 de 1981, que tem por objetivo a preservação, melhoria e recuperação da qualidade ambiental propícia à vida, visando assegurar, no país, condições ao desenvolvimento socioeconômico, aos interesses da segurança nacional e a proteção da dignidade da vida humana.

O Conselho Estadual de Proteção Ambiental (CEPRAM) é o órgão responsável por definir os procedimentos de aprovação dos processos de licenciamento das atividades de microcervejarias do Estado de Alagoas, além de aprovar a listagem das atividades consideradas potencialmente causadoras da degradação ambiental que são passíveis de licenciamento ambiental pelo Instituto do Meio Ambiente do Estado de Alagoas (IMA/AL).

Através da Resolução de nº 10/2018 a indústria responsável pela fabricação e engarrafamento de cervejas e chopps, são obrigadas a apresentar um diagnóstico ambiental contendo a descrição sucinta dos impactos resultantes da implantação do empreendimento, e a definição das medidas mitigadoras, de controle e compensatórias, se couber.

Tendo em vista a preservação dos padrões de qualidade ambiental, novas legislações que estabelecem o procedimento de conduta das indústrias em relação à disposição final do efluente devem ser homologadas após intensas pesquisas a respeito das características físico-químicas e sua interação sobre o meio ambiente.

3.4 Digestão Anaeróbia

Ao longo dos anos, o aumento do número de pesquisas relacionadas ao processo de digestão anaeróbia vem provocando mudanças na concepção dos sistemas de tratamento de águas residuárias e na produção de combustível, tais estudos vem contribuir na construção de sistemas simplificados e mais eficientes, aliados ao baixo custo.

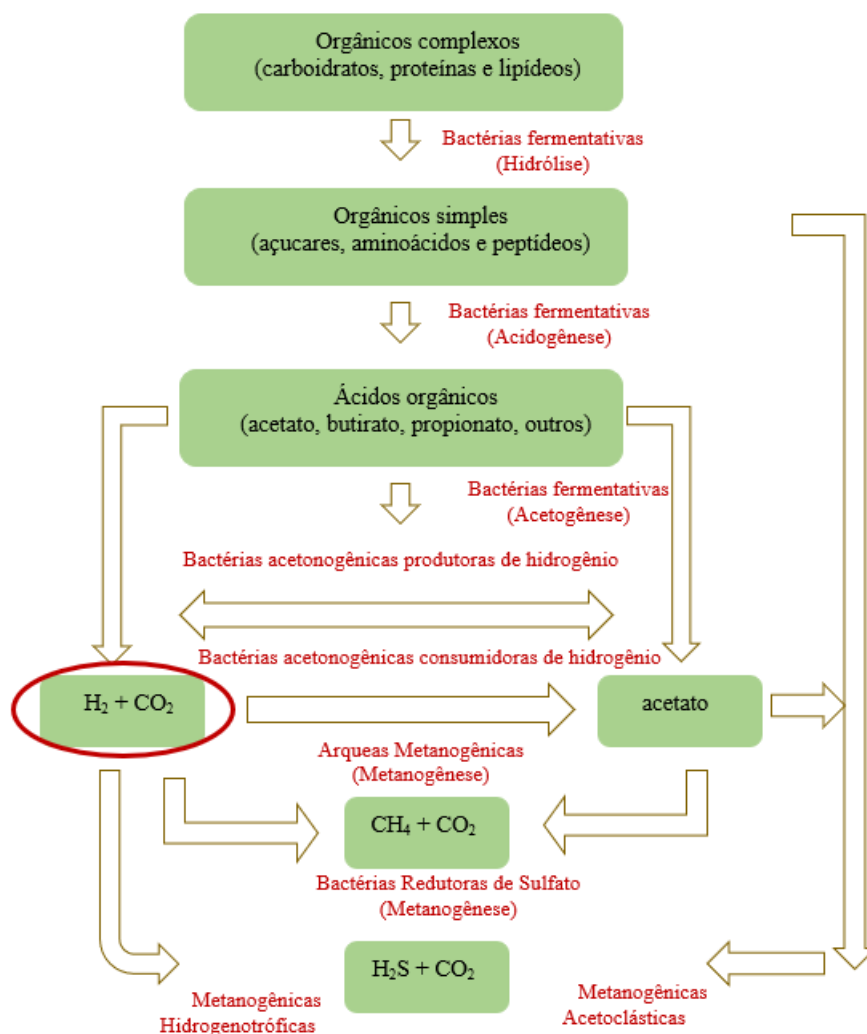
A Digestão Anaeróbia é um processo fermentativo microbiano onde a matéria orgânica, na ausência de oxigênio livre, é convertida a gases compostos, predominantemente de metano, dióxido de carbono (MASSEY e POHLAND, 1978). Segundo CHERNICHARRO (1997), a digestão anaeróbia pode ser considerada como um ecossistema onde diversos grupos de microrganismos trabalham interativamente na conversão da matéria orgânica complexa em metano, gás carbônico, água, gás sulfídrico e amônia, além de novas células bacterianas e podem-se distinguir quatro etapas diferentes no processo global da conversão.

A digestão é utilizada no tratamento de efluentes para estabilização de grande parte da matéria orgânica, apresentando várias vantagens em relação à digestão aeróbia, salientando a baixa geração de lodo, baixo consumo de energia, baixa demanda de área, baixos custos de implantação e o uso do biogás produzido como combustível (WEBER, 2006; CHEN et al., 2015). Porém, esses processos muitas vezes não conseguem reduzir a carga orgânica poluidora em sua totalidade, necessitando de um tratamento complementar.

Inicialmente, esse processo foi utilizado para reduzir a poluição causada pela disposição descontrolada dos efluentes no meio ambiente. Depois, com a crise do petróleo na década de 70, aumentou-se a procura, como alternativa de fonte de energia renovável. Os biodigestores anaeróbios têm sido amplamente utilizados para tratamento de resíduos sólidos, além de efluentes de indústrias agrícolas, alimentícias e de bebidas.

Para a indústria cervejeira, a digestão anaeróbia é uma importante aliada, pois além de realizar o tratamento do efluente que é gerado em grande quantidade, é possível a geração de energia que pode ser utilizada dentro da própria planta, reduzindo custos da indústria. Vários trabalhos têm reportado a digestão como uma alternativa para esse fim, mas em sua grande maioria os estudos têm como objetivo a produção de metano (CH_4). Em contrapartida, o uso da digestão para a produção de hidrogênio (H_2) ainda é bastante emergente nesse cenário, atraindo pesquisadores para desbravar mais esse universo. Pois é sabido que o H_2 é um produto de alto valor agregado e de alta capacidade energética (ARANTES, ALVES E SILVA, 2017), pode ser produzido de forma biológica por fermentação, envolvendo baixo custo de energia, em condições ambientes de temperatura e pressão, além da possibilidade de utilização de vários substratos. A Figura 7, mostra as rotas metabólicas envolvidas no processo de digestão.

Figura 7: Rotas metabólicas e grupos microbianos envolvidos no processo de digestão anaeróbia.



Fonte: Adaptado Lettinga et al. (1996).

3.4.1 Hidrólise

Os microrganismos não são capazes de assimilar a matéria orgânica complexa, assim todo material orgânico particulado é convertido em compostos dissolvidos de menor peso molecular. Esse processo requer a interferência das exo enzimas que são excretadas pelas bactérias fermentativas hidrolíticas. Sendo assim, as proteínas são degradadas para formar aminoácidos; os carboidratos se transformam em açúcares solúveis (mono e dissacarídeos) e os lipídeos são convertidos em ácidos graxos de cadeia longa de carbono e glicerina.

3.4.2 Acidogênese

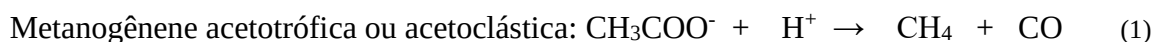
Nessa etapa do processo os compostos dissolvidos que foram gerados na hidrólise são absorvidos pelas bactérias fermentativas e, após acidogênese, excretadas como substâncias orgânicas simples como os ácidos graxos voláteis (AGV), álcoois, cetonas, dióxido de carbono e hidrogênio. Microrganismos fermentativos são os primeiros a atuar na etapa sequencial de degradação do substrato, e são os que mais se beneficiam energeticamente (CHERNICHARRO, 1997).

3.4.3 Acetogênese

Na acetogênese os substratos oriundos da etapa anterior (AGV) levam à acidificação do meio e junto aos produtos acetato, H_2 e CO_2 formados são convertidos em substratos para produção de metano por microrganismos metanogênicos. Aproximadamente 70% da DQO digerida é convertida em ácido acético, enquanto o restante é concentrado no hidrogênio formado.

3.4.4 Metanogênese

A etapa final do processo global de conversão de compostos orgânicos em metano e dióxido de carbono é efetuada pelos microrganismos metanogênicos, atualmente classificados dentro do domínio Archea. O metano é produzido pelas bactérias acetotróficas (Equação 1), a partir da redução de ácido acético, ou pelas bactérias hidrogenotróficas (Equação 2), a partir da redução de dióxido de carbono.



As bactérias que produzem metano a partir do hidrogênio crescem mais rapidamente que aquelas que usam ácido acético, de modo que as metanogênicas acetotróficas geralmente limitam a velocidade de transformação de material orgânico complexo.

3.4.5 Sulfetogênese

Quando existe a presença de enxofre no digestor, ocorre a formação de sulfeto por meio das bactérias redutoras de sulfato. Essa redução biológica de sulfato é considerada indesejável em digestores anaeróbios por duas razões: o sulfato oxida material orgânico que deixa de se transformar em metano e no processo forma-se gás sulfídrico, que é corrosivo, além do odor desagradável. Outro ponto importante é que a presença de sulfato promove competição entre as bactérias redutoras de sulfato e as acetogênicas e metanogênicas, reduzindo eficiência do processo.

3.5 Rotas fermentativas

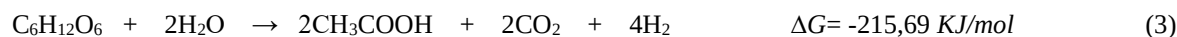
A acidogênese e a metanogênese podem ser consideradas como as etapas básicas do processo biológico anaeróbio, porém a produção de hidrogênio só é observada na acidogênese, pois na metanogênese ocorre a conversão do hidrogênio formado em metano e dióxido de carbono (CHERNICHARRO, 1997).

A etapa fermentativa da digestão anaeróbia é crucial para a produção de hidrogênio. Isto porque é nesta etapa que os microrganismos acidogênicos decompõem os carboidratos, tais como glicose, sacarose em hidrogênio, gás carbônico e ácidos orgânicos voláteis.

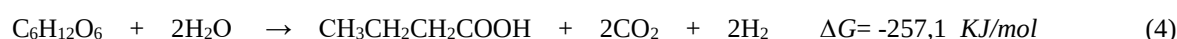
A conversão da glicose em hidrogênio e ácido acético pode ser observada na Reação 3 e a conversão de glicose em hidrogênio e ácido butírico pode ser observada na Reação 4. O ácido acético e o ácido butírico são os principais metabólitos gerados no tratamento de

efluentes, sendo considerados indicadores da produção de hidrogênio, já que a produção desses ácidos leva a formação de hidrogênio (REIS, 2010).

Produção de hidrogênio e ácido acético a partir da glicose



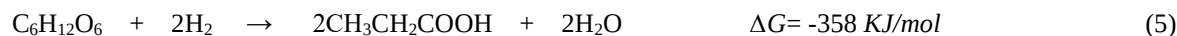
Produção de hidrogênio e ácido butírico a partir da glicose:



A razão entre a produção de ácido acético e ácido butírico é considerado um parâmetro na indicação da produção de hidrogênio. Como a formação do ácido acético produz mais hidrogênio do que a formação do ácido butírico, pode-se concluir que quanto maior for a razão entre as quantidades desses dois ácidos produzidos, maior será a quantidade de hidrogênio obtida (REIS, 2010).

A produção de outros metabólitos, tais como o etanol e o ácido propiônico, devem ser evitadas, pois são consideradas substâncias inibidoras da produção de hidrogênio. O ácido propiônico (Reação 5) reage com a glicose consumindo hidrogênio, já a formação do etanol (Reação 6) a partir da glicose não consome hidrogênio, porém consome o substrato que poderia ser utilizado na formação de hidrogênio (REIS, 2010).

Produção de ácido propiônico a partir da glicose:



Produção do etanol a partir da glicose:



3.6 O Hidrogênio como fonte de energia

O hidrogênio é o elemento químico mais abundante no universo, corresponde a 75% da matéria em massa e o terceiro mais abundante da superfície da terra, além disso, atualmente é um produto de alto valor agregado em virtude do seu uso na geração de energia limpa e

renovável (SHI et al., 2010; ARANTES, ALVES E SILVA, 2017). Em virtude de sua alta reatividade, este elemento é geralmente encontrado em combinação com outros elementos, sendo a água o principal composto (DAS e VEZIROGLU, 2001). Além da água, podemos encontrar o hidrogênio na composição de todos os componentes da matéria viva e de muitos minerais. Em estado livre, o hidrogênio só é encontrado em pequenas quantidades na atmosfera (ROJAS, 2010).

Se caracteriza por ser um gás invisível, leve, atóxico e altamente inflamável, possui elevada capacidade energética, ou seja, alto calor de combustão (122 KJ g^{-1}) comparando com outros combustíveis, como metano ($50,1 \text{ KJ g}^{-1}$), etanol ($26,5 \text{ KJ g}^{-1}$), gasolina ($44,5 \text{ KJ g}^{-1}$) e butano ($49,6 \text{ KJ g}^{-1}$) (ARMAROLI e BALZANI, 2011). Sua utilização pode ser de maneira direta, em motores de combustão ou células combustíveis para produção de eletricidade. Além disso, sua combustão libera apenas vapor de água, assim considerado uma fonte renovável de energia ideal (GUO et al., 2010).

Este gás também pode ser utilizado como reagente em processo de hidrogenação, na indústria química e petroquímica. Entre seus principais usos, calcula-se que cerca de 50% sejam destinados à produção de amônia, 37% para processamento de petróleo e 8 % na produção de metanol (REMAHANDRAN e MENON, 1998).

A produção de hidrogênio como fonte de energia pode ocorrer de diferentes formas, ele deve ser separado e extraído em sua forma molecular, hidrogênio gasoso, dos outros elementos com os quais ele se encontra combinado (ANDRADE, 2007), essa obtenção inclui a eletrólise da água, porém o custo pode ser muito alto em virtude do grande consumo de energia elétrica; a reforma catalítica de compostos orgânicos ricos em hidrogênio; as vias termoquímica, são considerados processos mais comuns, mas que dependem de catalizadores eficazes que em algum momento pode inviabilizar o processo.

A produção biológica de hidrogênio por via fermentativa vem ganhando destaque nesse cenário, principalmente por apresentar baixo custo de consumo energético, já que ocorre em condições ambientes de pressão e temperatura (ARANTES, ALVES E SILVA, 2017). Outro aspecto importante é a grande variabilidade de substratos e inóculos que podem ser utilizados para produção de biohidrogênio, tornando-se um processo sustentável, pois além de geração de energia é capaz de reduzir carga orgânica, contribuindo para o tratamento de efluentes.

3.7 Produção de hidrogênio

Grande parte da demanda energética é suprida por combustíveis fósseis que possuem fonte esgotável e são responsáveis pelas emissões da maior parte dos gases poluidores (DAS e VEZIROGLU, 2001). Diante da preocupação ambiental que vem sendo disseminada cada vez mais em todo mundo, o desenvolvimento de tecnologias visando fontes alternativas de energia que sejam menos poluentes e renováveis se faz cada vez mais necessário.

O hidrogênio (H₂) tem como vantagem a geração de apenas vapor de água na sua combustão (Reação 7), não agredindo o meio ambiente nem contribuindo para o efeito estufa (DAS e VEZIROGLU, 2001), além de possuir maior eficiência de sua combustão nos veículos (CHEONG e HANSEN, 2007), já que possui conteúdo energético aproximadamente 2,5 vezes maior do que qualquer combustível baseado em hidrocarbonetos (ARGUN et al., 2008).



O hidrogênio pode ser produzido além de combustíveis fósseis, através da biomassa, da água e de processos biológicos. A produção de hidrogênio a partir de combustíveis fósseis pode ser feita pelo craqueamento térmico do gás natural, pela oxidação parcial de hidrocarbonetos pesados, pela gaseificação do carvão e pela reforma catalítica de gás natural. Apesar da obtenção do hidrogênio a partir do gás natural ser a forma mais eficiente e barata, o gás natural possui fonte esgotável e a metodologia de obtenção de hidrogênio contribui com as emissões de gases provocadores do efeito estufa (DAS e VERZIROGLU, 2001).

Já a produção de hidrogênio a partir da água pode ser obtida utilizando eletricidade (eletrolise da água ou do vapor), calor (fotólise da água) ou agentes químicos (decomposição termoquímica da água). Entretanto, esses métodos industriais consomem combustíveis fósseis como fonte de energia e, às vezes também hidroeleticidade para quebra de ligações da água. Dessa maneira, a produção de hidrogênio por via termoquímica e eletroquímica não é ambientalmente favorável (DAS e VERZIROGLU, 2001).

Os processos de produção biológica de hidrogênio são mais vantajosos, já que na sua maioria operados à temperatura e pressão ambiente, assim, requerendo menos energia. Além da utilização de recursos energéticos renováveis, podendo utilizar diversos resíduos, que facilita a reciclagem desses resíduos (DAS e VERZIROGLU, 2001).

A produção biológica de hidrogênio pode ser obtida através do processo de fermentação utilizando compostos orgânicos, conduzidos por microrganismos anaeróbios estritos, facultativos ou aeróbios, como *Clostridium*, *Escherichian* e *Bacillus*, respectivamente (VARDARSCHARA et al., 2008). Já o processo de fotossíntese (biofotólise direta e indireta ou fotodecomposição) ou por processos híbridos usando bactérias fotossintéticas e fermentativas, que são dependentes de energia luminosa.

A biofotólise da água consiste na conversão da energia solar em energia química armazenada. Neste caso, a água sofre decomposição através da ação da luz resultando na produção de hidrogênio (BARROS, 2009). Esse processo pode ser considerado econômico e sustentável uma vez que a água é um recurso renovável. A biofotólise direta as algas verdes são as responsáveis pela produção do hidrogênio, enquanto na biofotólise indireta, o hidrogênio é produzido por cianobactérias unicelulares (MANISH e BANERJEE, 2008).

Segundo Das e Veziroglu (2001), na fotodecomposição a produção de hidrogênio é feita na presença constante de iluminação, através de bactérias fotossintetizantes que tem capacidade de converter completamente a glicose presente nos resíduos a gás carbônico e hidrogênio, na presença de luz e ausência de oxigênio.

O gás hidrogênio também pode ser produzido através do processo fermentativo que utiliza bactérias anaeróbias, cultivadas na ausência de fonte de luz (no escuro), também conhecida como *dark fermentation*, a partir de substrato rico em carboidratos (AMORIM, 2009). Este processo apresenta grande vantagem comparada a fotofermentação, por ser um processo que não depende da luz. Além, da ampla variedade de compostos orgânicos que podem ser utilizados como substrato, pela alta velocidade de reação e pela facilidade da reprodução das bactérias fermentativas para suprir o meio de produção (NICODEMOS et al., 2008).

Apesar do gás hidrogênio no processo fermentativo ser obtido em conjunto com o gás carbônico, necessitando fazer a separação desses dois gases, e do rendimento de H₂ ser inferior quando comparados aos demais processos, o processo fermentativo é considerado vantajoso na produção de hidrogênio, além de ser mais estável e simples de ser controlado (AMORIM, 2009).

3.8 Parâmetros que influenciam a produção de hidrogênio por via biológica

Na produção biológica de hidrogênio alguns parâmetros devem ser observados, são eles: pH, substrato, temperatura e tipos de inóculo. Não existe um consenso de qual a melhor concentração do substrato, temperatura ideal para aumentar o rendimento de produção de hidrogênio.

3.8.1 pH

O pH está diretamente associado a produção fermentativa de hidrogênio já que ele pode influenciar a ação da enzima hidrogenase, bem como a rota metabólica (WANG e WAN, 2009), interferindo na eficiência de conversão de substratos e no desempenho dos microrganismos produtores de hidrogênio. Estudos indicam que o aumento do pH afeta a produção de hidrogênio e de ácidos orgânicos (AMORIM, 2009). VAN GINKEL et al., (2001) observaram que baixos valores de pH limitam o crescimento de microrganismos metanogênicos que poderão vir a consumir o hidrogênio. Tais comportamentos ocorrem pelo fato de a produção de hidrogênio ocorrer na fase de crescimento exponencial do microrganismo, e quando essa população atingir a fase estacionária de crescimento haverá uma mudança no processo, ao invés de produzir hidrogênio e ácidos, será iniciada a produção de solventes (BARTACEK, ZABRANSKA e LENS, 2007)

De acordo com vários autores, o controle do pH é um fator limitante na produção de hidrogênio em sistemas anaeróbios e o pH ótimo estaria entre 5,5 e 6,0 para o caso da produção biológica de hidrogênio.

Oh et al., (2003) analisaram o efeito do pH na produção de hidrogênio e concluíram que baixos valores de pH são suficientes para inibir o crescimento de microrganismos metanogênicos. Shi et al (2010), realizou a otimização da produção de hidrogênio a partir de efluente de cervejaria e encontrou um valor de pH ideal de 5,95.

3.8.2 Substrato

Vários substratos têm sido estudados para produção de biohidrogênio, desde os puros como glicose, sacarose, frutose, amido entre outros, até as diferentes águas residuárias oriundas dos processos industriais. A composição do substrato influencia diretamente na digestão anaeróbia, visto que, altas concentrações de macro e micronutrientes e matéria orgânica pode

afetar a biodegradabilidade e com isso influenciar no rendimento do processo (VERONEZE, 2019; ARANTES, 2018). Para que a produção do hidrogênio a partir do processo fermentativo seja considerada sustentável, é necessário que o substrato utilizado obedeça a alguns critérios, são eles: o substrato deve ser rico em carboidratos, ser produzido a partir de recursos renováveis, está em concentração suficiente para que a fermentação e a recuperação da energia sejam energeticamente favoráveis e que, no caso de algum tratamento prévio ser necessário, este seja de baixo custo (LAMAISON, 2009).

Muitos autores procuram encontrar uma composição e relação de nutrientes favoráveis para produção de hidrogênio. Sabe-se que as relações C/N e C/P provocam um efeito no rendimento e na taxa de produção, de forma que concentrações muito alta podem se tornar fatores limitantes no processo, em outros casos, quando as concentrações são baixas existe a necessidade de suplementação do meio (PEIXOTO, 2008).

A glicose, a sacarose e a lactose são os substratos preferidos para a produção fermentativa de hidrogênio, porém essas são fontes puras de carboidratos que podem tornar o processo inviável economicamente. Considerando esse ponto de vista, necessita-se desenvolver mais estudos utilizando resíduos que contenham o mesmo potencial (KAPDAN e KARGI, 2006), como os resíduos e efluentes ricos em carboidratos gerados por alguns processos industriais, tais como os efluentes da indústria de laticínios (BERGAMASCO e TAVARES, 1997), a manipueira (COLIN et al., 2007; FERRAZ, 2013; LAMAISON, 2009; CAMPPELLETTI, 2009), as águas residuárias da indústria de refrigerantes (WEBER, 2006; PEIXOTO, 2008), vinhaça (LAZARO, 2012; RIBAS, 2006; TELLES, 2015), etc.

Pachiega (2019) utilizou diferentes substratos puros (frutose, glicose, sacarose e xilose) em várias concentrações (2, 5 e 10 g. L⁻¹) para produção de hidrogênio em condições mesófilas e observou que a melhor condição de produção de hidrogênio foi no reator alimentado com 5 g. L⁻¹ de frutose, obtendo rendimento de 1,5 mol de H₂. mol⁻¹ frutose. Já Shi et al. (2010), utilizou um planejamento experimental de Box-Benken para encontrar condições ótimas de produção de H₂, avaliando os efeitos do pH, temperatura e concentração do efluente de cervejaria (2, 7 e 12 g. L⁻¹) alcançando uma produção de 149,6 mL de H₂, nas condições 35,9°C, pH 5,95 e 6,05 g. L⁻¹ como concentração ideal. Foi verificado que em ambos os estudos ocorreu a queda no rendimento com aumento da concentração de substrato. Sabe-se que concentrações mais elevadas do substrato podem aumentar a eficiência da produção fermentativa de hidrogênio, mas quando o substrato excede um nível de limiar também podem ocorrer inibições

na produção, desse modo ainda não foi encontrada uma concentração ideal de substrato a ser utilizada (LAY et al., 2010).

3.8.3 Temperatura

De acordo com Sanchez et al., (2001), pesquisas têm registrado a aplicação do processo anaeróbio em diferentes faixas de temperatura. Segundo REIS (2010), estas faixas de temperaturas estão associadas ao crescimento microbiano, além disso a temperatura de operação para a produção de hidrogênio depende do tipo de inóculo, podem ser classificadas como: faixa psicrófila (0 - 20°C); faixa mesófila (30 - 40°C) e faixa termófila (45 - 65 °C) (LEE, SHOW e SU, 2011).

A temperatura age na produção de hidrogênio por estar associada com a atividade microbiana e com a solubilidade do hidrogênio na fase aquosa (FERNANDES, 2008). A maior parte dos estudos sobre a influência da temperatura na produção de hidrogênio indicam a faixa mesófila (de 30 a 40 °C) como a melhor faixa (REIS, 2010), visto que muitas bactérias produtoras de hidrogênio, tais como *Clostridium*, apresenta 37°C como temperatura ótima.

WANG e WAN (2009) relataram que o aumento da temperatura em uma faixa adequada resultaria no incremento da capacidade dos microrganismos produtores de hidrogênio, porém temperaturas a níveis muito elevados poderiam reduzir a atividade das produtoras de hidrogênio. Além disso, em altas temperaturas pode ocorrer à desnaturação das enzimas, cessando a produção de hidrogênio (REIS, 2010). Segundo Metcalf e Eddy (1979), o aumento da temperatura pode também facilitar a separação do biogás da fase líquida durante a operação do sistema, porém mesmo assim, se torna desfavorável pela necessidade de uso da energia térmica, reduzindo assim a sustentabilidade do processo e tornando-o dispendioso.

3.8.4 Inóculo

A produção biológica de hidrogênio ocorre por meio de uma variedade de bactérias anaeróbias e para isso, é possível utilizar consórcios microbianos (inóculos mistos) ou até mesmo microrganismos isolados. As culturas puras têm sido amplamente empregadas e descritas com os melhores desempenhos, principalmente *Clostridium sp.* e *Enterobacter sp.* são os mais eficazes produtores de hidrogênio por fermentação. A principal vantagem do *Enterobacter sp.* é ser um microrganismo anaeróbio facultativo; no entanto, *Clostridia sp.* é estritamente anaeróbio, possui um rendimento de hidrogênio superior em relação ao

Enterobacter sp., (LIU e FANG, 2007). Esse tipo de inóculo tem menos aplicação industrial, pois pode ser facilmente contaminada por consumidores de hidrogênio diversos (BARTACEK, ZABRANSKA e LENS, 2007)

Os inóculos mistos são facilmente encontrados em ambientes naturais, o lodo oriundo de biodigestores anaeróbios para tratamento de diversos resíduos é amplamente utilizado como inóculos. Sua principal vantagem é o fato de poder ser utilizado pelos mais variados substratos, além de ser mais facilmente manuseados e aclimatados em condições ambientes. Porém apresenta como desvantagem a necessidade de tratamento para impedir o crescimento de microrganismo metanogênicos consumidores de hidrogênio. Existem vários tratamentos descritos na literatura, o tratamento ácido e o térmico são os mais usuais e tem como principal objetivo impedir o crescimento de bactérias não formadoras de esporos, que são o caso das metanogênicas. Comparando-se o tratamento térmico com o ácido para a produção de hidrogênio, observou-se maior eficiência no primeiro em relação ao segundo (OH et al., 2003).

Outra opção de inóculo que vem sendo estudada é a fermentação natural (ou autofermentação) do substrato, esse processo visa multiplicar naturalmente a biomassa anaeróbia, favorecendo as bactérias produtoras de H_2 . Tem como principal vantagem a não dependência de outra fonte de inóculo, além do manuseio em condições de temperatura ambiente.

Estudos demonstram que a fermentação natural tem se apresentado como um inóculo favorável a produção de hidrogênio comparados aos demais utilizados. A Tabela 2, apresenta um comparativo de rendimento na produção de hidrogênio através da fermentação natural e de outros inóculos a partir de várias fontes de substratos.

Tabela 2: Comparação do rendimento na produção de hidrogênio através da fermentação natural e de outros inóculos a partir de várias fontes de substratos.

Reator	Substrato	Inoculo	pH	Rendimento de H ₂	Referências
Leito Fixo	ARS de sacarose	Fermentação natural	6,5	4,22 mol H ₂ . mol ⁻¹ sacarose	Fontes Lima; Zaiat (2012)
Leito Fixo	Soro de queijo	Fermentação natural	5,6	0,668 mol H ₂ . mol ⁻¹ lactose	Perna et al. (2013)
Leito Fixo	ARS de sacarose	Fermentação natural		2,1 mol H ₂ . mol ⁻¹ sacarose	Penteado et al. (2013)
CMTR	ARS de sacarose	Fermentação natural	6,5	0,5 mol H ₂ . mol ⁻¹ sacarose (DQO 2g/L)	Gomes et al. (2015)
				0,4 mol H ₂ . mol ⁻¹ sacarose (DQO 4g/L)	
Leito fixo	ARS de sacarose	Fermentação natural	6,5	3,5 mol H ₂ . mol ⁻¹ sacarose	Anzola-Rojas et al. (2015)
Batelada	Vinhaça de cana-de-açúcar	Fermentação natural	5,5	1,31 mol H ₂ . mol ⁻¹ glicose	Telles et al. (2018)
CIGSB	ARS de sacarose	Lodo anaeróbio	6,5	3,9 mol H ₂ . mol ⁻¹ sacarose	LEE et al. (2009)
RALF	ARS de glicose	Lodo anaeróbio	5,5	2,5 mol H ₂ . mol ⁻¹ glicose	Amorim et al. (2009)
Batelada	Vinhaça de cana-de-açúcar	Lodo anaeróbio	5,5	0,010 mol H ₂ . mol ⁻¹ carboidratos	Lazaro (2012)
Batelada	Efluente de Cervejaria	Lodo anaeróbio	5,5	1,5 mol H ₂ . mol ⁻¹ frutose	Pachiega et al. (2019)

ARS: Água residuária sintética; CMTR: Reator contínuo de tubos múltiplos; CIGSB: Reator de leito de lodo granular induzido; RALF: Reator anaeróbio de leito fluidizado.

Fonte: Autora (2023).

3.9 Planejamento Experimental

O planejamento experimental consiste na definição de coletas de dados experimentais com intuito de responder algumas questões (CUNICO et al., 2008). Na literatura existem muito métodos disponíveis, mas o planejamento fatorial envolvendo combinações entre os níveis de dois ou mais fatores é indicado quando se deseja estudar efeitos de variáveis (fatores) independentes, e quando, é investigado todas as combinações possíveis entre os níveis de cada variável, esse esquema fatorial é conhecido como completo (RODRIGUES, 2003). Nesse contexto, cada combinação é um tratamento realizado.

O planejamento pode ser considerado satisfatório quando é projetado um experimento que seja capaz de fornecer exatamente o tipo de informação que se procura. Para se estudar os efeitos dos fatores sobre a resposta é necessário variar e observar o resultado dessa variação. Um planejamento pode ser representado por N^k , seja k o número de fatores em estudo, cada qual com N níveis.

O caso mais simples de planejamento fatorial é aquele em que k está presente em apenas 2 níveis (2^k). Nesse tipo de planejamento os níveis são comumente codificados com os sinais (+) e (-), atribuídos aos níveis superiores e inferiores respectivamente (RODRIGUES, 2003). Além disso, os sinais permitem realizar o esquema da matriz de planejamento, assim como determinar a influência dos fatores e de suas interações no estudo (NEVES et al., 2002).

É importante ressaltar que todos os tratamentos e réplicas devem ocorrer de forma aleatória, visando a neutralidade dos resultados, para que não haja comprometimento dos resultados obtidos (GALDAMEZ, 2002).

A utilização do planejamento fatorial em experimentos apresenta como vantagens a redução do número de ensaios sem qualquer prejuízo na qualidade; seleção das variáveis que influenciam um processo com número reduzido de ensaios; representação do processo estudado através de expressões matemáticas, entre outras.

Sendo assim, o planejamento fatorial determina que fatores têm efeitos relevantes na resposta e, também, como o efeito de um fator varia com os níveis dos outros fatores, quantificando e estabelecendo relações entre diferentes fatores.

3.10 Considerações acerca da Revisão bibliográfica

A revisão bibliográfica teve como objetivo buscar estudos que contribuíssem como base teórica para ajudar no entendimento do processo de produção de hidrogênio por meio da digestão anaeróbia, assim como, os fatores que influenciam e principalmente trabalhos que pudessem nortear o processo de produção por fermentação natural de água residuária real. Já que poucos trabalhos têm sido encontrados com essa opção de inóculo.

A utilização de efluentes reais dificultam a obtenção de algumas condições operacionais ideais, visto que, cada efluente tem uma característica individual. Entretanto, é fundamental a busca por condições que possibilitem a utilização desses resíduos de forma bruta ou com o mínimo de contribuição (diluição) possível para encontrar alternativas que contribuam no aumento na eficiência da produção de hidrogênio. Outro fator interessante é, a utilização de fermentação por cepas puras ou utilização de lodos mistos, porém esses procedimentos se tornam mais onerosos, seja com isolamentos dos microrganismos ou com tratamentos que são dados nos lodos antes da sua utilização, sendo essa uma das vantagens da fermentação natural do próprio substrato.

Ainda, por meio da revisão da literatura foi obtido melhor entendimento sobre planejamento experimental fatorial, método utilizado por este estudo para avaliar a produção de hidrogênio e através deste, compreender quais e como os fatores estudados influenciaram na produção.

O uso de água residuárias oriundas de processos industriais e agroindustriais para produção de biohidrogênio é uma via atraente pela grande quantidade gerada e pelo baixo custo, além de possibilitar a redução da carga poluidora desses resíduos que são posteriormente destinados ao meio ambiente. Nessa perspectiva, é possível a produção de hidrogênio e um tratamento do resíduo utilizando o processo anaeróbio.

4 MATERIAL E MÉTODOS

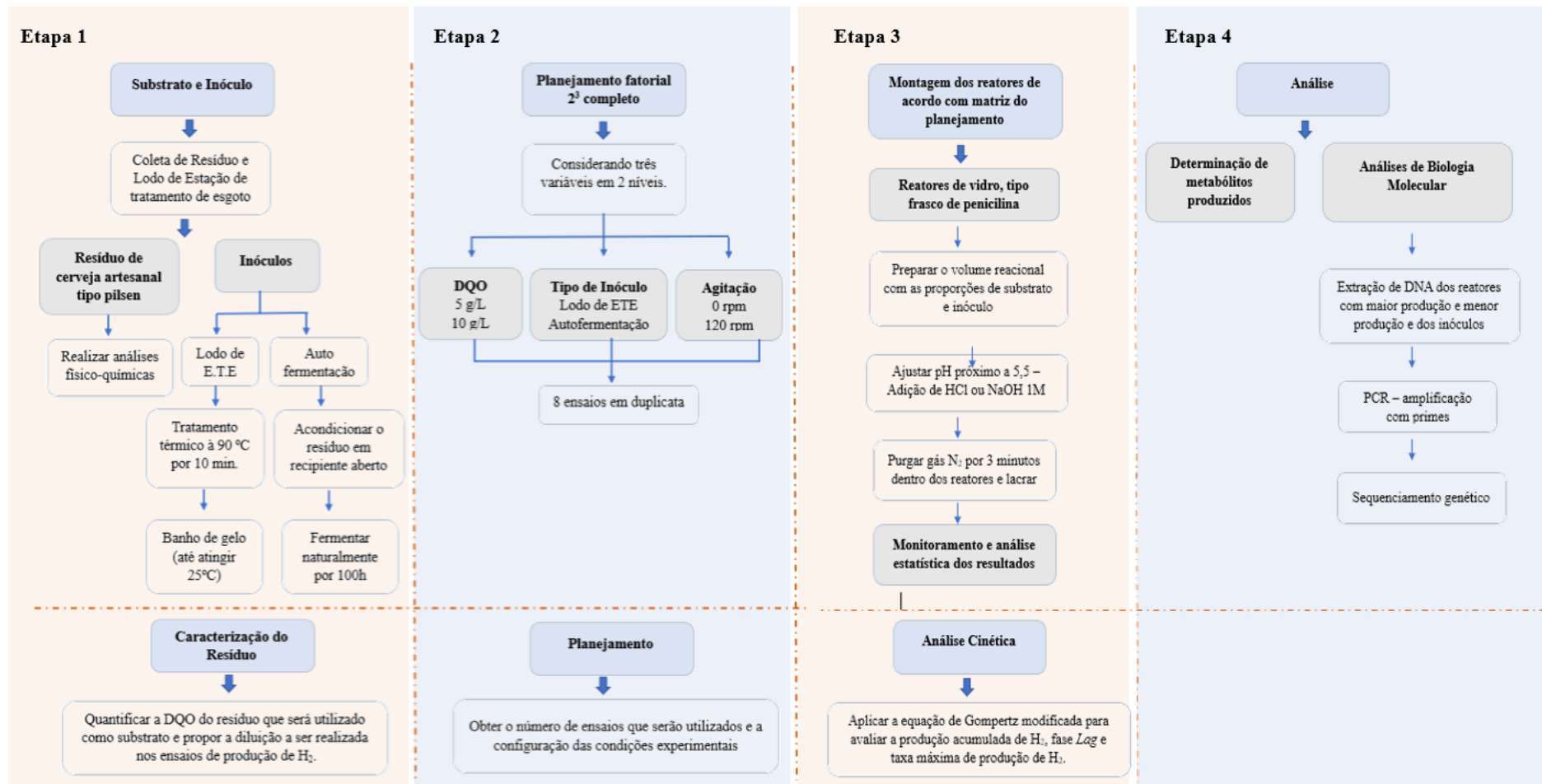
Nesta seção são apresentados o resíduo utilizado como substrato para produção de hidrogênio, as fontes dos inóculos e o tratamento pelo qual foram submetidos antes do seu uso. Também é descrito o planejamento experimental usado para avaliar as variáveis estudadas, bem como, as análises físico-química, cromatográfica e de biologia molecular realizadas durante o experimento. Além das equações para os cálculos dos principais parâmetros envolvidos na pesquisa.

4.1 Descrição Geral dos Experimentos

Os ensaios de produção de H₂, as análises físico-químicas, análises cromatográficas, extração de DNA e PCR foram realizadas no Laboratório de Saneamento Ambiental (LSA) e Laboratório de Controle Ambiental (LCA) do Centro de Tecnologia da Universidade Federal de Alagoas, *Campus A. C. Simões*. O sequenciamento genético da comunidade microbiana dos reatores foi realizado de forma terceirizada pela ACTGene análises moleculares e a bioinformática foi realizada pela parceria e colaboração do grupo de pesquisa do Laboratório de Fitoplanktons no Campus de Engenharia e Ciências Agrárias- CECA.

Os parâmetros cinéticos: produção acumulada de H₂, fase *Lag* e taxa máxima de produção de H₂ foram utilizados para avaliar a influência da fermentação nos ensaios desenvolvidos a partir de um planejamento experimental 2³ completo. Todas as etapas do estudo estão apresentadas na Figura 8.

Figura 8: Fluxograma geral das etapas do estudo



Fonte: Autora (2023)

4.2 Caracterização da Indústria: Área de Estudo

A coleta do substrato utilizado no experimento foi realizada numa microcervejaria artesanal localizada no município de Maceió/AL. Atualmente, a cervejaria produz nove estilos diferentes de chopp e cerveja, sendo 4 clássicos e 5 estilos sazonais que são produzidas num total de 6 tanques, sendo 4 tanques com capacidade de 3.000 L e 2 com capacidade de 1.500 L. A produção de cada estilo ocorre em dias separados, de acordo com a demanda de mercado, dos quais os tipos *Pilsen* e *India Pale Ale* são as mais comercializadas, seja em forma de chopp ou cerveja e consequentemente as de maior produção dentro da indústria. Em média o processo de produção completo leva cerca de 7 dias, entre as fases de maltaria, mosturação e filtração. Após esse período o chope segue para o envase e a cerveja passa por um processo de pasteurização e em seguida segue para ser engarrafada.

Segundos dados deste ano (2023), a produção semestral (janeiro a junho) foi de aproximadamente 42.223 litros de cervejas, com destaque de produção para o estilo pilsen, que representa 73% do total da produção com aproximadamente 30.769 L produzidos (informação verbal¹). A cerveja tipo *Pilsen* é considerada a líder no mercado cervejeiro, por ser a preferida do consumidor brasileiro, correspondendo a 98% do total consumido no país (PINTO, 2015).

4.3 Substrato

O substrato utilizado como fonte de carbono foi o resíduo da purga do tanque fermentador, ou seja, a levedura decantada do processo de fermentação da cerveja tipo *Pilsen* (Figura 9). A escolha desse tipo de cerveja ocorreu por ser o estilo mais vendido e mais produzido pela indústria como citado o item 4.2.

¹ Dados fornecidos pelo responsável técnico da cervejaria, em outubro de 2023.

Figura 9: Resíduo coletado de cerveja tipo *Pilsen*.



Fonte: Autora (2023)

O resíduo foi coletado diretamente do tanque de fermentação (Figura 10) em recipientes plásticos de 2L e levada imediatamente ao laboratório. Os recipientes foram armazenados em freezers e mantidos a -15 °C até seu uso, buscando preservar suas características físico-químicas, principalmente quanto à concentração de carboidratos. Outras amostras foram coletadas em frascos de 1L para caracterização analítica.

Figura 10: Local de coleta do resíduo: Tanque cônico de fermentação



Fonte: Autora (2023).

A caracterização analítica do resíduo de cerveja tipo *pilsen* foi realizada com amostras frescas por meio de análises físico-químicas e apresentada na Tabela 3.

Tabela 3: Caracterização de amostra de resíduo de cervejaria

Parâmetros	Resultados
pH	5,66
Ácidos Voláteis Totais (g. L ⁻¹)	5,982
Alcalinidade (g. L ⁻¹)	ND
DQO (g. L ⁻¹)	251,057
Ferro total (g. L ⁻¹)	0,289
Fósforo (g. L ⁻¹)	0,701
Carboidratos (g. L ⁻¹)	37,981
Nitrogênio total (NTK) (g. L ⁻¹)	7,812
Sólidos Totais (g. L ⁻¹)	104,534
Sólidos Fixos (g. L ⁻¹)	98,397
Sólidos voláteis (g. L ⁻¹)	6,140
Sulfato (g. L ⁻¹)	3,264

*ND: Não detectado

Fonte: Autora (2022).

4.4 Inóculos

Para o ensaio experimental foram utilizados 2 (dois) inóculos distintos, um inóculo proveniente da fermentação natural do substrato e outro oriundo de uma Estação de Tratamento de Esgoto (ETE).

4.4.1 Inóculo misto gerado por fermentação natural

O inóculo foi obtido pelo processo de fermentação natural (autofermentação) do resíduo, adaptado de acordo com Penteado (2012). Para obtenção do inóculo, o resíduo foi colocado em recipiente aberto, tipo béquer de 1L, coberto por tela para preservação

contra insetos e exposto ao ambiente para crescimento microbiano por um período de 100 h (Figura 11). Após este período, o inóculo fermentado foi homogeneizado e utilizado nos ensaios dos reatores anaeróbios em batelada sem nenhum tipo de tratamento.

Figura 11: Exposição do resíduo de cervejaria para Fermentação Natural



Fonte: Autora (2023).

4.4.2 Inóculo de reator UASB

O lodo oriundo de um reator *Upflow Anaerobic Sludge Blanket* (UASB) foi coletado de uma Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) de um condomínio residencial, localizado no bairro Tabuleiro do Martins, em Maceió/Alagoas.

O lodo passou por um tratamento térmico que consistiu em seu aquecimento até 90°C por 10 minutos sob constante homogeneização (Figura 12), e posteriormente resfriamento instantâneo em banho de gelo até atingir a temperatura de 25°C, antes de ser utilizado na montagem dos reatores (KIM, HAN E SHIN, 2004). Vários estudos que aplicaram esse tipo de tratamento, confirmam a eficiência do tratamento térmico na inativação de bactérias metanogênicas (PACHIELA, 2019; SÁ et al., 2014).

Figura 12: Tratamento Térmico do Lodo de ETE



Fonte: Autora (2023).

4.5 Planejamento Experimental

O estudo das variáveis foi realizado por um planejamento fatorial 2^3 completo com propósito de analisar o efeito de 3 (três) variáveis independentes na produção acumulada de H_2 . Foram consideradas três variáveis independentes (A- DQO; B- tipo de inóculo e C- agitação) em 2 níveis. Esses níveis podem ser representados por valores codificados -1 e +1. Esses valores codificados expressam a faixa analisada, onde o nível -1 representa o limite inferior, enquanto o nível +1 representa o nível superior de cada variável do planejamento, resultando em 8 experimentos distintos (Tabela 4), realizados em duplicata totalizando 16 ensaios. Importante ressaltar que foram realizados ensaios de controle (apenas o substrato) e branco (apenas o inóculo).

Esse tipo de metodologia é considerado uma ferramenta útil para análise de processos biológicos em batelada, já que fornece respostas desejáveis, reduz número de experimentos e consegue otimizar o processo, realizando uma análise da resposta influenciada por diversos fatores (SHI et al., 2010).

Tabela 4: Variáveis e níveis utilizados para o estudo

	Efeitos	Níveis	
		(-1)	(+1)
A	DQO (g. L ⁻¹)	5	10
B	Tipo de Inóculo	FN	L
C	Agitação (rpm)	0	120

FN- Inóculo da fermentação natural; L- Inóculo lodo

Fonte: Autora (2023).

Os intervalos das variáveis foram determinados com base na revisão da literatura. Os valores de DQO de 5 e 10 g. L⁻¹, foram adotados por apresentar-se na literatura como um valor médio entre os valores mínimos e máximos respectivamente, referentes a efluentes de cerveja encontrados na revisão bibliográfica (Tabela 1). Tendo em vista que a DQO do resíduo coletado para o trabalho foi em torno de 251,06 g. L⁻¹, conforme apresentado na caracterização (Tabela 3), se fez necessário realizar uma diluição do substrato com água destilada para obter o valor da DQO na faixa de estudo.

A DQO apresentada na literatura se refere ao efluente da indústria cervejeira, que é composto por várias contribuições dentro do processo produtivo, conforme a Figura 6 (apresentado no item 3.3), enquanto a amostra coletada para este estudo era composta apenas da purga do tanque fermentador, sem nenhuma contribuição do processo produtivo que pudesse diluir sua composição.

Para uma análise do processo de fermentação natural como inóculo na produção de hidrogênio se fez necessário comparar com a produção realizada com lodo misto de ETE, inóculo já bastante estudado e utilizado para esse tipo de ensaio. Outro aspecto, foi o estudo da contribuição do efeito da agitação nos reatores anaeróbios como condição favorável na produção de hidrogênio. De acordo com Pinho et al. (2014) a taxa de agitação desempenha um papel importante promovendo mais contato entre o substrato e a biomassa. Foram utilizadas velocidades de 0 e 120 rpm, para analisar a influência da agitação na fermentação anaeróbia.

Após estabelecer as variáveis e seus níveis, montou-se uma matriz do planejamento experimental (Tabela 5) sendo possível formar a tabela de coeficientes de contraste, apresentando os três efeitos principais 1 (DQO), 2 (Inóculo) e 3 (Agitação),

três interações de dois fatores, 12, 13 e 23 e uma interação de três fatores, 123. Os sinais correspondentes a esses efeitos de interação na tabela de coeficientes de contraste são obtidos multiplicando-se as colunas correspondentes de cada interação. Para facilitar a identificação foi adotado uma sigla para cada tratamento.

Tabela 5: Matriz do planejamento experimental 2^3 completo

Ensaio/ Sigla	Valores codificados			Valores não codificados		
	A	B	C	A	B	C
	(DQO) g. L ⁻¹	(Inóculo)	(Agitação) rpm	(DQO) g. L ⁻¹	(Inóculo)	(Agitação)* rpm
1 (R1)	-1	-1	-1	5	FN	0
2 (R2)	+1	-1	-1	10	FN	0
3 (R3)	-1	+1	-1	5	L	0
4 (R4)	+1	+1	-1	10	L	0
5 (R5)	-1	-1	+1	5	FN	120
6 (R6)	+1	-1	+1	10	FN	120
7 (R7)	-1	+1	+1	5	L	120
8 (R8)	+1	+1	+1	10	L	120

* O valor de agitação apresentado como 0 (zero), é referente à reatores sem agitação.

Fonte: Autora (2023).

O planejamento 2^3 é baseado em uma equação polinomial para as variáveis estudadas, como apresentada na Equação 8.

$$Y = X_0 + X_1.A + X_2.B + X_3.C + X_{12}.AB + X_{13}.AC + X_{23}.BC + X_{123}.ABC \quad (8)$$

Em que Y é a resposta (produção acumulada de H₂); A, B e C são valores reais; X₀ é uma constante; X₁, X₂ e X₃ são coeficientes lineares; X₁₂, X₁₃, X₂₃ e X₁₂₃ são coeficientes de interação. A análise da variância (ANOVA) foi realizada com o intuito de testar a significância do modelo de ajuste para os dados experimentais, bem como a significância dos termos lineares. Os parâmetros foram analisados com base no coeficiente de correlação, R², limite de confiança de 95%, valor F e valor de P. De modo geral, um valor F significativo e um bom R² (coeficiente de correlação) indicam um modelo satisfatório e viável.

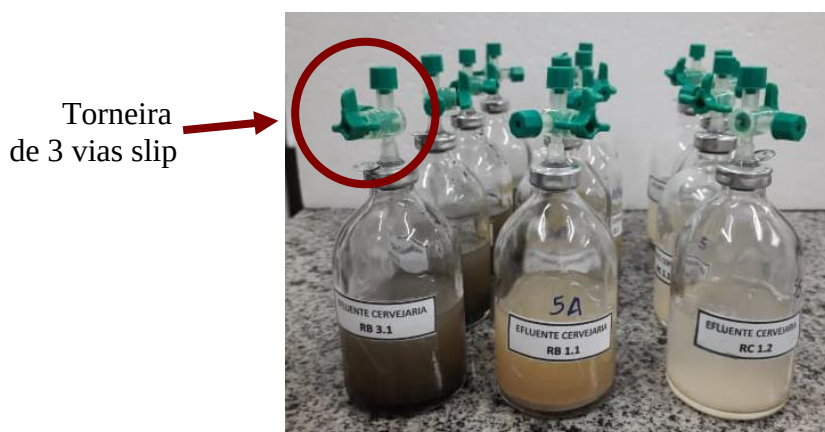
4.6 Montagem dos Reatores: Ensaio de produção de hidrogênio em reatores em batelada.

Os ensaios em pequena escala foram realizados em frascos de vidro, tipo penicilina com volume de 120 mL, preenchidos com 50% da sua capacidade total, sendo 60 mL correspondente ao volume reacional e 60 mL de “*headspace*”. O Volume reacional foi composto da mistura de 10% de inóculo (6 mL) e 90% (54 mL) de substrato nas DQO estabelecida. O pré-tratamento do inóculo e a fermentação natural foram apresentadas na seção 4.4.

Todos os ensaios foram realizados em réplicas, inclusive o ensaio do branco e controle, que tem a finalidade de mostrar a presença de interferentes que possivelmente possam existir nos ensaios. Após a preparação do volume reacional de acordo com a matriz experimental, o pH foi ajustado para valores próximos de 5,5 com adição de HCl ou NaOH 1M, sendo este um valor adequado para produção de hidrogênio (LIN e LAY, 2004). Este ajuste de pH visa selecionar bactérias produtores de hidrogênio por meio do controle de pH.

Para garantir a anaerobiose foi substituído todo ar atmosférico dos frascos através do borbulhamento de nitrogênio (N₂) no meio líquido e no *headspace* por 3 minutos em cada reator, sendo hermeticamente vedados com tampa de borracha e lacre de vedação de alumínio. Nas tampas de borracha foram acopladas uma torneira de 3 via slip para coleta e quantificação diária do biogás produzido nos ensaios, conforme mostrado na Figura 13.

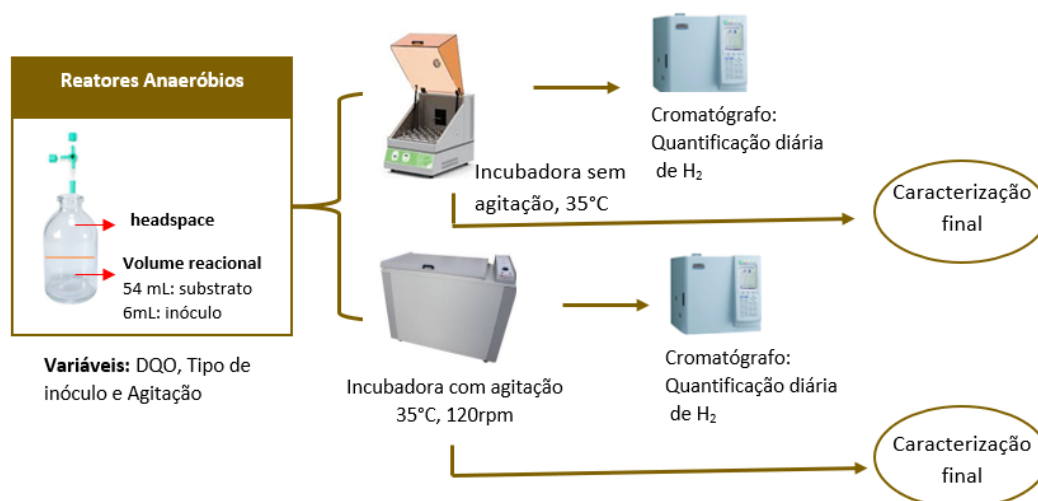
Figura 13: Torneiras de 3 vias acopladas aos reatores anaeróbios utilizados no estudo



Fonte: Autora (2023).

Os reatores foram mantidos em incubadoras (*Shaker*) na ausência de luz e sob temperatura controlada de $35,0 \pm 0,5$ °C, durante todo período experimental. Foram utilizadas duas incubadoras distintas, uma com a condição de agitação em 120 rpm e outra sem agitação (0 rpm), ambas com as mesmas condições de temperatura e ausência de luz. Quando se observou, por meio da cromatografia gasosa a estabilização da produção de hidrogênio, encerrou-se o ensaio e cada reator foi analisado em termos dos parâmetros de caracterização físico-química, produção de metabólitos solúveis e biologia molecular. A Figura 14, apresenta um desenho esquemático do experimento

Figura 14: Desenho esquemático do primeiro ensaio experimental



Fonte: Autora (2023).

4.7 Métodos Analíticos

Para fins de monitoramento, os parâmetros analisados, a frequência, métodos e referencias são apresentados na Tabela 6.

As análises de ácidos voláteis, alcalinidade, fósforo, nitrogênio e sulfato foram realizadas apenas na caracterização do resíduo, pois é necessário um volume maior da amostra para monitoramento diário e para não alterar o volume reacional do reator não foi possível coletas periódicas.

As análises de pH, DQO, carboidratos, sólidos totais (ST), sólidos totais fixos (STF) e sólidos totais voláteis (STV) foram realizadas no início e no final da batelada.

Tabela 6: Variáveis analisadas, frequência e metodologia de análise.

Análise	Parâmetros	Frequência	Método	Referência
Físico-Química	Carboidratos (g. L ⁻¹)	Inicial e Final	Espectrofotométrico	Dubois et al (1956)
	pH	Inicial e Final	Potenciométrico	
	Ácidos Voláteis (g. L ⁻¹)	Inicial e Final	Titulometria	
	Alcalinidade (g. L ⁻¹)	Inicial e Final	Titulometria	
	DQO (g. L ⁻¹)	Inicial e Final	Espectrofotométrico	
	Fósforo (mg. L ⁻¹)	Inicial e Final	Espectrofotométrico	(APHA, 2005), adaptado por LPB/USP (2021).
	Nitrogênio Total (g. L ⁻¹)	Inicial e Final	Titulometria	
	Sulfato (g. L ⁻¹)	Inicial e Final	Espectrofotométrico	
	Sólidos Totais (g. L ⁻¹)	Inicial e Final	Gravimétrico	
	Sólidos Voláteis (g. L ⁻¹)	Inicial e Final	Gravimétrico	
	Sólidos Fixos (g. L ⁻¹)	Inicial e Final	Gravimétrico	
Cromatografia	Produção de H ₂	Diário		
	Metabólitos totais produzidos	Inicial e Final	Cromatografia Gasosa	MAINTINGUER (2008)
Biologia Molecular	Extração de DNA	Inicial e Final		
	PCR			
	Sequenciamento genético			

Fonte: Autora (2023)

4.7.1 Análises Cromatográficas

i. Determinação de Hidrogênio

Para a determinação do gás hidrogênio foi utilizado cromatógrafo a gás, Shimadzu, modelo GC-2010-Plus, equipado com detector de condutividade térmica (TCD). A coluna utilizada foi a Supelco CarboxenTM 1010 PLOT com capilar de sílica fundida (30 m de comprimento e diâmetro interno de 0,53 mm). As condições cromatográficas foram:

- Gás de arraste: Argônio sob fluxo de 21,9 cm. s⁻¹;
- Temperaturas do injetor, coluna e detector: 30, 200 e 230 °C, respectivamente;
- Tempo total de análise: 13,9 min.

A calibração da cromatografia gasosa foi realizada usando 99,999% (v/v) de H₂.

De acordo com essas condições, o gás hidrogênio foi detectado no tempo aproximado de 3,6 min. Para análise foi efetuada uma injeção manual por meio da retirada de 200 µL de amostra da fase gasosa (headspace) dos reatores, utilizando seringa GASTIGHT® com trava da marca Hamilton.

ii. Determinação de metabólitos produzidos

Na digestão anaeróbia são produzidos subprodutos, mais conhecidos como metabolitos solúveis e consistem em ácidos orgânicos voláteis e solventes (álcoois e acetona). A identificação e quantificação foi realizada de acordo com a metodologia adaptada de ADORNO et al. (2014) por meio da extração por headspace, utilizando amostrador automático HS-20 acoplado ao cromatógrafo gasoso Shimadzu, modelo GC-2010-Plus, equipado com detector de ionização de chama (FID). A coluna utilizada foi SUPELCOWATTM 10, também com capilar de sílica fundida (30m x 0,25 mm x 0,25 µm). As condições cromatográficas foram:

- Para Cromatógrafo GC- 2010-Plus
 - ✓ Temperaturas do injetor, coluna e detector: 250, 35 e 280 °C, respectivamente;

- ✓ Rampa de temperatura: 35°C (0 min) 2°C/min 38°C (0 min) 10°C/min 75°C (0 min) 35°C/min 120°C (1 min) 10°C/min 170°C (2 min);
 - ✓ Fluxo de Gás de arraste (H₂): 30 mL.min⁻¹;
 - ✓ Fluxo do gás auxiliar ou make-up (N₂) e gás de chama (Ar sintético): 30 e 300 mL.min⁻¹, respectivamente.
 - ✓ Razão de Split: 1,0;
 - ✓ Velocidade linear constante: 41,8 cm/s
 - ✓ Fluxo da Coluna: 1,56 mL. min⁻¹.dia⁻¹
 - ✓ Tempo total de análise: 14,49 minutos.
- Para 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, pressurização e equilíbrio da pressão: 5; 0,5; 0,10 minutos respectivamente;
 - ✓ Tempos de carregamento, equilíbrio do carregamento e injeção: 0,5; 0,10; 0,50 minutos, respectivamente.

As amostras líquidas foram preparadas pelo efeito *salting-out*, em tubos de 10 mL com tampas rosqueável e septo de silicone com 18 mm de diâmetro (Figura 15), através da adição de:

Figura 15: Frasco padrão de vidro com tampa rosqueável e septo de silicone



Fonte: Autora (2023).

- ✓ 1 g de NaCl;
- ✓ 2 mL da amostra;
- ✓ 70 µL de solução de isobutanol 1 g/L (padrão interno para álcoois e acetona);
- ✓ 100 µL de ácido crotônico 700 mg/L (padrão interno para ácidos orgânicos voláteis) e
- ✓ 200 µL de ácido sulfúrico 2 M.

A partir dessa metodologia, nessas condições foi possível avaliar a produção de acetona, etanol, metanol, n-butanol e de vários ácidos (acético, butírico, isobutírico, isovalérico, valérico, propiônico e capróico)

4.8 Análise Cinética

A produção acumulada de hidrogênio nos reatores em batelada foi calculada de acordo com a Equação 9:

$$V_{H,i} = (V_{H,i} + V_{H,i-1}) C_{H,i} \quad (9)$$

Em que $V_{H,i}$ é o volume de hidrogênio acumulado no tempo atual; $V_{H,i-1}$ é o volume de hidrogênio acumulado no tempo anterior; $C_{H,i}$ é o volume de hidrogênio acumulado no *headspace*.

A produção acumulada de hidrogênio foi ajustada ao modelo de regressão não-linear, que neste estudo será representado pelo modelo de Gompertz modificado (Equação 10) (LAY et al., 2010) com auxílio do software. Segundo LAZARO (2012), o Gompertz é o modelo ideal para descrever a produção de biogás em ensaio em batelada. A partir desta equação modificada foi possível encontrar o potencial de produção acumulada de hidrogênio, taxa máxima de produção de hidrogênio e o tempo da fase *lag*.

O Modelo de Gompertz modificado expressa por:

$$H = P \cdot \exp \left[-\exp \left\{ \frac{R_m}{P} \cdot (\lambda - t) \cdot e + 1 \right\} \right] \quad (10)$$

Sendo,

H = Produção acumulada de hidrogênio (mL)

P = Potencial de produção de hidrogênio (mL);

R_m = Taxa de produção de hidrogênio (mL.h⁻¹);

t = Tempo de incubação dos reatores (h)

λ = Intervalo de tempo (fase *lag*) necessário para o início da produção exponencial de H₂ (h);

e = 2.718281828 (número de Euler - adimensional)

Os resultados experimentais foram ajustados aos seus valores médios obtidos das réplicas dos reatores anaeróbios utilizando o software para análise estatística.

4.9 Análise da Comunidade Microbiana

Amostras dos inóculos utilizados na montagem do experimento e amostras iniciais e finais dos reatores foram coletadas e mantidas a 4 °C até seu uso. Ao final do experimento, verificou-se a produção acumulada de hidrogênio de cada condição do planejamento e prosseguiu para a análise da comunidade microbiana dos 2 (dois) tipos de inóculos e dos reatores que apresentaram maior e menor produção acumulada de hidrogênio, com objetivo de analisar a dinâmica da comunidade microbiana nesses reatores.

A primeira etapa foi a extração do DNA, realizada pelo DNeasy® Power Soil® Pro Kit, de acordo o protocolo do fabricante. Em seguida as amostras foram armazenadas em ultra freezers à -80 °C. Após a extração de DNA, prosseguiu com a reação de amplificação de cadeia por meio da técnica de PCR.

A reação de amplificação por PCR foi realizada com o Kit Platinum® PCR Super Mix utilizando 3 µL da amostra (DNA extraído), 45 µL de Platinum PCR Super Mix (que contém enzima Taq polimerase, dNTPs e tampão e o *set de primer* específico para o Domínio Bactérias composto por 1 µL do primer 968 FGC (CGCCCGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGAACGCGAAG AACCTTAC) e 1 µL primer 1401 R (CGGTGTGTACAAGACCC) (NUBEL et al., 1996), na concentração de 25 mM, conforme as quantificações descritas na Tabela 7.

As amplificações foram realizadas utilizando T100 Thermal Cycler, da marca BIO-RAD, programado de acordo com as condições: Temperatura inicial foi de 94 °C por 30 segundos para completa desnaturação da amostra e ativação das enzimas, seguidos por 35 ciclos, com etapas, desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 55 °C por 30 segundos, extensão a 72 °C por 1 minuto e resfriamento até 4 °C.

Tabela 7: Composição dos reagentes utilizados na amplificação de DNA por PCR

Reagentes		Composição da Reação
Amostra (DNA extraído)		3 µL
Kit Platinum®	Platinum PCR Super Mix	45 µL
	Primer 968 FGC (25mM)	1 µL
	Primer 1401 R (25 mM)	1 µL
Total da reação		50 µL

Fonte: Autora (2023)

Após a reação de PCR os produtos amplificados foram visualizados por meio da eletroforese em gel de agarose 1,2% (m/v). Para a corrida eletroforética foi utilizado o aparelho “PowePac HV Basic” da BIO-RAD com programação de 80 v constante por 15 minutos. Em seguida o gel foi acomodado na câmera do aparelho de visualização de imagem sob luz UV (Molecular Imager GelDoc **XR+**) da BIO-RAD conectado ao computador contendo o software LabImager, e então foi possível realizar a visualização e leitura dos padrões de bandas obtidas.

Os produtos de PCR foram enviados à ACTGene Análises Moleculares para análise da sequência de nucleotídeos. Posteriormente, a partir dos resultados das sequências foram montados os contigs e alinhadas. A sequência de genes RNar 16S foram exploradas pelo *GenBank*, utilizando o algoritmo *Blast* no banco de dados NCBI - *National Center for Biotechnology Information* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para aproximação da identidade filogenética. Os programas utilizados são gratuitos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nesta seção serão apresentados os principais resultados dos parâmetros analisados e a discussão dos fatores que influenciaram na produção de hidrogênio em reator anaeróbio em batelada a partir do resíduo de cervejaria artesanal. Os resultados da produção acumulada de H_2 em cada tratamento serão apresentados por meio de gráficos em função do tempo operacional.

Também serão expressos dados que mostram a influência de cada variável e suas interações na produção de hidrogênio. Além de tabelas que expressem dados da remoção de DQO, consumo de carboidratos e concentrações de metabólitos solúveis produzidos (SMPs). Por fim, será apresentada a comunidade microbiana encontrada nos reatores identificadas por meio da análise de sequenciamento.

5.1 Caracterização do Resíduo de Cervejaria Artesanal e correlação com a composição dos reatores para produção de hidrogênio

As análises físico-químicas do resíduo coletado na indústria cervejeira permitiram a identificação do perfil de composição da amostra que foi utilizada como substrato no experimento. De acordo com a caracterização do resíduo (seção 4.3, Tabela 3), a quantidade de matéria orgânica expressa em DQO foi de 251,057 g. L^{-1} e a de açúcares em torno de 38 g. L^{-1} , sugerindo que esse resíduo é um substrato adequado para a produção de hidrogênio, pois a presença de açúcares, a depender de seu caráter fermentescível, é benéfica para a atividade microbiana.

No intuito de deixar o substrato com DQO próxima a relatada pelos trabalhos que utilizaram esse resíduo, visando facilitar a comparação dos dados com a literatura, foi realizada uma diluição até a faixa de 5 e 10 g. L^{-1} . A DQO apresentada na literatura se refere ao efluente da indústria cervejeira, que é composto por várias contribuições dentro do processo produtivo, conforme a Figura 6 (apresentado no item 3.3), enquanto a amostra coletada para este estudo era composta apenas da purga do tanque fermentador, sem nenhuma contribuição do processo produtivo que pudesse diluir sua composição.

Vale ressaltar que os valores de 5 e 10 g. L⁻¹ são valores iniciais fixados correspondentes ao substrato, porém os valores de DQO nos reatores referem-se ao somatório dos valores de DQO do substrato e do inóculo. Isso também acontece com os valores de carboidratos. A composição físico-química em termos de DQO e carboidratos dos reatores utilizada nos ensaios está apresentada na Tabela 8.

Tabela 8: Composição físico-química dos reatores em cada tratamento.

Reatores	DQO _{substrato} g. L ⁻¹	DQO _{inóculo} g. L ⁻¹	DQO _{reator} g. L ⁻¹	C _{substrato} g. L ⁻¹	C _{inóculo} g. L ⁻¹	C _{reator} g. L ⁻¹
R1	5,811	24,810	30,621	1,915	4,708	6,623
R2	10,793	24,810	35,603	2,558	4,708	7,266
R3	4,992	8,789	13,781	1,049	1,542	2,591
R4	11,173	8,789	19,962	2,663	1,542	4,205
R5	5,811	24,810	30,621	1,540	4,708	6,248
R6	10,793	24,810	35,603	2,558	4,708	7,266
R7	4,992	8,789	13,781	1,049	1,542	2,591
R8	11,173	8,789	19,962	2,663	1,542	4,205

DQO_{substrato} = DQO do resíduo utilizado como substrato; DQO_{inóculo} = DQO do inóculo utilizado na composição do reator; DQO_{reator} = somatório da DQO_{substrato} + DQO_{inóculo}; C_{substrato} = quantidade de carboidratos em quantidade de glicose do resíduo utilizado como substrato; C_{inóculo} = quantidade de carboidratos em quantidade de glicose presente no inóculo utilizado; C_{reator} = somatório da C_{inóculo} + C_{reator}.

Fonte: Autora (2023).

Em relação ao pH, observou-se que nos reatores que tiveram como inóculo a fermentação natural, o valor de pH ficou próximo à 5,0, enquanto naqueles montados com inóculo de lodo misto de ETE, o valor de pH ficou acima de 7,00, devido ao pH do lodo, que estava em torno de 7,86. Com isso, o pH de todos os reatores foi ajustado próximo a 5,50, sendo este um valor adequado para produção de hidrogênio (LIN e LAY, 2004), dentro da faixa de valores reportados por diversos autores que trabalharam com produção de hidrogênio em reatores em batelada: Shi et al., (2010), 5,95; Pachiega et al., (2019), 5,50; Kumar et al. (2022), 5,00- 6,00.

Valores de pH entre 5,00 e 6,00 são favoráveis para a atividade da hidrogenase, realizando a inibição das bactérias consumidores de H_2 (CHOI, 2015). Não houve controle do pH ao longo do experimento. A Tabela 9, apresenta os valores de pH inicial e média do pH final em cada tratamento.

Tabela 9: pH inicial e média do pH final dos reatores.

Reatores	pH sem ajuste	pH inicial ajustado	*pH final
R1	5,05	5,46	5,26 $\pm$ 0,06
R2	5,13	5,49	5,18 $\pm$ 0,01
R3	7,84	5,50	5,28 $\pm$ 0,01
R4	7,41	5,47	5,11 $\pm$ 0,04
R5	5,05	5,46	5,26 $\pm$ 0,01
R6	5,13	5,49	5,35 $\pm$ 0,04
R7	7,84	5,50	5,40 $\pm$ 0,13
R8	7,41	5,47	5,13 $\pm$ 0,04

* refere-se a média das réplicas de cada ensaio

Fonte: Autora (2023).

Observa-se que não houve redução drástica de pH, diferentemente do que acontece em reatores acidogênicos em virtude da acidificação do meio pelos ácidos graxos produzidos. O valor de pH do substrato pode influenciar no desempenho dos tratamentos quando se encontra muito alcalino ou ácido, pois, apesar dos microrganismos atuarem em diferentes faixas de pH, pode ocorrer a inibição da produção de H_2 . Além disso, algumas enzimas podem ser inativadas com o aumento da acidez, mudando a rota metabólica do processo (KUMAR et al., 2022).

5.2 Remoção de DQO e Eficiência de Consumo de Carboidratos nos reatores

Por meio da determinação da $DQO_{inicial}$ e DQO_{final} verificou-se a eficiência de remoção de DQO em cada reator. A eficiência de remoção da DQO variou aproximadamente entre 4 e 23%. Segundo Sá (2013) estima-se que a redução de DQO

neste estágio seja inferior a 20%. A Tabela 10, apresenta as concentrações iniciais e finais de DQO e carboidratos, além da eficiência de remoção de DQO e eficiência de consumo de carboidratos totais em cada tratamento.

Tabela 10: Concentrações iniciais e finais de DQO e carboidratos totais, eficiência de remoção de DQO e eficiência de consumo de carboidratos totais.

Reatores	DQO			Carboidratos totais		
	Inicial (g. L ⁻¹)	*Final (g. L ⁻¹)	Eficiência de remoção (%)	Inicial (g. L ⁻¹)	*Final (g. L ⁻¹)	Eficiência de consumo (%)
R1	30,621	27,872 ± 1,39	8,98	6,622	5,808 ± 0,00	12,31
R2	35,603	29,474 ± 1,50	17,22	7,266	6,466 ± 0,35	11,00
R3	13,781	10,720 ± 0,89	22,21	2,591	1,806 ± 0,01	30,29
R4	19,963	15,959 ± 1,56	20,05	4,205	3,354 ± 0,02	20,24
R5	30,621	23,566 ± 0,07	23,05	6,248	4,780 ± 0,02	23,50
R6	35,603	30,265 ± 1,35	14,99	7,266	6,380 ± 0,14	12,19
R7	13,781	13,175 ± 0,21	4,39	2,591	2,379 ± 0,00	8,20
R8	19,963	18,442 ± 4,12	7,62	4205	3.237 ± 0,06	23,03

* refere-se a média das réplicas de cada ensaio

Fonte: Autora (2023).

Estes baixos valores de remoção de DQO são comuns em reatores acidogênicos dos mais diferentes substratos, são atribuídos aos compostos intermediários que permanecem no efluente, já que, ao mesmo tempo em que os carboidratos são consumidos, ácidos e álcoois orgânicos são gerados de acordo com a rota metabólica realizada por cada bactéria, mantendo assim a DQO alta dentro dos reatores. (ANDREANI et al., 2015).

Albanez et al. (2015), obteve remoção numa faixa de 7 a 47 % de DQO, utilizando a fermentação natural em diferentes proporções de codigestão de vinhaça e melaço. Já Arantes (2018), obteve remoção em torno de 20% utilizando cultura pura de *K.*

pneumonia como inóculo. Manssouri et al. (2013), encontrou remoção de 18% utilizando lodo anaeróbio como inóculo. Esses resultados demonstram que o presente trabalho apresentou valores de remoção de DQO dentro do esperado. Para fins de tratamento de efluente agroindustrial a remoção de DQO no processo acidogênico é considerada insatisfatória, requerendo um processo posterior. Nesse caso, sugere-se uma produção sequencial de H_2 e CH_4 a fim de melhorar a viabilidade econômica do tratamento de resíduos.

Em relação a eficiência de consumo de carboidratos houve uma variação de 8,20 a 30%. O R5 que apresentou maior produção de hidrogênio, apresentou consumo de açúcares de 23,50%, enquanto o R7 (menos produziu H_2) apresentou o menor consumo de carboidratos (8,20%). Arantes (2018) alcançou uma média 89% de eficiência de consumo, Albanez (2015), valores de 73% e Telles (2015), uma média de 71% de consumo de carboidratos. Diante do que foi observado, o presente estudo apresentou valores de eficiência de consumo bem inferior a outros estudos, apesar do efluente de cervejaria apresentar açúcares fermentescíveis, como a glicose e até açúcares mais complexos como a maltose (ARANTES, 2018).

Uma das possibilidades dessa baixa eficiência de consumo seria ineficácia na etapa de hidrólise da digestão anaeróbia, ou seja, nesta etapa os compostos complexos são quebrados em compostos mais solúveis, ficando disponíveis para as bactérias acidogênicas (CHERNICHARRO, 1997). É possível observar na Tabela 10, que ainda restou muito carboidrato nos reatores. Com isso presume-se que ainda havia uma grande possibilidade de produção de hidrogênio, caso esses carboidratos fossem consumidos. Sabe-se também que estes açúcares complexos são hidrolisados a carboidratos mais simples na fermentação para então serem metabolizados pelos microrganismos nas etapas subsequentes. Segundo Wang e Wan (2009), a produção de hidrogênio é diretamente proporcional ao aumento da concentração de carboidratos até ser atingido um ponto máximo, o que poderia atuar como parâmetro inibidor.

O R5 foi o que apresentou maior eficiência de remoção de DQO e a segunda maior eficiência de consumo de carboidratos e concomitantemente o que mais produziu H_2 . Esse consumo pode ser relacionado à taxa de crescimento dos microrganismos

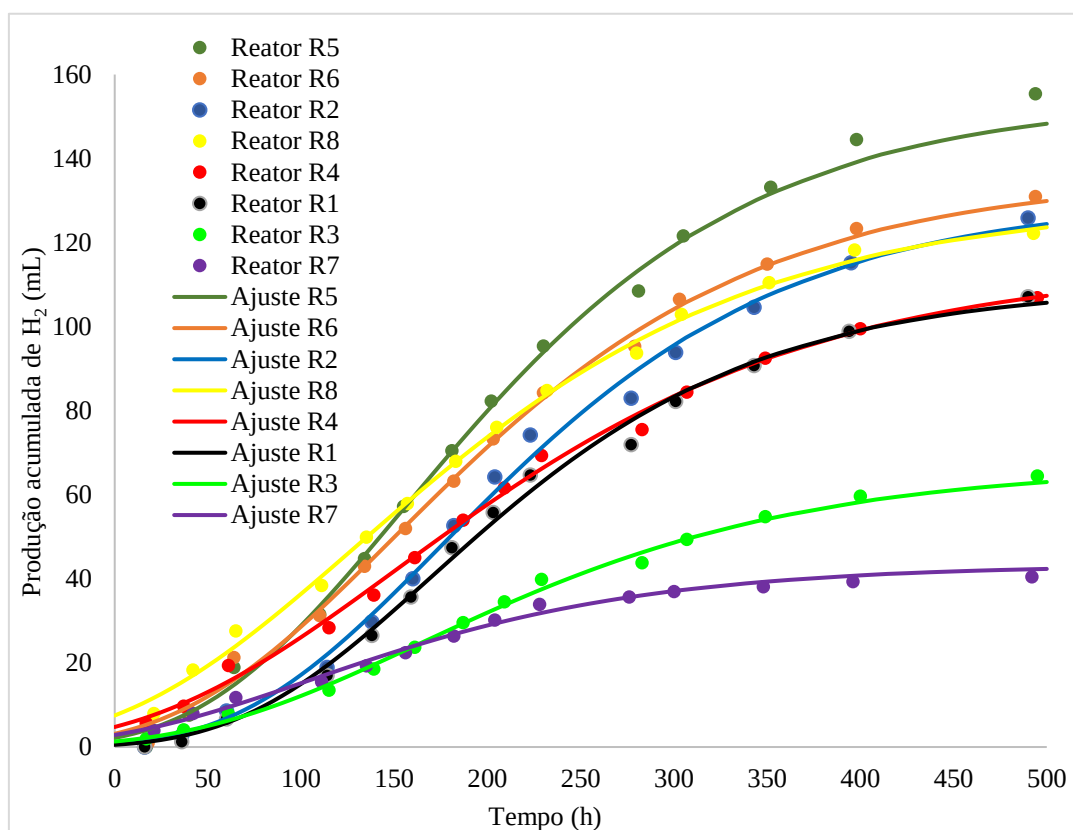
presentes no meio, uma vez que o substrato é convertido em produto pela ação dos microrganismos.

O R3 foi o que apresentou maior eficiência de consumo de carboidratos, porém sua produção de H_2 foi pequena em relação aos demais, ocasionando um menor rendimento. Isso pode estar relacionado a via de fermentação utilizada pelos microrganismos presentes no reator.

5.3 Estudo dos parâmetros cinéticos na produção de hidrogênio

A produção de hidrogênio foi acompanhada por 20 dias, equivalente a aproximadamente 500 h até atingir a estabilidade em reator anaeróbio em batelada nas condições estabelecidas no planejamento experimental. Os dados relativos à produção acumulada de hidrogênio em função do tempo para todos os tratamentos foram ajustados ao modelo de Gompertz modificado (Equação 10) e são apresentados no Anexo 1. Importante salientar que não houve produção de metano em nenhum dos reatores. A Figura 16, mostra a produção acumulada ao longo do tempo de experimento de cada tratamento, bem como a curva de ajuste dos dados ao modelo de Gompertz Modificado.

Figura 16: Gráfico comparativo da produção acumulada de hidrogênio de todos os reatores



Fonte: Autora (2023).

Os ajustes por meio da função de Gompertz modificado foram realizados utilizando a média dos valores obtidos pelas réplicas dos reatores em cada tratamento do planejamento experimental, fornecendo valores referentes a P , R_m e λ (Tabela 11).

Tabela 11: Dados dos reatores para produção de hidrogênio calculado a partir do Modelo de Gompertz Modificado

Reatores	Parâmetros cinéticos					R ²
	H ₂ (mL)	P (mL)	R _m (mL/h)	HY (mol H ₂ / mol glicose)	λ (h)	
R1	107,18 ± 13,36	109,9 ± 15,70	0,40 ± 0,07	1,2	68,60 ± 0,35	0,9957
R2	125,95 ± 2,62	129,95 ± 163	0,45 ± 0,07	1,6	68,25 ± 2,47	0,9955
R3	65,45 ± 8,84	69,20 ± 9,55	0,20 ± 0,00	0,7	43,85 ± 0,78	0,9966
R4	106,90 ± 3,82	115,10 ± 2,83	0,32 ± 0,00	1,0	21,05 ± 5,87	0,9961
R5	155,45 ± 2,76	163,30 ± 3,96	0,51 ± 0,00	0,9	47,05 ± 5,16	0,9975
R6	131,00 ± 11,6	137,65 ± 14,21	0,45 ± 0,07	1,0	36,90 ± 12,45	0,9971
R7	40,55 ± 20,72	43,45 ± 20,28	0,20 ± 0,14	0,7	17,55 ± 24,82	0,9916
R8	122,25 ± 9,83	130,7 ± 11,46	0,40 ± 0,00	0,5	6,95 ± 5,73	0,9972

P - Potencial máximo de produção de H₂; R_m - Taxa máxima de produção de H₂; λ (h) - Duração da fase lag; HY – Rendimento de hidrogênio; R² - Coeficiente de regressão.

Fonte: Autora (2023).

Os coeficientes de determinação (R^2) encontrados de todos os ajustes foram de 0,9916 a 0,9975, indicando que o modelo aplicado descreve satisfatoriamente o progresso da produção acumulativa de hidrogênio nos ensaios em batelada deste estudo.

O potencial máximo e a taxa máxima de produção de hidrogênio foram 163,30 mL e 0,52 mL.h⁻¹, respectivamente para o reator R5 (DQO 5 g. L⁻¹, 120 rpm e inóculo de fermentação natural) e o mínimo foram de 43,45 mL, e 0,20 mL.h⁻¹, respectivamente para o R7 (DQO 5 g. L⁻¹, 120 rpm e inóculo de lodo de ETE). Observou-se também que os reatores R1, R2, R5 e R6, inoculados com fermentação natural, tiveram os maiores resultados de produção de hidrogênio, o que demonstra que a fermentação natural pode ser utilizada como inóculo, oferecendo um consórcio microbiano capaz de produzir hidrogênio.

Para fins de comparação entre a produção e o rendimento de hidrogênio, utilizou-se resultados de trabalhos com inóculos mistos e culturas puras e efluentes diversos, sejam residuais ou sintético que tem boa disponibilidade na literatura. Isto ocorre porque a literatura é escassa em trabalhos abordando a fermentação natural, especificamente efluente de cervejaria.

Estevam (2018), obteve uma produção acumulada de 173 mL de H₂ quando utilizou efluente de cerveja como substrato numa DQO de aproximadamente 4 g. L⁻¹ em reator anaeróbio com agitação mecânica inoculados com cultura pura de *Enterobacter* por 72h. Já Del Angel-Acosta (2021), obteve produção máxima de 191 mL de H₂ quando utilizou efluente de cervejaria inoculado com lodo de UASB tratado termicamente em reatores em batelada por aproximadamente 500 h.

Quanto ao rendimento ou produtividade de hidrogênio, os resultados indicam que o presente trabalho obteve resultados semelhantes ao encontrado na literatura conforme apresentados na Tabela 12.

Tabela 12: Comparação dos resultados obtidos neste trabalho e resultados da literatura para o rendimento de hidrogênio.

Referência	Substrato	HY
Este estudo	Resíduo de cervejaria	0,50 – 1,60 mol H ₂ /mol glicose
Estevam (2018)	Resíduo de cervejaria	0,80 - 1,67 mol H ₂ / mol glicose
Gomes et al. (2015)	Efluente sintético	0,60 mol H ₂ /mol sacarose
Fang et al., (2002)	Efluente cervejaria	1,10 mol H ₂ / mol glicose
Pachiega et al., (2019)	Efluente cervejaria	1,30 mol H ₂ /mol sacarose
Arantes (2018)	Efluente cervejaria	0,73 – 1,15 mol H ₂ /mol glicose

Fonte: Autora (2023)

Em relação a fase *lag* (tempo necessário para comunidade microbiana se adaptar e iniciar a produção de hidrogênio) os resultados estiveram dentro do esperado, o que demonstra uma boa adaptação do inóculo. Porém, vale ressaltar que os reatores R5, R6, R7, R8 que foram agitados a 120 rpm apresentaram uma fase *lag* menor quando comparados com reatores com a mesma composição sem agitação. É possível inferir que a agitação contribuiu com o crescimento microbiano no meio reacional.

5.4 Análise Estatística

A fim de avaliar os efeitos da carga orgânica expressa em DQO (A), o tipo de inóculo (B) e a agitação (C) na produção de hidrogênio, os dados experimentais da Tabela 11, foram submetidos à análise de regressão, utilizando a produção máxima de hidrogênio como resposta.

Os coeficientes de regressão e correlação, bem como os erros padrão dos planejamentos experimentais, t-valor e p-valor, considerando-se 5% de significância, são descritos na Tabela 13.

Tabela 13: Coeficientes de regressão, erros padrão e valor de p do planejamento experimental 2³.

	Variáveis	Efeito	Coef.	Erro Padrão	t-valor	p-valor
P (mL)	Modelo		106,72	2,57	41,49	0,000
	A	29,61	14,80	2,57	5,76	0,001
	B	-46,35	-23,17	2,57	-9,01	0,000
	C	11,18	5,59	2,57	2,17	0,057
	AB	32,46	16,23	2,57	6,31	0,000
	AC	-1,00	-0,50	2,57	-0,18	0,859
	BC	-15,49	-7,74	2,57	-3,01	0,015
	ABC	20,62	10,31	2,57	4,01	0,003
	R ²	95,34				

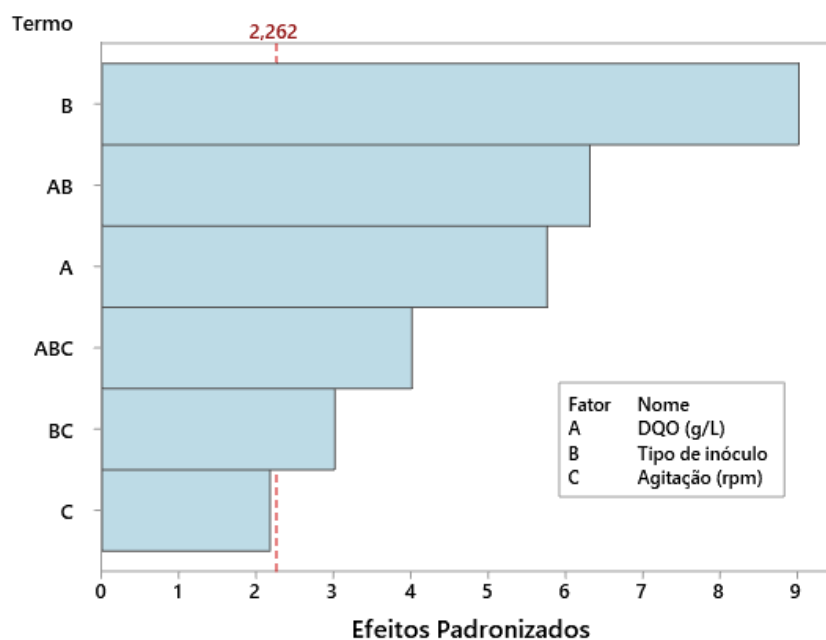
A – DQO (g. L⁻¹); B – Tipo de inóculo; C – Agitação (rpm); AB - DQO x Tipo de inóculo; BC - Tipo de inóculo x agitação; ABC – DQO x Tipo de inóculo x agitação.

Fonte: Autora (2023).

Sabe-se que interações são estatisticamente significativas a partir da verificação dos valores de teste-t, p-valor, como também do limite de confiança. O teste t comparou o valor t (8) calculado com o t_{student} (tabelado), ou seja, se $|t| > t_{\text{student}}$ (seja $t_{\text{student}} = 2,31$), juntamente com o p-valor, onde considera-se $p < 0,05$, conclui-se que diante dessas constatações, apenas o efeito linear da DQO (A) e tipo de inóculo (B); o efeito da interação da DQO e tipo de inóculo (AB), e a interação do tipo de inóculo e agitação (BC) foram altamente significativos na produção máxima de hidrogênio, indicando que esses termos tiveram grande impacto na variável resposta. O efeito da agitação (C) e a interação entre DQO e agitação (AC) tiveram pouco impacto na produção de hidrogênio, porém o efeito da agitação (C) foi ainda considerado, pois ele influenciou nas interações BC e ABC. Tais comportamentos podem ser identificados através da análise do Diagrama de Pareto (Figura 17). O cálculo do efeito é realizado para analisar como cada variável influencia na resposta experimental.

Apesar da interação ABC apresentar um valor-p inferior a 0,05, conforme descrito na literatura, interações de 3 fatores ou mais não devem ser incorporados ao modelo (SCHWAAB, 2007).

Figura 17: Gráfico de Pareto em resposta a produção máxima de hidrogênio, usando como parâmetro $\alpha = 0,05$



A – DQO (g. L⁻¹); B – Tipo de inóculo; C – Agitação (rpm); AB - DQO x Tipo de inóculo; BC - Tipo de inóculo x agitação; ABC – DQO x Tipo de inóculo x agitação.

Fonte: Autora (2023).

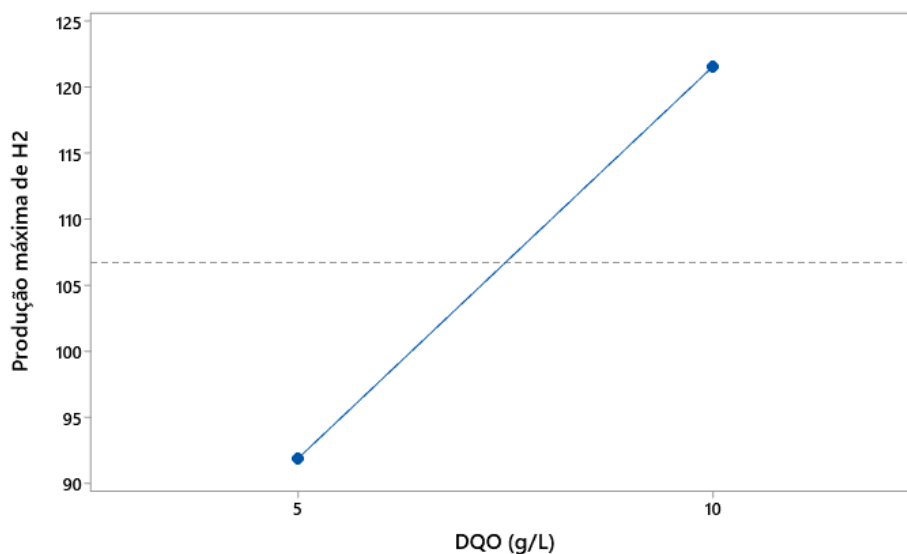
A seguir será apresentada a análise da influência das variáveis independentes e das interações entre elas no planejamento 2^3 tendo como resposta a produção máxima de hidrogênio (P) através da tabela de efeitos.

5.4.1 Influência da Matéria orgânica em termos de DQO, Tipo de inóculo e Agitação no Potencial máximo de produção P (mL)

i. Influência da Matéria orgânica em termos de DQO

A produção máxima de hidrogênio aumentou em média 29% quando a matéria orgânica expressa em DQO aumentou de 5 para 10 g. L⁻¹, passando de valores médios de 92 mL para 121mL de H₂, como mostra a Figura 18.

Figura 18: Gráfico do efeito principal da DQO para produção máxima de H₂ (médias ajustadas).



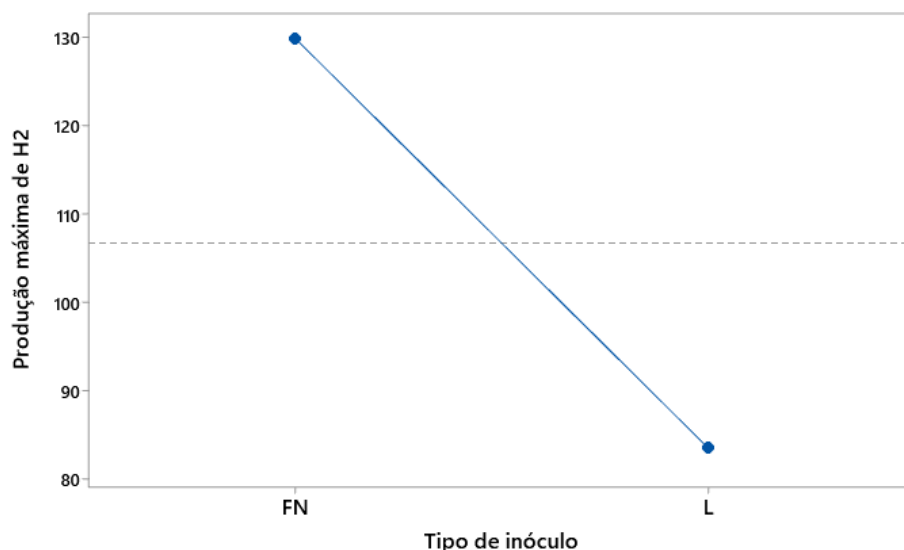
Fonte: Autora (2023).

Resultados similares foram encontrados por Peixoto et al. (2015), quando utilizou fécula de mandioca como substrato numa DQO de 2 g. L⁻¹, obtendo um potencial de hidrogênio de 97,9 mL. Já Chen et al. (2015), analisou diferentes concentrações de substrato e verificou que utilizando concentrações de 4,5 e 9,0 g. L⁻¹ do substrato, obteve valores de 157 e 244 mL de H₂ respectivamente. O autor, evidencia que o grande aumento da concentração pode afetar a produção de hidrogênio porque a eficiência da produção de biohidrogênio está altamente relacionada ao controle ótimo da razão do substrato para a biomassa (S/X).

ii. Influência do tipo de inóculo

Através da análise da Tabela 13, é possível verificar que a variável com maior efeito foi o tipo de inóculo, evidenciando que há uma redução média de 46% na produção máxima quando foi utilizado o inóculo de lodo de ETE ao invés do autofermentado. A Figura 19, demonstra essa queda na produção de cerca de 131 mL para 84 mL de H₂. O rendimento de hidrogênio médio foi aproximadamente 1,2 mmol H₂/mmol glicose quando utilizado a fermentação natural e 0,7 mmol H₂/mmol glicose para lodo de ETE.

Figura 19: Gráfico do efeito principal tipo de inóculo para produção máxima de H_2 (médias ajustadas).



FN- Fermentação natural; L- Lodo de ETE

Fonte: Autora (2023).

Autores que trabalharam com autofermentação conseguiram resultados semelhantes. Perna et al., (2013) obteve rendimento de 1,1 mmol H_2 /mmol lactose, quando utilizou como inóculo a fermentação natural do soro de queijo na produção de biohidrogênio; Gomes et al. (2015) encontrou rendimento de 2,1 mmol de H_2 /mmol de sacarose em reatores anaeróbios alimentados com água residuária sintética a base de sacarose e inoculação natural.

Como já mencionado anteriormente, é escassa a utilização de fermentação natural do próprio substrato como inóculo no processo anaeróbio para produção de hidrogênio quando comparado a utilização dos inóculos mistos, porém a fermentação natural trata-se de uma maneira de multiplicar a biomassa anaeróbia em condições favoráveis na seleção de bactérias produtoras de hidrogênio, tornando o processo vantajoso, já que não é necessário o seu pré-tratamento.

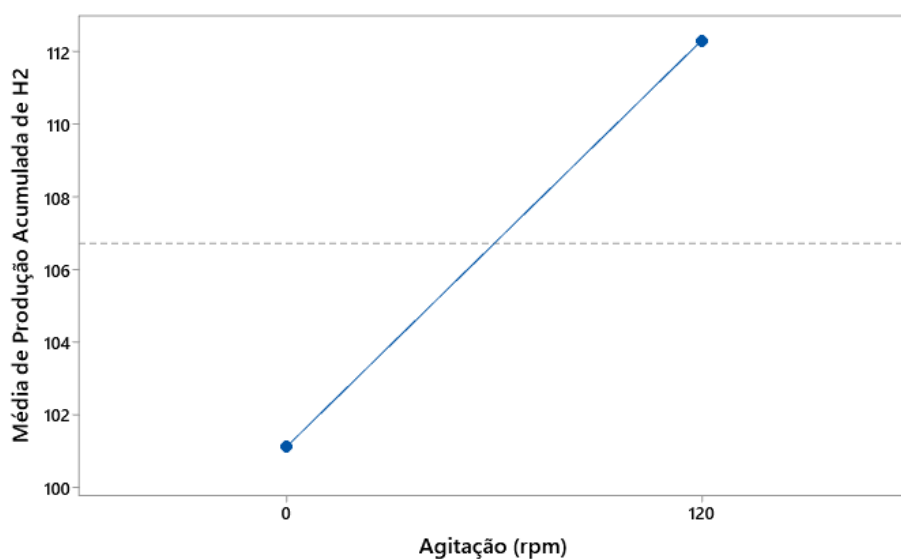
Comparando os resultados observados e as faixas de valores obtidos no presente trabalho, é possível observar o potencial promissor da fermentação natural como inóculo para produção de biohidrogênio, corroborando os estudos anteriores que demonstraram grande potencial de produção de hidrogênio, utilizando a autofermentação da vinhaça como inóculo (TELLES, 2015).

iii. Influência da agitação

Foi observado que a agitação de forma isolada não influenciou significativamente na produção de hidrogênio, porém houve um acréscimo em média de 11%, quando foi utilizado a agitação de 120 rpm (Figura 20). Autores relatam que a agitação promove a mistura do líquido e da biomassa dentro do reator, favorecendo o melhor contato e aumentando a produção de biogás (VERONEZE, 2019) e por isso é considerado um fator positivo no processo.

Apesar da agitação de forma isolada não ter influência significativa na resposta do tratamento, foi possível perceber sua influência quando houve interação com outros fatores como mostra Tabela 13, porém essas interações serão abordadas em um tópico específico.

Figura 20: Gráfico do efeito principal tipo da agitação para produção máxima de H_2 (médias ajustadas).



Fonte: Autora (2023).

5.4.2. Influência das interações das variáveis aplicadas no planejamento experimental

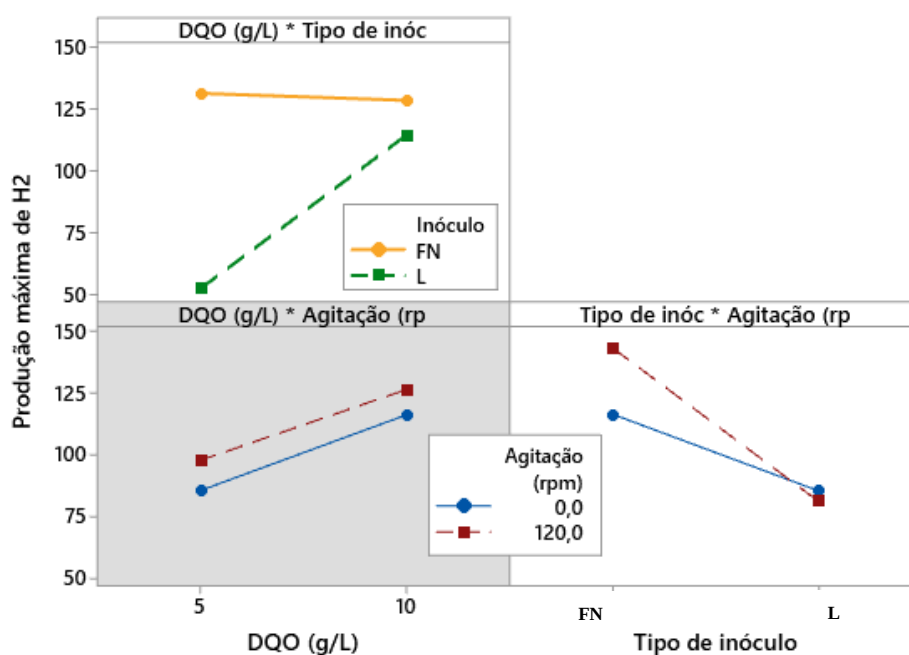
Em relação às observações realizadas em torno dos efeitos das interações (Figura 21), na interação da DQO com o tipo do inóculo, observa-se que ao utilizar o inóculo de B (lodo misto de ETE), há um aumento do rendimento de produção de hidrogênio na DQO de 10 de g/L, e assim, uma DQO maior é favorável ao processo quando utilizado o lodo de ETE como inóculo. Entretanto, em relação ao inóculo de fermentação natural, qualquer que seja a DQO, o

rendimento é praticamente o mesmo. Além disso, como já relatado, a produção máxima ao utilizar o inóculo FN (fermentação natural) foi superior ao inóculo L (lodo misto) em qualquer DQO, demonstrando a viabilidade de sua utilização como inóculo.

Já analisando a interação da DQO e agitação, percebe-se um discreto aumento da produção de H_2 quando se utiliza a DQO de 10 g/L, seja nos reatores com ou sem agitação e esse pequeno aumento é mais evidente nos reatores submetidos a agitação de 120 rpm.

Por fim, analisando a interação do tipo de inóculo e da agitação, verifica-se que a maior produção foi atingida quando os reatores foram submetidos a agitação de 120 rpm em relação ao inóculo de autofermentação. A produção de hidrogênio foi praticamente a mesma quando se utilizou o inóculo de lodo de ETE, seja com ou sem agitação.

Figura 21: Gráfico do efeito das interações para produção máxima de H_2 (médias ajustadas).



Fonte: Autora (2023).

5.4.3. Análise da Variância e teste-f

A influência das variáveis dependentes na produção máxima de H_2 foram examinados pela análise de variância (ANOVA). Na Tabela 14, são mostrados os resultados da análise de

variância para o modelo linear com potencial máximo de produção (P) como variável de resposta.

Tabela 14: Análise da variância para o ajuste do modelo linear aos dados da Tabela 13.

Fonte de Variação	GL	Soma Quadrática	Média Quadrática	Valor-F	Valor-P
Modelo	6	19.480,4	3.246,74	30,72	0,000
Linear	3	12.605,4	4.201,80	39,75	0,000
A	1	3.511,7	3.511,75	33,22	0,000
B	1	8.591,4	8.591,44	81,28	0,000
C	1	502,2	502,21	4,75	0,057
AB	1	4.217,2	4.217,20	39,90	0,000
BC	1	955,4	955,437	9,04	0,015
ABC	1	1.702,4	1702,39	16,11	0,003
Erro	9	951,3	105,70		
Falta de ajuste	1	3,8	3,84	0,03	0,862
Erro puro	8	947,5	118,44		
Total	15	20431,7			
R ²	95,34 %				

Fonte: Autora (2023).

Observa-se na Tabela 14, que o valor calculado de F para a regressão ($MQ_{\text{regressão}}/MQ_{\text{resíduo}}$) foi de 30,72 para o potencial máximo de produção (P). Realizando um comparativo com o valor de $F_{6,9}$ tabelado (3,37), verifica-se que o $F_{6,9}$ calculado foi maior, ou seja, $F_{\text{cal } 6,9} > F_{\text{tab } 6,9}$, apresentando assim regressões significativas a partir do teste F.

Analisando o teste F para falta de ajuste, observa-se que o valor de $F_{1,8}$ calculado foi de 0,03 para o potencial máximo de produção (P) e em comparação ao $F_{1,8}$ tabelado (5,32), portanto, constata-se que o potencial máximo de produção apresenta significância por possuir $F_{\text{cal } 1,8} < F_{\text{tab } 1,8}$.

Neste sentido, entende-se que os coeficientes de regressão linear apresentados na Tabela 13, podem prever as respostas do potencial máximo de produção de hidrogênio, tendo como resultado a obtenção da equação do modelo linear (Equação 10). De acordo com a

determinação das variáveis significativas foi possível definir o modelo que auxilia na predição de valores para condições estabelecidas.

O modelo linear que foi significativo está disposto na Equação 11, a partir das quais é possível prever as respostas de potencial máximo de produção para quaisquer variáveis independentes (A – DQO (g/L); B – Tipo de inóculo; C – Agitação)

$$P \text{ (mL)} = 106,72 + 14,82 A - 23,17 B + 5,60 C + 16,24AB - 7,73BC \quad (11)$$

Vários indicadores, tais como significância do modelo (valor-F) e coeficiente de correlação (R^2) foram utilizados para avaliar a adequação do modelo ajustado. A significância do modelo (valor-F) indica o nível de confiança que o modelo selecionado tem em relação ao seu erro (SHI, 2010). O R^2 significa quão próximo os dados estão da linha de regressão ajustada e um valor acima de 80% sugere um bom ajuste para o modelo (SHI, 2010). Já o valor-p, mostra a significância do modelo, indicando que é muito improvável que tenha ocorrido por acaso, logo os termos são significativos quando ($P < 0,05$). Analisando os resultados da Tabela 12, observa-se que p apresenta valor igual a 0,000, mostrando que o modelo foi altamente significativo, e R^2 de 95,34%, demonstrando o bom ajuste da linha de regressão ao modelo.

Importante ressaltar que, apesar do modelo ter sido obtido a partir de um planejamento 2^K , apresenta uma variável qualitativa, e em virtude disso, será utilizado como um modelo norteador para novos estudos.

5.5 Composição dos Metabólitos Solúveis Produzidos (SMPs)

Durante a etapa de fermentação há o consumo de açúcares pelos microrganismos, levando a produção de vários metabólitos (ácidos e solventes) junto ao hidrogênio formado, provocando uma possível redução de pH em virtude do aumento da acidez (GOMES et al., 2015). Estes metabolitos são indicadores úteis para caracterizar o desempenho do processo de fermentação, porém a formação de alguns deles podem causar a inibição da produção de hidrogênio. Além disso, os açúcares fermentescíveis podem levar à produção de álcool (principalmente etanol).

Como cada componente tem massa molecular diferente, para uma análise mais clara e simples da predominância de cada componente em relação ao total de produtos líquidos produzidos, são apresentadas na Tabela 15 as concentrações molares iniciais e finais dos álcoois e ácidos e a porcentagem de cada um em relação aos metabólitos solúveis produzidos em cada tratamento nos reatores em batelada.

Todos os tratamentos tiveram a presença de metanol, etanol, ácido acético, ácido propiônico, ácido butírico e ácido valérico em diferentes concentrações. Acetona, n-butanol e ácido capróico não foram detectados.

Tabela 15: Concentrações iniciais e finais dos metabólitos solúveis produzidos em cada reator.

Reatores	Etapa	Metabólitos Solúveis Produzidos											
		Metanol		Etanol		Ác. Acético		Ác. Propiônico		Ác. Butírico		Ác. Valérico	
		mmol/L	%	mmol/L	%	mmol/L	%	mmol/L	%	mmol/L	%	mmol/L	%
R1	Inicial	0,51	0,48	13,07	12,34	84,11	79,39	7,66	7,23	0,40	0,38	0,20	0,19
	Final	0,62	0,53	40,63	35,05	69,49	59,95	1,55	1,34	2,04	1,76	1,59	1,37
R2	Inicial	0,54	1,65	8,51	26,03	21,31	65,21	1,48	4,53	0,39	1,19	0,45	1,38
	Final	0,71	0,52	72,20	53,17	58,94	43,41	1,75	1,29	1,04	0,76	1,15	0,85
R3	Inicial	0,52	5,48	4,13	43,89	1,38	14,67	1,03	10,93	0,97	10,34	1,38	14,68
	Final	0,52	5,15	6,64	65,30	0,12	1,16	0,75	7,38	0,86	8,46	1,28	12,55
R4	Inicial	0,52	3,66	8,83	62,38	2,16	15,25	0,59	4,16	0,80	5,65	1,26	8,90
	Final	0,53	2,91	14,86	82,15	0,12	0,65	0,63	3,48	0,76	4,19	1,20	6,63
R5	Inicial	0,51	0,48	13,07	12,34	84,11	79,39	7,66	7,23	0,40	0,38	0,20	0,19
	Final	0,68	0,80	39,04	46,15	41,06	48,54	1,27	1,50	1,43	1,70	1,11	1,31
R6	Inicial	0,54	1,65	8,51	26,03	21,31	65,21	1,48	4,53	0,39	1,19	0,45	1,38
	Final	0,65	0,44	27,49	18,58	114,32	77,26	2,12	1,43	1,88	1,27	1,51	1,02
R7	Inicial	0,52	1,76	4,13	14,08	21,31	72,63	1,03	3,51	0,97	3,32	1,38	4,71
	Final	0,52	2,82	7,16	38,65	6,12	33,00	0,77	4,15	1,61	8,69	2,35	12,68
R8	Inicial	0,52	3,87	8,83	66,01	1,38	10,32	0,59	4,41	0,80	5,98	1,26	9,41
	Final	0,53	2,26	11,90	50,53	7,94	33,73	0,49	2,10	1,00	4,25	1,68	7,12

Fonte: Autora (2023)

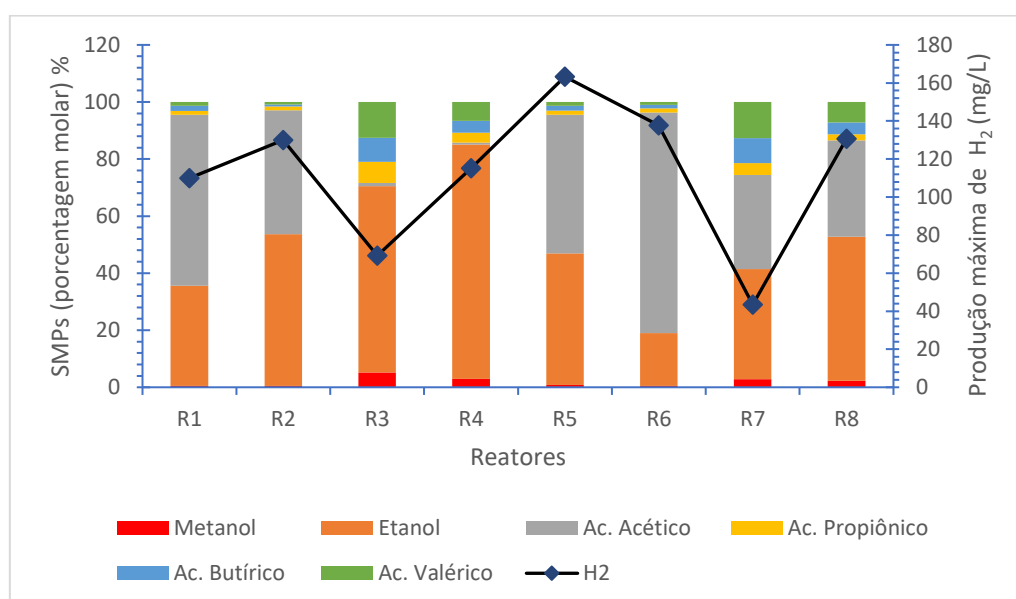
Em relação aos álcoois, percebe-se que, as concentrações de metanol se mantiveram aproximadamente constantes nas etapas iniciais e finais do processo, enquanto as concentrações de etanol tiveram aumentos expressivos no final do processo.

Observou-se que os reatores com inóculo de fermentação natural e com maior concentração de DQO tiveram aumentos da quantidade de etanol, com exceção do R6, que tinha o mesmo inóculo do R5, com carga orgânica maior e não acompanhou o comportamento dos demais. Autores têm apontado que o aumento da carga orgânica aplicada e tempos de fermentação mais longos favorecem a rota de fermentação etanólica com consumo de glicose e produção de etanol e CO₂ (FERNANDES et al., 2013; ANZOLA-ROJAS et al., 2015; GOMES et al., 2015).

A maior produção de etanol nos reatores que tiveram a fermentação natural como inóculo se justifica pelo tipo de microrganismos presentes, visto que o processo de autofermentação foi realizado em ambiente aberto e por isso microrganismos anaeróbios facultativos fazem parte da comunidade microbiana. Esses microrganismos facultativos anaeróbios têm a característica de produzir ácidos, mas também álcoois.

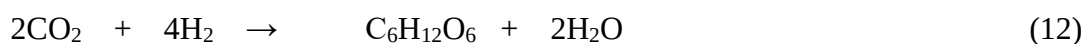
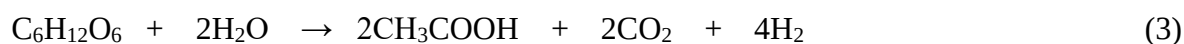
A distribuição percentual dos SMPs nos diferentes reatores pode ser mais bem observada na Figura 22.

Figura 22: Distribuição percentual de cada metabólito produzido nos diferentes reatores



Fonte: Autora (2023)

Baseando-se na fração molar, os reatores R1, R2, R5 e R6 que foram inoculados com fermentação natural apresentaram em sua composição o maior conteúdo de ácido acético (60, 43, 48, 77% respectivamente), isso está diretamente relacionado com os rendimentos obtidos. Percebe-se que esses reatores apresentaram rendimentos (HY) maiores (1,2;1,6; 0,9 e 1,0 mmol H₂/mmol glicose) respectivamente, o que sugere a rota acética como umas das principais para produção de hidrogênio, já que essa leva aos maiores rendimentos teóricos de H₂, onde 1 mol glicose consegue produzir 4 mols de hidrogênio, como mostra a Equação 3. Entretanto, nem sempre a presença do ácido acético está ligada ao alcance de altos HYs porque bactérias homoacetogêncas podem utilizar o H₂ para produzir ácido acético (Equação 12). Contudo, na prática, a presença de ácido acético não garante necessariamente um alto HY.



A Figura 22, evidencia que a composição desses reatores se dividiu praticamente entre ácido acético e etanol. Essa grande quantidade de etanol produzida pode justificar rendimentos inferiores ao rendimento teórico que poderia ser alcançada pela rota acética, pois, a rota etanólica é considerada competitiva pelo consumo de glicose (Equação 6, item 3.5). Ou seja, para produção de etanol é consumido substrato que poderia ser utilizado para produção de hidrogênio. Alguns autores, Li et al., (2007), Guo et al., (2010) e Zhu et al., (2013) também obtiveram etanol e ácido acético majoritariamente representando os metabólitos solúveis produzidos. Nesse contexto, é possível a produção simultânea de hidrogênio e etanol, assim como Rosa et al., (2014b), que avaliaram a produção de hidrogênio e etanol a partir do soro do leite e obtiveram rendimentos máximos de 1,33 mol H₂.mol⁻¹_{lactose} e 1,22 mol etanol. mol⁻¹_{lactose}.

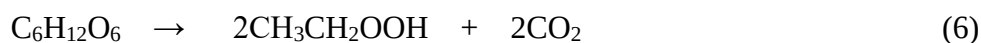
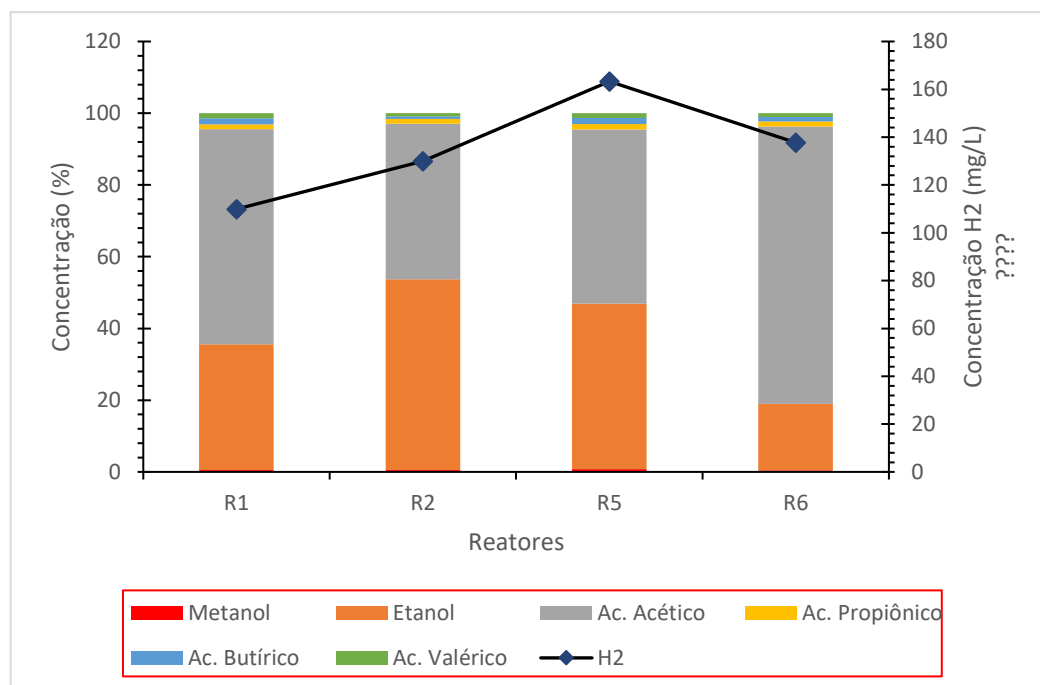


Figura 23: Distribuição percentual de cada metabólito produzido nos reatores inoculados com fermentação natural



Fonte: Autora (2023)

Outro aspecto relevante, é a possível presença de ácido láctico, relacionada com baixos valores de HY. Isso ocorre porque o ácido láctico é produzido por uma via competitiva (Equação 13) que consome o substrato e nela não há produção e nem consumo de H₂ (NUALSRI, 2016). Não foi possível realizar análise de ácido láctico e por este motivo não há quantificação para fortalecer a discussão.



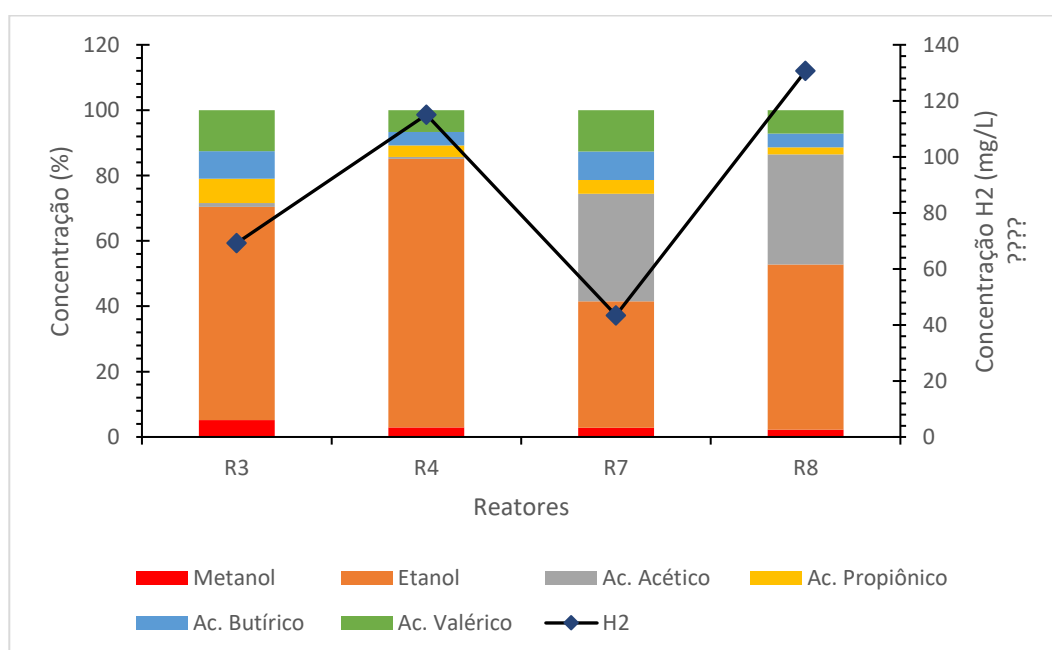
Nos reatores R3, R4, R7 e R8 que foram inoculados com lodo de ETE (Figura 24) é possível perceber que a rota principal foi a do etanol, apresentando porcentagens de 65, 82, 39 e 51% respectivamente dos metabólitos solúveis produzidos. Os reatores R7 e R8, também apresentaram um conteúdo de ácido acético, cerca de 33 e 34% respectivamente. Tais comportamentos, prevê uma fermentação por via etanólica.

Esses reatores foram os que concomitantemente tiveram as maiores concentrações de ácido propiônico (7, 3, 4 e 2% respectivamente) o que pode ter contribuído para menor

produção de hidrogênio, visto que nessa rota fermentativa (Equação 5, item 3.5) são consumidos 2 mols de H_2 para produzir 2 mols do mesmo, sendo assim uma rota desfavorável para produção de H_2 . Essa evidência pode ser corroborada com os resultados do R4 e R7, que entre todos os reatores tiveram a menor produção acumulada de hidrogênio (69 e 40 mL) e tiveram maior conteúdo de ácido propiônico produzido. Já nos reatores com inoculação de fermentação natural o ácido propiônico se comportou da mesma maneira em todos os reatores, representando aproximadamente 1% da sua composição.



Figura 24: Distribuição percentual de cada metabólito produzido nos reatores inoculados com lodo anaeróbio de ETE



Fonte: Autora (2023)

5.6 Avaliação da diversidade microbiana através da técnica de Biologia Molecular

O metabolismo microbiano depende de uma série de fatores, como disponibilidade de nutrientes, pH, presença ou ausência de oxigênio, tempo e temperatura. Em condições ideais, o tempo de crescimento de alguns microrganismos pode variar de horas a alguns dias, dependendo da espécie (OLIVEIRA et al., 2023)

Através do alinhamento de sequências de nucleotídeos foi, possível encontrar regiões de similaridades entre diferentes espécies e comparar com as sequências depositadas no banco de dados do NCBI, usando uma ferramenta Blast de nucleotídeos (BLASTn) (EDGAR, 2010).

Foram enviadas para sequenciamento amostras dos reatores que tiveram maior e menor produção de hidrogênio (inicial e final do processo), além dos 2 inóculos e do substrato. Entretanto, os produtos de PCR das amostras do inóculo de lodo de ETE e da amostra inicial do reator que menos produziu H_2 apresentaram baixa qualidade no sequenciamento e por isso não foi possível montar os contigs (conjunto de seguimento de DNA).

A Tabela 16, apresenta as espécies encontradas nas amostras com maiores similaridade. Segundo López et al. (2006), a identificação de bactérias em nível de espécie pode ser inferida se a sequência do fragmento apresentar valores de similaridade acima de 97%.

Tabela 16: Microrganismos com maior similaridade

Amostra	Microrganismo	Acesso	Filo	Similaridade %	Referência
Resíduo (Substrato)	<i>Lactobacillus brevis</i>	MH665581	Firmicutes	99,05	Guo,Z., Lei,Y. & Zhang,Z.(2018)
	<i>Lactobacillus hammesii</i>	MG462081		99,05	Guo,C.-F (2017)
Fermentação Natural (inóculo)	<i>Furfurilactobacillus rossiae</i>	MG674710	Firmicutes	91,25	Schneiderbanger,J. & Hutzler,M.(2017)
R5 (inicial)	<i>Furfurilactobacillus rossiae</i>	MH936287	Firmicutes	100	Roseira,J.P.S. & Pereira,O.G.(2018)
R5 (final)	<i>Enterobacter sp.</i>	KR676583	Enterobacteria	99,76	Luo,M.J.(2015)
R7 (final)	<i>uncultured bacterium</i> (bactéria não cultivada in vitro)	AM500813	Firmicutes	99,27	Guo,Y.(2007)

R5 – reator com maior produção acumulada de H_2 ; R7 – reator com menor produção acumulada de H_2 .
Fonte: Autora (2023)

Dentre a diversidade da comunidade microbiana, observou-se que os *Lactobacillus* foi a espécie comum entre as amostras dos reatores iniciais e inoculados com fermentação natural. De acordo com Bueno et al., (2021), é frequente esse tipo de bactérias em bebidas fermentadas. Essas espécies são comuns em ambientes ricos em açúcar e favoráveis a

fermentação e produzem ácido láctico a partir de açúcares e ácido acético a partir do álcool (OLIVEIRA et al., 2023). Além disso, são resistentes a baixos valores de pH e altas concentrações de álcool, o que justifica sua presença no resíduo oriundo do tanque de cervejaria. Autores encontraram resultados semelhantes em outras amostras de fermentados alcoólicos (ESCALANTE et al., 2004; BEEK e PRIEST, 2003; OLIVEIRA et al., 2023).

Em relação as amostras dos reatores finais, observou-se que o R5 (reator com inóculo FN), teve predominância da *Enterobacter sp.* pertencente à família das *Enterobacteriaceae*, que abrange uma ampla gama de espécies aeróbias e anaeróbicas facultativas produtoras de ácidos e gases e está relacionada às características típicas de carbonatação da bebida (BRENNER e FARMER, 2015). De acordo com Peixoto (2008) a espécie *Enterobacter sp* está associada a geração de H_2 , fato que justifica esse reator como sendo o que teve a maior produção de hidrogênio, indicando que a fermentação natural pode ser uma alternativa viável para produção de $bioH_2$.

Apesar das *Enterobacter* apresentarem menor rendimento na produção de hidrogênio quando comparadas com *Clostridium*, por exemplo, esse gênero pode consumir oxigênio e ajudar a manter um ambiente anaeróbio dentro do reator, fato que não acontece com o gênero *Clostridium* (HUNG et al., 2011). Vários estudos descreveram o potencial das espécies de *Enterobacter* na produção de hidrogênio de diferentes substratos para aumentar a produção fermentativa de hidrogênio, favorecendo o consumo de oxigênio (HARUN et al., 2012; SUN et al., 2015).

Já as amostras do reator R7 (reator com inóculo de ETE), apresentaram predominância de *uncultured bacterium* (bactéria não cultivada) do Filo *Firmicutes*, provavelmente bastonetes Gram-positivos formadores de esporos (PACHIEGA et al, 2019). Resultado que justifica a menor produção de hidrogênio dentre todos os tratamentos, visto que não foi encontrado nenhuma espécie conhecida pela literatura como produtora de H_2 . É importante que sejam realizados nos outros reatores com o mesmo inóculo o sequenciamento para analisar se a predominância dessa espécie foi semelhante.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos visando a produção de hidrogênio têm sido importantes na discussão de alternativas energéticas sustentáveis. O planejamento experimental mostrou que para a produção acumulada de hidrogênio, o tipo de inóculo foi a variável de efeito linear com mais influência. Além disso, o efeito interativo do tipo de inóculo com a DQO foi altamente significativo na taxa de produção de hidrogênio, indicando que esses fatores tiveram grande impacto na variável resposta. Porém, a agitação não demonstrou grande influência na produção de H_2 , apesar dos reatores submetidos a agitação apresentarem maiores produções, essa variável não causou grande impacto na variável de resposta.

A fermentação natural se mostrou atrativa para ser utilizada como inóculo no processo de digestão anaeróbia. Os resultados demonstraram que os reatores inoculados com FN obtiveram maiores produção de H_2 e melhores rendimentos, possuindo vantagens sobre o lodo de ETE, pois não há necessidade de pré-tratamentos para inibir os microrganismos consumidores de H_2 , tornando o processo economicamente mais viável.

A partir dos resultados encontrados é possível concluir que em todas as condições experimentais houve produção de hidrogênio, sendo o R3 e R7 os que apresentaram a menor produção, estes inoculados com lodo de ETE. É importante ressaltar que, nenhum reator apresentou produção de metano, com isso é possível afirmar que fatores como tratamento do inóculo de ETE e faixa de pH foram satisfatórias para eliminar as arqueas metanogênicas.

Em relação a eficiência de DQO se mostrou com resultados esperados para essa etapa da digestão anaeróbia de acordo com valores alinhados a outros estudos. Já o consumo de carboidratos, foi bem inferior ao que se esperava.

Todos os tratamentos tiveram a presença de metanol, etanol, ácido acético, ácido propiônico, ácido butírico e ácido valérico em diferentes concentrações, com ausência de acetona, n-butanol e ácido caproico. Nos reatores inoculados com fermentação as maiores concentrações foram de ácido acético e etanol, enquanto nos inoculados com lodo de ETE houve predominância de etanol.

De acordo com os dados obtidos por meio do sequenciamento, observou-se que a espécie *Enterobacter* sp. foi a que apresentou maior similaridade no reator inoculado com FN

com maior produção de hidrogênio e que as bactérias não cultivadas foram as que apresentaram maior similaridade com o reator inoculado com lodo de ETE de menor produção de H_2 . Isso corrobora o fato de a fermentação natural ser uma alternativa promissora para a produção de hidrogênio, se mostrando vantajosa principalmente em termos de viabilidade econômica, pois não exige pré-tratamentos que podem onerar o processo.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Com intuito de ampliar os estudos e a discussão em torno da fermentação natural de resíduos reais como inóculo, sugere-se os seguintes estudos:

- Realizar estudos considerando o enriquecimento do inóculo da fermentação natural do substrato de cervejaria artesanal, com objetivo de melhorar condições para etapa de hidrólise da digestão anaeróbia.
- Avaliar as melhores condições deste estudo em reatores contínuos.
- Analisar condições favoráveis de produção simultânea de hidrogênio e álcool.

REFERÊNCIAS

- ADORNO, M.A. T.; HIRASAWA, J.S.; VARESCHE, M. B. A. Development and Validation of Two Methods to Quantify Volatile Acids (C2-C6) by GC/FID: Headspace (Automatic and Manual) and Liquid-Liquid Extraction (LLE). **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 5, n. 7 p. 406-414, 2014.
- ALBANEZ, R. **Codigestão de vinhaça e melão em biorreator anaeróbio operado em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada visando a produção de hidrogênio**. Tese (Doutorado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.
- ALMEIDA e SILVA, J.B. **Tecnologia de bebidas: matéria prima, processamento**. BPF / APPCC, legislação e mercado. São Paulo: Edgard Blucher, p.347-380, 2005.
- AMORIM, E.L.C. **Efeito da concentração de glicose e da alcalinidade na produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidificado**. 2009. 163 f. Tese (Doutorado em engenharia hidráulica e saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.
- ANDRADE, A. C. F. F. **Avaliação da produção de hidrogênio por bactérias fototrófica púrpura não-sulfurosa em reator em batelada**. 2007. 89 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento). Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.
- ANDREANI, C. L.; TORRES, D. G. B.; SCHULTZ, L.; CARVALHO, K. P.; GOMES, S. D. Produção de hidrogênio a partir de efluentes de processamento de mandioca em um reator de leito fixo anaeróbio com bambu como material de suporte. **Engenharia Agrícola**, v. 35, p. 578-587, 2015.
- ANZOLA-ROJAS, M. D. P.; FONSECA, S. G.; SILVA, C. C.; OLIVEIRA, V. M.; ZAIAT, M. The use of the carbon/nitrogen ratio and specific organic loading rate as tools for improving biohydrogen production in fixed-bed reactors. **Biotechnology Reports**, v.5, p. 46-54, 2015.
- APHA. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 20a ed. Washington, D. C.: AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. 2005.
- ARANTES, M. K. **Produção de biohidrogênio em reator anaeróbio operado em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada (AnSBBR) a partir de águas residuárias de cervejaria**. 2018, 116 f. Tese (Doutorado em engenharia química) – Centro de Engenharia e Ciências Exatas, Universidade Federal do Oeste do Paraná, Toledo, 2018.
- ARANTES, M. K.; ALVES, J. H.; SEQUINEL, R.; SILVA, E. A. Treatment of brewery wastewater and its use for biological production of methane and hydrogen. **International Journal of Hydrogen Energy**. v. 42, p. 26243-26256, 2017.
- ARGUN, H. F.; KARGI, F.K.; KAPDAN; R. OZTEKIN. Biohydrogen production by dark fermentation of wheat powder solution: Effects of C/N and C/P ratio of hydrogen yield and formation rate. **International Journal of Hydrogen Energy**, n. 33, p. 1813-1819, 2008
- ARMAROLI, W.; BALZANI, V. Energy for sustainable world: From the oil age to a sun powered future. **Weinheim: Wiley – VCH**, 2011.

BARROS, A. R. **Influência de diferentes materiais suporte na produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidizado**. 2009. 101 f. Dissertação (Mestrado em engenharia química) – DEQ, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

BARTACEK, J. ZABRANSKA, J. LENS, P. N.L. Developments and constraints in fermentative hydrogen. **Biofuels, Bioproducts & Biorefining**, v. 1, p. 201-214, 2007.

BEEK, S. V; PRIEST, F.G. Bacterial diversity in Scotch whisky fermentations as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis. **Journal of American Society of Brewing Chemists**, v.61, p.10-14, 2003.

BERGAMASCO, R; TAVARES, C. R. G. Uso de reator de leito fluidizado trifásico no tratamento dos resíduos de laticínios. **Revista UNIMAR**, v. 19, n. 4, p. 1087-1097, 1997.

BRASIL. **Decreto Nº 9.902, DE 8 DE JULHO DE 2019**. Altera o Anexo ao Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009, que regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Disponível em: < https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2019/decreto/d9902.htm> Acesso em: 28 jul. 2023.

BRIGGS, D. E. **Malts and malting**. London: Blackie Academic and Professional, 1998.

BUENO, F. CHOULJENKO, A, SATHIVEL, S. Desenvolvimento de Kombuchá de café contendo *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus casei*: Simulação gastrointestinais e análise microbiana de DNA. **Food Science and Technology**, v. 142 (110980), 2021.

CAMPPELLETTI, B.M. **Efeito da concentração inicial da água residual do processamento da mandioca na produção de biohidrogênio por *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824**. 2009. 105 f. Dissertação (Mestrado em engenharia de alimentos) – Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

CERVBRASIL - Associação Brasileira da Indústria da Cerveja. Anuário, 2016. Disponível em:< http://www.cervbrasil.org.br/novo_site/anuarios/CervBrasil-Anuario2016_WEB.pdf>. Acesso em: 15 mar. 2023.

CHAN, Y.J.; CHONG, M.F.; LAW, C.L.; HASSELL, D.G. A review on anaerobic– aerobic treatment of industrial and municipal wastewater. **Chemical Engineering Journal**, v. 155, n. 1, p. 1-18, 2009.

CHEN, H.; CHANG, S.; GUO, Q.; HONG, Y.; WU, P. Brewery wastewater treatment using an anaerobic membrane bioreactor. **Biochem Engineering Journal**. n. 105, p. 321-331, 2015.

CHEONG, D.Y., HANSEN, C.L. Feasibility of hydrogen production in thermophilic mixed fermentation by natural anaerobes. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2229-2239, 2007.

CHERNICHARO, C.A.L. **Reatores Anaeróbios**: Princípios do tratamento biológico de águas residuárias. 2. ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental. UFMG, 1997. v. 5.

CHOI, J.; AHN, Y. Biohydrogen fermentation from sucrose and piggery waste with high levels of bicarbonate alkalinity. **Energies**, v. 8, n. 3, p. 1716–1729, 2015.

COLIN, X.; FARINET J.-L.; ROJAS O.; ALAZARD, D. Anaerobic treatment of cassava starch extraction wastewater using a horizontal flow filter with bamboo as support. **Science Direct. Bioresource Technology**. v. 98, p. 1602-1607, 2007.

CONAMA- Conselho Nacional de Meio ambiente. Disponível em : < <http://conama.mma.gov.br/>>. Acesso em: 18 mai. 2022.

CUNICO, M. W. M.; CUNICO, M. M.; MIGUEL, O. G.; ZAWADZKI, S.F; PERALTA-ZAMORA, P.; VOLPATO, N. **Planejamento fatorial: uma ferramenta estatística valiosa para a definição de parâmetros experimentais empregados na pesquisa científica**. Visão Acadêmica, Curitiba, v. 9, 2008.

D'AQUINO, F. **Colorado: A cerveja mais premiada do Brasil em 2019**. Disponível em: < <https://www.clubedomalte.com.br/blog/noticias/colorado-cervejaria-mais-premiada-brasil-2019/>>. Acesso em: 06 jul. 2022.

DAS, D.; VERZIROGLU, T. N. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. **Int J Hydrogen Energy**, v. 26, p. 13-28, 2001.

DEL ANGEL-ACOSTA, Y. A. Co-digestion of corn (nejayote) and brewery wastewater at different ratios and pH conditions for biohydrogen production **Int J Hydrogen Energy**, v. 46, p. 27422-27430, 2021

DRAGONE, S. I. M.; ROBERTO, I. C. Bagaço de malte de cerveja. In: LIMA, U. A. (Coord.). **Matéria prima dos alimentos**. São Paulo: Blücher, 2010.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

EDGAR, R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. **Bioinformatics**, v.26, p. 2460-2461, 2010.

EPE – Empresa de pesquisa Energética. Disponível em <https://www.epe.gov.br/pt/abcdenergia/matriz-energetica-e-eletrica>. Acesso em: 18 ago. 2023.

ENITAN, AM.; ADEYEMO, J.; SWALAHA, F.M.; BUX, F. Anaerobic digestion model to enhance treatment of brewery wastewater for biogas production using UASB reactor. **Environ Model Assess**. n. 20, p. 673-685, 2015.

ESCALANTE, A.; RODRÍGUEZ, M.E.; MARTÍNEZ, A.; LÓPEZMUNGUÍA, A.; BOLÍVAR, F.; GOSSET, G. Characterization of bacterial diversity in Pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. **FEMS Microbiology Letters**, v.235, p.273-279, 2004.

ESTEVAM, A. et al. Production of biohydrogen from brewery wastewater using *Klebsiella pneumoniae* isolated from the environment. **International Journal of Hydrogen Energy**, 2018.

FANG, H. H. P.; ZHANG, T.; LIU, H. Microbial diversity of a mesophilic hydrogen-producing sludge. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 58, n. 1, p. 112-118, 2002.

FERNANDES, B.S. **Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo**. 2008. 116 f. Tese (Doutorado em engenharia) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

FERNANDES, B. S.; SAAVEDRA, N. K.; MAINTINGUER, S. I.; SETTE, L. D.; OLIVEIRA, V. M; VARESCHE, M. B. A; ZAIAT, M. The effect of biomass immobilization support material and bed porosity on hydrogen production in an upflow anaerobic packed-bed bioreactor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 170, n. 6, p. 1348–1366, 2013.

FERRAZ Jr., A. D. N. **Digestão anaeróbia da vinhaça da cana-de-açúcar em reator acidogênico de leito fixo seguido de reator metanogênico de manta de lodo**. 2013. 162 f. Tese (Doutorado em engenharia hidráulica e saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

FILLAUDEAU, L.; BLANPAIN-AVET, P.; DAUFIN, G. Water, wastewater and waste management in brewing industries, **Journal of Cleaner Production**. v. 14, p. 463-471, 2006.

FONTES LIMA, D. M.; ZAIAT, M. The influence of the degree of back-mixing on hydrogen production in an anaerobic fixed-bed reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 12, p. 9630– 9635, 2012.

FRINK, L. A.; ARMSTRONG, D. W. Using headspace gas chromatography for the measurement of water in sugar and sugar-free sweeteners and products. **Advance in Food and Beverage Analysis**, v. 34, n. 10, p. 6-13, 2017.

GALDÁMEZ, E. V. C. **Aplicação das técnicas de planejamento e análise de experimentos na melhoria da qualidade de um processo de fabricação de produtos plásticos**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção), Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 133 f, 2002.

GIBSON, G. R., HUTKINS, R. W., SANDERS, M. E., PRESCOTT, S. L., REIMER, R. A., SALMINEN, S. J., SCOTT, K., STANTON, C., SWANSON, K. S., CANI, P. D., VERBEKE, K., REID, G. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 14, p. 491-502, 2017.

GOMES, S.D.; FUESS, L.T.; PENTEADO, E.D.; LUCAS, S.D.M.; GOTARDO, J.T.; ZAIAT, M. The application of an innovative continuous multiple tube reactor as a strategy to control the specific organic loading rate for biohydrogen production by dark fermentation. **Bioresour Technology**. n.197, p. 201-207, 2015.

GUERREIRO. L. **Efluente em cervejaria**. Resposta técnica. Rede de Tecnologia do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. 2006.

GUO, X.M.; TRABLY, E.; LATRILLE, E.; CARRÈRE, H., STEYER, J. Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. Science Direct. **Journal of Hydrogen Energy**, p. 1-14. 2010.

HARUN, I.; JAHIM, J.M.; ANUAR, N.; HASSAN, O. (2012) Hydrogen production performance by *Enterobacter cloacae* KBH3 isolated from termite guts. **Int J Hydrogen Energy**, v. 37, p. 15052-15061, 2012.

HUGHES, G. **Cerveja Feita em Casa: Tudo sobre os ingredientes, os equipamentos e as técnicas para produzir a bebida em vários estilos**. Publifolha. 1 ed. São Paulo, 2014.

HUNG, C.H.; CHENG, C.H.; GUAN, D.W.; WANG, S.T.; HSU, S.C.; LIANG, C.M.; LIN, C.Y. Interactions between *Clostridium* sp. and other facultative anaerobes in a self-formed granular sludge hydrogen-producing bioreactor. **Int J Hydrogen Energy**, v. 36, p. 8704-8711, 2011.

IEA - International Energy Agency. Disponível em: < <https://www.iea.org/data-and-statistics/data-sets/?filter=scenarios> >. Acesso em: 18 ago 2022.

KAPDAN, I.K.; KARGI, F. Bio-hydrogen production from waste materials. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 569-582, 2006.

KIM, S-H.; HAN, S-K.; SHIN, H-. Feasibility of biohydrogen production by anaerobic codigestion of food waste and sewage sludge. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 29, n. 15, p. 1607-1616, 2004.

KUMAR, J. A.; SATHISH, S.; KRITHIGA, T.; PRAVEENKUMAR, T. R.; LOKESH, S.; PRABU, D.; ANNAM RENITA, A.; PRAKASH, P.; RAJASIMMAN, M. A comprehensive review on bio-hydrogen production from brewery industrial wastewater and its treatment methodologies. **Fuel**, v. 319, 2022.

KUNZE, W. **Technology of Malting and Brewing**. Edição 9, Berlim, Alemanha, 2007.

LAMAISON, F.C. **Aplicação da água residuária do processamento da mandioca como substrato para a produção de hidrogênio por processo fermentativo**. 2009. 83 f. Dissertação (Mestrado em engenharia de alimentos) – Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

LAY, C. H.; LIN, H. C.; SEN, B.; CHU, C. Y.; LIN, C. Y. Optimal pH and substrate concentration for fermentative hydrogen production from preserved fruits soaking solution. **J. Environ. Eng. Manag.**, v. 20, p. 35-41, 2010.

LAZARO, C. Z. **Influência da concentração de substrato e da temperatura na produção de hidrogênio a partir da vinhaça da cana-de-açúcar**. 2012. 157 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

LEE, M. J.; SONG, J. H.; HWANG, S. J. Effects of acid pre-treatment on bio-hydrogen production and microbial communities during dark fermentation. **Bioresource technology**, v. 100, n. 3, p. 1491–1493, 2009.

LEE, D. J.; SHOW, K. Y.; SU, A. Dark fermentation on biohydrogen production: Pure culture. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 18, p. 8393– 111, 2011.

LI, Y. F.; REN, N. Q.; CHEN, Y.; ZHENG, G.X. Ecological mechanism of fermentative hydrogen production by bactéria. **International Journal of Hydrogen Energy**. v. 32, n. 6, p. 755-760, 2007.

LIU, F.; FANG, B. Optimization of bio-hydrogen production from biodiesel wastes by *Klebsiella pneumoniae*. **Biotechnology journal**, p. 374–380, 2007.

LIN, C. Y.; LAY, C. H. Effects of carbonate and phosphate concentrations on hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora. **International Journal of Hydrogen Energy**. v.29, p.275-281, 2004.

MAINTINGUER, S.I. **Obtenção e caracterização filogenética de consórcio bacteriano utilizado em reator anaeróbio em batelada aplicado à produção de hidrogênio**. 2009. 167f. Tese (Doutorado em engenharia) – Escola de Engenharia de São Carlos, Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

MAINTINGUER, S.I.; LAZARO, C.Z.; PACHIEGA, R.; VARESCHE, M.B.A.; SEQUINEL, R.; OLIVEIRA, J. E. Hydrogen bioproduction with *Enterobacter* sp. isolated from brewery wastewater. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, p. 152-160, 2017.

MANISH, S.; BANERJEE, R. Comparison of biohydrogen production processes. Direct integration of CSTR-UASB reactors for two-stage hydrogen and methane production from sugarcane syrup, v. 33, p. 279-286, 2008.

MANSSOURI, M.RODRIGUES, J. A.D.; RATUSZNEI, S. M.; ZAIAT, M. Effects of organic loading, influent concentration, and feed time on biohydrogen production in a mechanically stirred AnSBBR treating sucrose-based wastewater. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 112, n. 171, p. 1832–1854, 2013.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>, Acesso em: 3 jul.2023.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº65, de 10 de dez. de 2019. Estabelece os padrões de identidade e qualidade para os produtos de cervejaria. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-65-de-10-de-dezembro-de-2019-232666262>>. Acesso em : 22 de nov. de 2022.

MASSEY, M. L.; POHLAND, F. G. Phase separation of anaerobic stabilization by kinetic controls. **J. Water Pollut. Control. Fed.**, v.50, p.2204-2222, 1978.

MATIAS, A.P.A. **Estudo do processo produtivo de cerveja artesanal e análise de viabilidade econômica de instalação de energia elétrica fotovoltaica na cervejaria Bacuirm LTDA**. 2020. 33 f. Monografia (Graduação em engenharia química) – Departamento de Engenharia e Tecnologia, Universidade Federal Rural do Semi-árido, Mossoró, 2020.

MATOS, R. A. G. **Produção de cervejas artesanais, avaliação de aceitação e preferência, e panorama do mercado**. 2011. 78f. Trabalho de conclusão de Curso (Agronomia) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

MATUO, R., SOUSA, F.G., SOARES, D.G., BONATTO, D., SAFFI, J., ESCARGUEIL, A.E., LARSEN, A.K. e HENRIQUES, J.A.P. *Saccharomyces cerevisiae* as a model system to study the response to anticancer agents. **Cancer Chemother Pharmacol**, 2012.

METCALF e EDDY. **Wastewater Engineering: Treatment, Disposal, Reuse**. McGraw-Hill, Inc., New York, 1979.

MORADO, R. **Larousse da cerveja**. São Paulo. Larousse do Brasil, 2009.

MORADO, R. **Larousse da Cerveja**. Larousse do Brasil. 1 ed, São Paulo, 2011.

NEVES, C. F. C., SCHVARTZMAN, M. M. A. M.; J., E. Variables search technique applied to gas separation. **Química Nova**. v.25, n 2, p.327-329, 2002.

NICODEMOS, R.M.; LIMA, A.M.; ASSIS, A.M. Produção de hidrogênio a partir da fermentação de compostos orgânicos. **VII Encontro Interno. XII Seminário de Iniciação Científica**. UFU, 2008.

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

NUBEL, U., ENGELN, B., FELSK, A., SNAIDR, J., WIESHUBER, A., AMANN, R. I., LUDWIG, W., BACKHAUS, H. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. **J Bacteriol**. v. 178, p. 5636–5643, 1996.

NUALSRI, C.; KOGJSAN, P.; REUNGSANG, A. Direct integration of CSTR-UASB reactors for two-stage hydrogen and methane production from sugarcane syrup. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 9, p. 5289-5295, 2011.

OH, S. E.; VAN GINKEL, S.; LOGAN, B. E. The relative effectiveness of pH control and heat treatment for enhancing biohydrogen gas production. **Environ Sci Technol.**, v. 37, n. 22, p. 5186-5190, 2003.

OLIVEIRA, L. I. G; COSTA, W. K. A; OLIVEIRA, F.C; BEZERRIL, F. F.; EIRELI, L. P. A. M.; LIMA, M. S; NORONHA, M. F.; CABRAL, L.; WAGNER, R.; PIMENTEL, T.C.; MAGNANI, M. Ginger beer derived from back-slopping: Volatile compounds, microbial communities on activation and fermentation, metabolites and sensory characteristics. *Food Chemistry*, v. 44, p. 155-163, 2019.

PACHIEGA, R.; RODRIGUES, M. F.; RODRIGUES, C. V.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B. A.; OLIVEIRA, J. O.; MAINTINGUER, S. I. Hydrogen bioproduction with anaerobic bacteria consortium from brewery wastewater. **International Journal of Hydrogen Energy**. v. 44, p. 155-163, 2019

PALMER, John. How to Brew. **Brewers Publications**, 2022. Disponível em: <<http://howtobrew.com/book/section-1/hops/what-are-they>>, acesso em 08 de ago. 2022.

PEDROSO, M. **Curiosidades: Lei de pureza Alemã de 1516**. 2012. Disponível em: <https://www.queenscervejaria.com.br/blog/3-a+lei+de+pureza+alema+de+1516/>. Acesso em: 30 ago. 2022.

PEIXOTO, G. **Produção de hidrogênio em reator anaeróbico de leito fixo e fluxo ascendente a partir de água residuária de indústria de refrigerantes**. 2008. 107 f. Dissertação (Mestrado em engenharia) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

PENTEADO, E. D. **Influência da origem e do pré-tratamento do inoculo na produção de hidrogênio a partir de águas residuárias em biorreator**. 2012. 143 f. Dissertação

(Mestrado em engenharia hidráulica e saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

PENTEADO, E. D.; LAZARO, C. Z.; SAKAMOTO, I. K.; ZAIAT, M. Influence of seed sludge and pretreatment method on hydrogen production in packed-bed anaerobic reactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, p. 6137-45, 2013.

PERNA, V.; CASTELLO, E.; WENZEL, J.; ZAMPOL, C.; FONTES LIMA, D.M.; BORZACCONI, L. et al. Hidrogeno production in an upflow anaerobic packed bed reactor used to treat cheese whey. **International Journal of Hydrogen Energy**. n. 38, p. 54-62, 2013.

PINHO, J. L. S.; FERREIRA, R.; VIEIRA, L.; SCHWANENBERG, D. Comparison between two hydrodynamic models for flooding simulations at river Lima basin. **Water Resource Management**, v. 29, n. 2, p. 431-444, 2014

PINTO, L. I. F. Desenvolvimento de cerveja artesanal com acerola (*Malpighia emarginata* DC) e abacaxi (*Ananas comosus* L. Merrill). **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Paraíba, v.10, n.4, p.67 – 71, 2015.

REBELLO, F. DE F. P. Produção de cerveja. **Revista agrogeoambiental**, p. 145 – 155, 2009.

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.

REMACHANDRAN, R.; MENON, R. K. An overview of industrial uses of hydrogen. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.23, p. 593-598, 1998

RIBAS, M.M.F. **Tratamento de vinhaça em reator anaeróbio operado em batelada seqüencial contendo biomassa imobilizada sob condições termofilicas e mesofilicas**. 2006. 175 f. Tese (Doutorado em engenharia civil)– Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. 2006.

RODRIGUES, M. R.; NEUMANN, M. G. Fotopolimerização: Princípios e Métodos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. v.13, n.4, p.276-286, 2003.

ROJAS, M.D.P.A. **Influência da relação C/N na produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo**. 2010. 67 f. Dissertação (Mestrado em ciências) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

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

ROSA, N. A.; AFONSO, J. C. **A Química da Cerveja**. Química nova esc. – São Paulo-SP, BR. Vol. 37, N° 2, p. 98-105, 2015.

ROJAS, M.D.P.A. **Influência da relação C/N na produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo**. 2010. 67 f. Dissertação (Mestrado em ciências) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

SÁ, L. R. V.; CAMMAROTA, M. C.; LEITÃO, V. S. F. Produção de hidrogênio via fermentação anaeróbia – aspectos gerais e possibilidades de utilização de resíduos agroindustriais brasileiros. **Química Nova**, vol. 37 n. 5 São Paulo, 2014.

SANCHEZ, E.; BOYA, R.; WEILAND, P.; TRAVIESO, L.; MARTIN, A. Effect of substrate concentration and temperature on the anaerobic digestion of piggery waste in a tropical climate. **Process Biochemistry**, v.37, p. 483-489, 2001.

SANTOS, S. C. **Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidificado termofílico com vinhaça como substrato orgânico**. 2014. 163 f. Tese (Doutorado em engenharia hidráulica e saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

SCHWAAB, M. M.; PINTO, J. C. **Análise de Dados Experimentais I: Fundamentos da Estatística e Estimação de Parâmetros**. Rio de Janeiro: e-papers, 462 f., 2007.

SHAO, X.; PENG, D.; TENG, Z.; JU, X. Treatment of brewery wastewater using anaerobic sequencing batch reactor (ASBR). **Bioresour Technol.** v. **99**, p. 3182-3186, 2008.

SHI, X.Y.; JIN, D. W.; SUN, Q. Y.; LI, W. W. Optimization of conditions for hydrogen production from brewery wastewater by anaerobic sludge using desirability function approach. **Renewable Energy**. n. 35, ed. 7. P. 1493-1498, 2010.

SINDSERV- Sindicato Nacional da Indústria de Cerveja. Disponível em: <https://www.sindicerv.com.br/>, Acesso em : 15 Mai 2022.

SILES, J. A.; BREKELMANS, M. A.; MARTÍN, M.A., CHICA, A. F.; MARTÍN, A. Impact of ammonia and sulphate concentration on thermophilic anaerobic digestion. **Bioresour Technol.** v. 101, p. 9040-9048. 2010.

SILVA, P.H.A.; FARIA, F.C. Avaliação da intensidade de amargor e do seu princípio ativo em cervejas de diferentes características e marcas comerciais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, n. 28, p. 902-906, 2008.

SIMATE, G. S. et al. The treatment of brewery waste water for reuse: State of the art. **Desalination**, v. 273, p. 235–247, 2011.

SOARES, N. **Tempo de mudança**. Engarrafador Moderno, São Caetano do Sul, n. 205, p. 14-22, 2011.

SOUZA, F. M.; VIANA, E.; JAEGER, J. M. S.; CANDIANI, G.; SIMÕES, A. F.; FONSECA FILHO, H. Influência do inóculo na co-digestão anaeróbia de resíduos alimentares e grama. **Revista Ibero Americana de Ciências Ambientais**, v.11, n.1, p.146-156, 2020.

SUN, L.; HUANG, A.; GU, W.; MA, Y.; ZHU, D.; WANG, G. Hydrogen production by *Enterobacter cloacae* isolated from sugar refinery sludge. **Int J Hydrogen Energy**, v. 40, p. 1402-1407, 2015.

STRONG, G., & ENGLAND, K. Beer Judge Certification Program: 2015 style guidelines, 2015.

TELLES, S.L.N.; **Produção de hidrogênio a partir da vinhaça de cana-de-açúcar em reator anaeróbio em batelada**. Dissertação (Mestrado em Energia da Biomassa) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo. 88f., 2015.

TELLES, N. L. S.; FILHO, E. N. S.; AMORIM, E. L. C. Produção de hidrogênio a partir da vinhaça da cana-de-açúcar em reatores anaeróbios operados em batelada. v. 66, n. 211, p. 74-88, 2018.

VARDARSHARA, G.; MAEDA, T.; WOOD, T. K. Metabolically engineered bacteria for producing hydrogen via fermentation. **Microbial Biotechnology**, v.1, p. 107-125, 2008.

VAN GINKEL, S.; SUNG, S.; LAY, J. J. Biohydrogen production a function of pH and substrate concentration. **Environ Sci. Technol**, V.35, p. 4726-4730, 2001.

VENTURINI FILHO, W. G. **Bebidas não alcoólicas: Ciências e tecnologia**. São Paulo, Blucher, 2010, v. 2, p.387.

VERONEZE, M.L.; **Avaliação da produção de biogás a partir de água residuária de cervejaria**. 2019. 75 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia em Energia na Agricultura), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2019.

XIAO, B.; LIU, J. Biological hydrogen production from sterilized sewage sludge by anaerobic self-fermentation. **Journal of Hazardous Materials**. v. 168, p. 163-167, 2009

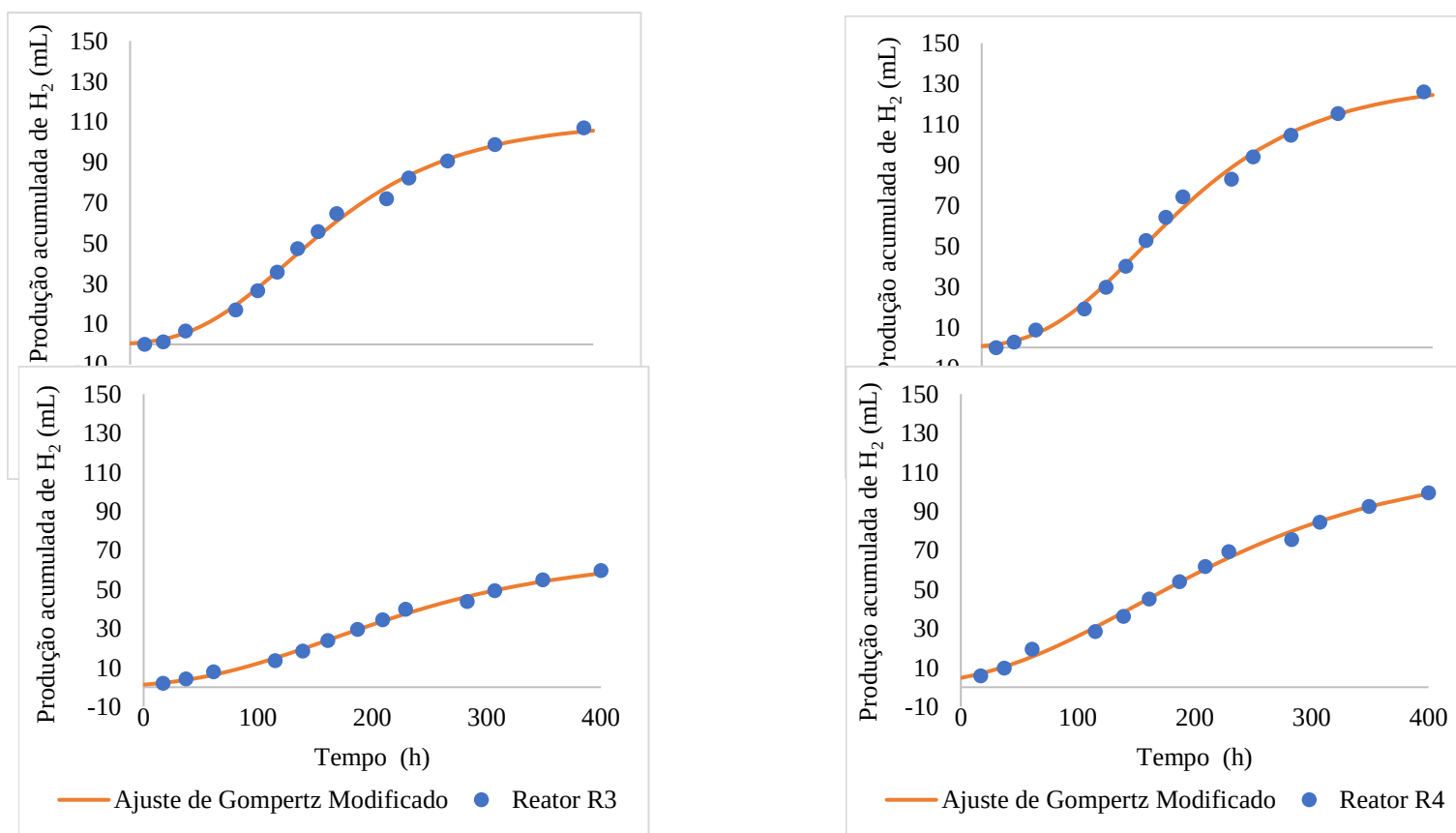
WANG, J; WAN, W. Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.34, ed. 2, p. 799-811, 2009

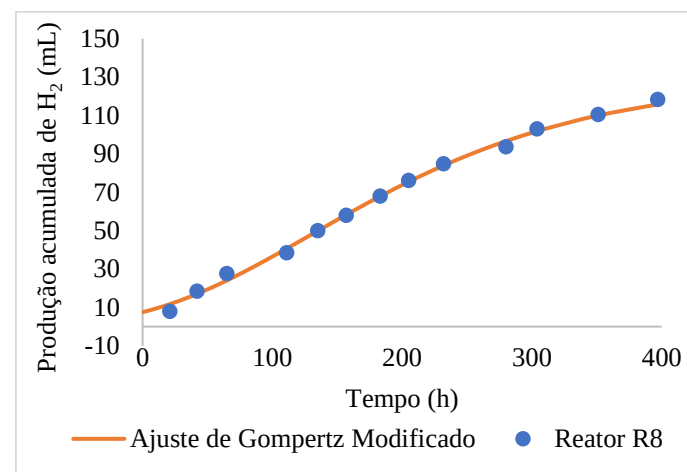
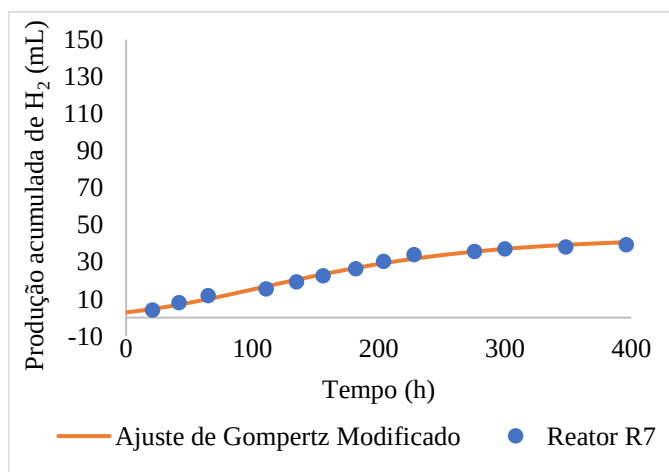
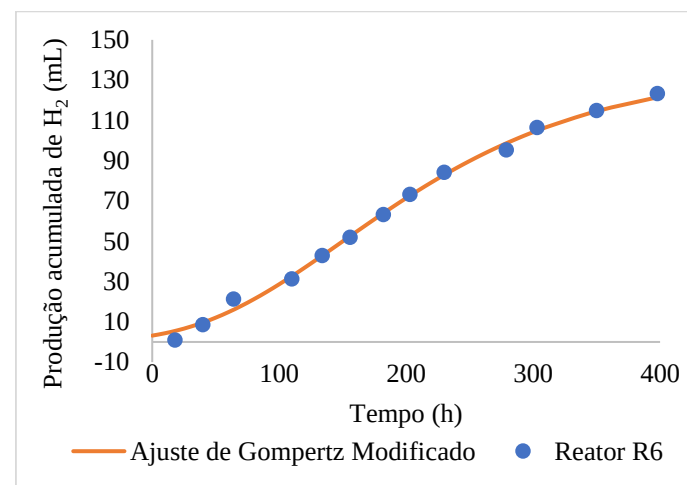
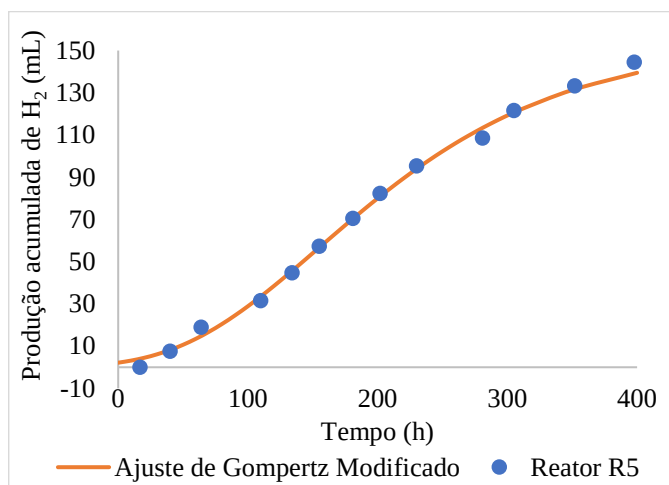
WEBER, M. I. **Avaliação da eficiência de um reator anaeróbio de leito fluidizado para o tratamento de resíduos líquidos da indústria de refrigerante**. 2006. 166 f. Dissertação (Mestrado em engenharia de recursos hídricos e ambiental) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

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

APÊNDICE I – DADOS DA PRODUÇÃO ACUMULADA DE H_2 AO LONGO DO TEMPO PARA OS REATORES

Figura 25: Produção temporal acumulada de hidrogênio por reator, ajustado ao modelo de Gompertz Modificado.





Fonte: Autora (2023).