

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

EMMANUELLE DE SOUZA BALBINO

Produção de Hidrogênio a partir do Hidrolisado da Palha da Soja

Maceió

2020

EMMANUELLE DE SOUZA BALBINO

Produção de Hidrogênio a partir do Hidrolisado da Palha da Soja

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

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Lucena
Cavalcante de Amorim

Maceió
2020

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

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale – CRB4 - 661

- B172p Balbino, Emmanuelle de Souza.
 Produção de hidrogênio a partir do hidrolisado da palha da soja / Emmanuelle de Balbino. – 2020.
 52 f. : il., tabs., grafs.
- Orientador: Eduardo Lucena Cavalcante de Amorim.
 Dissertação (mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Tecnologia. Maceió, 2020.
- Bibliografia: f. 43-47.
 Apêndices: f. 48-52.
1. Batelada - Hidrogênio – Produção. 2. Digestão anaeróbica. 3. Soja.
 4. Ácido – Pré - tratamento. I. Título.

CDU: 62-622

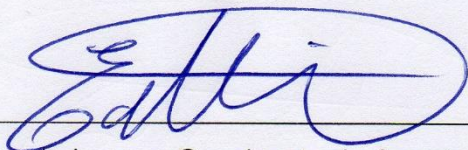
Emmanuelle de Souza Balbino

**Produção de hidrogênio a partir do hidrolisado da palha da
soja**

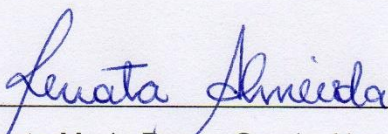
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Alagoas, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Engenharia Química.

Aprovada em: Maceió, 28 de Fevereiro de 2020.

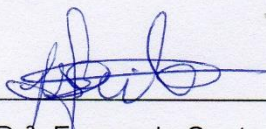
BANCA EXAMINADORA



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



Profª. Drª. Renata Maria Rosas Garcia Almeida (PPGEQ/UFAL)



Profª. Drª. Fernanda Santana Peiter (UNINASSAU)

AGRADECIMENTOS

A Deus, Jesus e ao Espírito Santo, por serem meu consolo, minha esperança, meu dia-a-dia, minha verdade, minha vida. Eu não chegaria a lugar algum sozinha!

Aos meus pais, Olivier e Marli, que fizeram de tudo para garantir meus estudos mesmo nas adversidades, pelo amor e cuidados a mim dedicados.

A Gabryel Lima, por compartilhar comigo os momentos bons e desagradáveis da pós-graduação e da vida, pela contribuição em todas as etapas deste trabalho e por fazer dos meus dias mais leves e felizes.

Aos meus amigos do IFAL, Luana, Pedro, Soraya, Késia, Gustavo e Bruno, eu vou sempre levar vocês no meu coração.

Ao meu orientador o Prof. Eduardo Lucena, pelos ensinamentos e encorajamento, por contribuir com a minha formação além da pós-graduação. Ao senhor toda minha admiração e gratidão!

A Ingrid, por sua colaboração neste projeto, e aos demais membros do LCA, desejo a todos muitos sucessos, contem comigo!

A não menos importante, Prof. Daniele Vital Vich, pela, amizade, sinceridade, empatia, ensinamentos e soluções eficazes. Os momentos com a senhora no laboratório passaram mais rápido e foram mais felizes.

A CAPES pelo auxílio financeiro a esta pesquisa.

Aos muitos que fazem parte da minha vida, conhecem minha história, que desejam meu sucesso, que oram por mim. Sou grata a Deus por todas essas pessoas boas que conheci, que gostam de mim gratuitamente, ter conquistado o carinho de vocês foi uma honra para mim!

Muito obrigada a todos, que Deus os abençoe!

RESUMO

Visando o desenvolvimento sustentável, diante da consciência de que o planeta terra possui recursos finitos e dos danos causados pela poluição, busca-se por fontes alternativas de energia que possam competir e/ou substituir a utilização de combustíveis fósseis. O hidrogênio é uma opção, pois sua obtenção por fermentação a partir de biomassa o caracteriza como energia de fonte renovável. Para produção de hidrogênio por fermentação utilizou-se como substrato o hidrolisado de resíduos da cultura da soja (*Glycine max*), palha da soja, pré-tratada de forma mecânica (moagem) e química (solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4)) a temperatura ambiente ($26^{\circ}C$). Foi realizado planejamento fatorial 2^3 para avaliar o efeito da carga de sólidos (5 e 10% m/v), concentração de ácido sulfúrico (1,0 e 4,0% v/v) e tempo de contato (30 e 60 min) na etapa do pré-tratamento da biomassa na produção biológica de hidrogênio. O procedimento experimental foi realizado em reatores operados em batelada de 7 dias, mantidos a temperatura mesofílica ($35\pm 1^{\circ}C$) através da utilização de uma incubadora rotativa *shaker* a 120 rpm, inoculados com lodo de reator UASB, termicamente pré-tratado e com pH do meio inicialmente 7,70. O intervalo escolhido de tempo de contato e concentração de ácido sulfúrico diluído não foram significativos no pré-tratamento da palha da soja a temperatura ambiente, porém a concentração de sólidos sim, de forma que o aumento da quantidade de sólidos resultou numa maior quantificação de carboidratos. Já na produção biológica de hidrogênio todos os parâmetros foram significativos ($p<0,05$). Foi possível obter um rendimento máximo de hidrogênio de 89 mL de H_2/g de biomassa seca, nas condições mais brandas de pré-tratamento (1% v/v de H_2SO_4 , tempo de contato de 30 min e concentração de sólidos de 5,0% m/v).

Palavras-chaves: Batelada, digestão anaeróbia, planejamento fatorial, pré-tratamento ácido.

ABSTRACT

Aiming at sustainable development, given the awareness that the planet has finite resources and the damage caused by pollution, we seek alternative energy sources that can compete and/or replace the use of fossil fuels. Hydrogen is an option because its obtaining by fermentation from biomass characterizes it as energy from renewable sources. For hydrogen production by fermentation, the hydrolyzate of soybean (*Glycine max*) crop residues, soybean straw, mechanically (milled) and chemical (dilute sulfuric acid (H_2SO_4)) at room temperature was used as substrate. Factorial design 2^3 was performed to evaluate the effect of solids loading (5 and 10% m/v), sulfuric acid concentration (1.0 and 4.0% v/v) and contact (30 and 60 min) in the biomass pretreatment stage in the biological hydrogen production. The experimental procedure was carried out in 15-day batch reactors maintained at mesophilic temperature ($35\pm 1^\circ\text{C}$) using a 120 rpm shaker rotary incubator, inoculated with UASB reactor sludge and initially pH 7.70. The chosen contact time range and dilute sulfuric acid concentration were not significant in the soybean straw pretreatment at room temperature, but the solids concentration did, so that increasing the amount of solids resulted in a higher quantification of total carbohydrates. Already in the biological production of hydrogen all parameters were significant. It was possible to obtain hydrogen of 89 mL of H_2 /g of dry biomass, under milder pretreatment conditions (with 1% v/v diluted acid, contact time of 30 minutes and solids concentration of 5,0% w/v).

Keywords: Acid pretreatment, anaerobic digestion, batch, factorial planning.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura Celulose.	15
Figura 2 – Estrutura da Glucuronoarabinoxilana.	16
Figura 3 – Estruturas dominantes na lignina.	16
Figura 4 – Fluxograma.	26
Figura 5 – Gráfico de Pareto, efeito ($p < 0,05$) da carga de sólidos (5 e 10% m/v), concentração de ácido sulfúrico (1,0 e 4,0% v/v) e tempo de contato (30 e 60 min) na quantificação de carboidratos.	33
Figura 6 – Gráfico de Pareto, efeito ($p < 0,05$) da carga de sólidos (5 e 10% m/v), concentração de ácido sulfúrico (1,0 e 4,0% v/v) e tempo de contato (30 e 60 min) no teor de cinzas.	35
Figura 7 - Gráfico de Pareto, efeito ($p < 0,05$) da carga de sólidos (5 e 10% m/v), concentração de ácido sulfúrico (1,0 e 4,0% v/v) e tempo de contato (30 e 60 min) no rendimento de hidrogênio.	37
Figura 8 – Curvas de produção de hidrogênio acumulado.	48
Figura 9 – Ensaio 1 (ajuste de Gompertz Modificado).	48
Figura 10 – Ensaio 2 (ajuste de Gompertz Modificado).	49
Figura 11 – Ensaio 3 (ajuste de Gompertz Modificado).	49
Figura 12 – Ensaio 4 (ajuste de Gompertz Modificado).	50
Figura 13 – Ensaio 5 (ajuste de Gompertz Modificado).	50
Figura 14 – Ensaio 6 (ajuste de Gompertz Modificado).	51
Figura 15 – Ensaio 7 (ajuste de Gompertz Modificado).	51
Figura 16 – Ensaio 8 (ajuste de Gompertz Modificado).	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Métodos de pré-tratamento, efeito, vantagens e desvantagens.....	17
Tabela 2 – Rendimentos de hidrogênio a partir de resíduo de biomassa agrícola.	24
Tabela 3 – Variáveis de interesse.	28
Tabela 4 – Matriz experimental planejamento fatorial 2 ³	28
Tabela 5 – Condições ensaio da amostra sem pré-tratamento.	29
Tabela 6 – Matriz experimental (quantificação de carboidratos).....	32
Tabela 7 – Efeito e contribuição dos fatores (quantificação de carboidratos).....	32
Tabela 8 – Matriz experimental (Teor de cinzas).....	34
Tabela 9 – Efeito e contribuição dos fatores (teor de cinzas).	35
Tabela 10 – Matriz experimental (rendimento H ₂).	36
Tabela 11 – Efeito e contribuição dos fatores (rendimento de H ₂).	36
Tabela 12 – Parâmetros produção acumulada de H ₂	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EC	Eficiência de consumo de carboidratos
ETE	Estação de tratamento de esgoto
H	Produção acumulada
HY	Rendimento de hidrogênio
LCA	Laboratório de Controle Ambiental
LSA	Laboratório de Saneamento Ambiental
P	Potencial de produção de hidrogênio
pH	Potencial hidrogeniônico
R _m	Taxa de produção de hidrogênio
STF	Sólidos totais fixos
t	Tempo
UASB	Reator anaeróbio de fluxo ascendente de manta de lodo
UFAL	Universidade Federal de Alagoas
λ	Fase lag

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	13
2.1	Objetivo Geral	13
2.2	Objetivos Específicos.....	13
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1	Biomassa Lignocelulósica.....	14
3.1.1	Palha da Soja	14
3.1.2	Composição Biomassa Lignocelulósica	15
3.1.3	Pré-tratamento Biomassa Lignocelulósica	17
3.2	Produção De Hidrogênio Por Fermentação	20
3.2.1	Fatores que influenciam a Produção de hidrogênio.....	21
3.2.2	Produção de Hidrogênio a partir da fermentação de resíduos agrícolas.....	23
4	METODOLOGIA.....	26
4.1	Preparo da Biomassa.....	27
4.2	Pré-tratamento do Inóculo.....	27
4.3	PLANEJAMENTO FATORIAL 2³	27
4.4	Ensaio sem Pré-tratamento Químico	28
4.5	Processo Fermentativo	29
4.6	Análises Físico-químicas e Método Analítico	29
4.6.1	Análises físico-químicas.....	30
4.6.2	Cromatografia Gasosa	30
4.7	Hidrogênio Produzido	30
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	32
5.1	Efeito do Pré-tratamento na Quantificação de Carboidratos Totais	32
5.2	Efeito do Pré-tratamento no Teor De Cinzas.....	34
5.3	Efeito do Pré-tratamento no Rendimento de Hidrogênio	36

5.4	Ajuste dos Dados Experimentais.....	38
6	CONCLUSÃO.....	41
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	42
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
	APÊNDICE A	48

1 INTRODUÇÃO

Diante da consciência dos danos causados pela poluição, busca-se por fontes renováveis de energia que possam mitigar ou diminuir os impactos ambientais causado pela queima de combustíveis, que contribuem com a diminuição da camada de ozônio, intensificado o efeito estufa. O gás hidrogênio produzido por processo fermentativo tem sido estudado como uma fonte alternativa de energia, pois a sua queima tem como subproduto apenas água, e pode ser aplicado diretamente em motores a combustão ou, após purificação, em células a combustível para gerar eletricidade (ŁUKAJTIS *et al.*, 2018).

A fermentação para produção do gás hidrogênio possui as vantagens de ter baixo custo de equipamentos, ser de fácil operação e a obtenção de subprodutos de interesse como ácidos voláteis e álcoois. Como substrato do processo, podem ser usados resíduos agroindustriais, valorizando os aspectos ambientalmente positivos do processo (ACAR & DINCE, 2019).

Para alcançar um bom rendimento de hidrogênio no processo fermentativo, os resíduos necessitam conter um alto teor de carboidratos, como é caso das palhas de cereais, como soja, arroz, trigo, cevada, sorgo, cana-de-açúcar etc. A biomassa ainda apresenta vantagens como disponibilidade durante todo o ano, não compete com a produção de alimentos, baixo preço e abundância (GHOSH *et al.*, 2017; BALAT & KIRTAY, 2010).

No Brasil a soja (*Glycine max*) é a principal cultura agrícola, consumida na alimentação humana, e de forma menos expressiva como matéria-prima na produção de biodiesel. É o produto mais exportado desde que o país passou a registrar e divulgar os dados de vendas ao exterior, com uma produção que alcançou os 242,1 milhões de toneladas na safra de 2018/2019 (BUNDHOO, 2019; CONAB, 2019; MARTELLI-TOSI *et al.*, 2017).

Para cada tonelada de soja produzida, estima-se que sejam gerados cerca de uma tonelada de resíduo, conhecido como palha da soja, composto por caules, hastes e folhas. Na literatura foi reportado o uso da biomassa na produção de biocombustíveis como metano (XIONG *et al.*, 2020), hidrogênio (HAN *et al.*, 2012) e etanol (FILBIDA, 2017), na sacarificação e hidrólise enzimática (CABRERA *et al.*, 2015), e como ração animal (RESTLE *et al.*, 2000; REHFELD & BLASCZYK, 1972).

Os monômeros de glicose presentes na celulose, e as pentoses (xilose, arabinose), hexoses (manose, glicose, galactose) e ácidos urônicos encontrados na hemicelulose são os componentes de interesse na produção de biocombustíveis através de vias biológicas, porém a densidade polimérica da biomassa lignocelulósica a torna um substrato de difícil degradação. A celulose possui uma forte cristalinidade onde suas microfibrilas são interligadas a

hemicelulose, envoltas por lignina, o que aumenta a hidrofobicidade da parede, impedindo a ação de enzimas hidrolíticas. Assim, faz-se necessário na fermentação etapas de pré-tratamento da biomassa elevando o custo do processo (SALAKKAM *et al.*, 2019).

O pré-tratamento da biomassa é a etapa anterior a fermentação, que objetiva quebrar o escudo de lignina e romper a estrutura cristalina da celulose, tornando a biomassa pré-tratada acessível ao ataque enzimático e aumentando a disponibilidade de açúcares solúveis no meio. Os métodos de pré-tratamento são classificados como: físico (mecânico), químico, físico-químico, biológico e a combinação dos processos (REN *et al.*, 2009).

O pré-tratamento com ácido diluído é um processo simples, com tempo reduzido, e possui alta reatividade com a celulose, o que pode proporcionar altas taxas de obtenção de açúcares. Assim, este processo é amplamente abordado na literatura (SILVA & BERTUCCO, 2018; THUNGKLIN *et al.*, 2018; HAN *et al.*, 2012; CUI & SHEN, 2012; CHANG *et al.*, 2011).

Este trabalho avaliou a produção de hidrogênio por fermentação em reatores batelada usando como inóculo lodo de biorreator UASB, e utilizando como substrato o hidrolisado da palha da soja, originário da biomassa lignocelulósica previamente pré-tratada de forma mecânica (moagem) e química (ácido sulfúrico diluído de 1,0 a 4,0% v/v) a temperatura e pressão ambiente (26°C e 1 atm).

A escolha do pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído (1,0 a 4,0% v/v) em condições brandas de processo (temperatura e pressão ambiente), neste trabalho, visa favorecer a formação de açúcares solúveis, evitar a degradação dos açúcares por condições severas, limitar a produção de inibidores, que afetem o rendimento da fermentação, reduzir o custo energético e o custo da produção do hidrogênio.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve por objetivo avaliar a produção de hidrogênio em reator batelada por fermentação anaeróbia utilizando como substrato o hidrolisado de palha da soja.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito das condições do pré-tratamento químico (tempo de contato, concentração de ácido sulfúrico e carga de sólidos) na quantificação de carboidratos totais;
- Avaliar a influência das condições do pré-tratamento químico no teor de cinzas;
- Avaliar o efeito das condições do pré-tratamento químico no rendimento de hidrogênio;
- Avaliar o ajuste dos dados experimentais.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Biomassa Lignocelulósica

Biomassa lignocelulósica é aquela no qual sua estrutura é composta basicamente dos polímeros vegetais celulose, hemicelulose e lignina, com subdivisão em biomassa lenhosa, não lenhosa (resíduos agrícolas e gramíneas) e fibras não lenhosas (algodão). A biomassa lignocelulósica é o recurso mais abundante da terra, sendo uma importante fonte de energia renovável, pois o dióxido de carbono (CO₂) gerado a partir de biocombustíveis é consumido pelas plantas em seu sofisticado processo de fotossíntese (NAGARAJAN *et al.*, 2019; SALAKKAM *et al.*, 2019).

Os biocombustíveis, entre eles o gás hidrogênio, produzidos a partir da biomassa lignocelulósica, são denominados de segunda geração, que em contraste aos biocombustíveis de primeira geração, obtidos a partir da conversão direta de culturas como cana-de-açúcar, milho e beterraba, não disputam matéria-prima com a produção de alimentos, nem áreas plantadas, além de serem abundantes em todas as regiões do planeta (KUMARI & SINGH, 2018).

A biomassa lignocelulósica agrícola compreende basicamente palhas de cereais (folhas, caules e vagens), gramíneas perenes e resíduos de frutas e vegetais. A composição percentual de celulose, hemicelulose, lignina e outros (proteína e cinzas), na biomassa agrícola, estão nas faixas 35-50%, 20-35%, 15-20% e 15-20%, respectivamente (MOOD *et al.*, 2013).

3.1.1 Palha da Soja

A soja (*Glycine max*) é um grão originário do Japão e China, pertencente à família Fabaceae, a mesma do feijão, lentilha e ervilha. A soja está presente na alimentação humana como óleo, grão, molho (molho shoyu), proteína e leite da soja, sendo rica em proteínas e sais minerais (SILVA, 2006).

Mundialmente são produzidos cerca de 362 milhões de toneladas de soja, sendo os Estados Unidos da América o maior produtor do grão, seguido pelo Brasil. Estima-se que para cada tonelada de soja produzida, sejam gerados no processo da colheita uma tonelada de resíduo, composto por caules, hastes e folhas, popularmente conhecido como palha da soja. O descarte do resíduo é feito no aterro sanitário ou incinerado (BUNDHOO, 2019; EMBRAPA, 2019; MARTELLI-TOSI *et al.*, 2017).

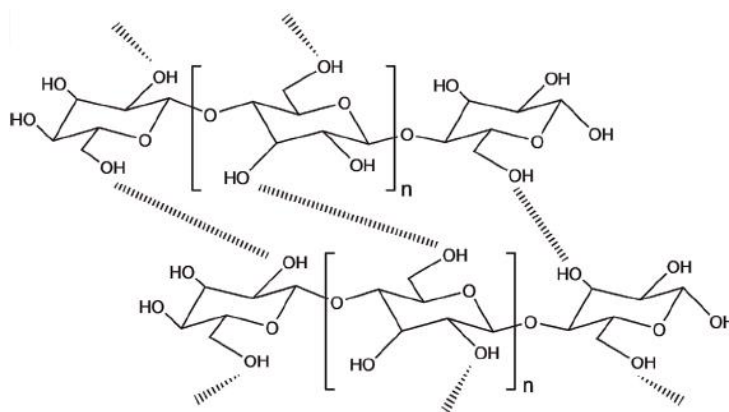
A composição da palha da soja pode variar de acordo com de fatores genéticos (tipo de cultivar) e ambientais (localização geográfica e época de semeadura). Em geral, a palha da soja apresenta cerca de 35% de celulose, 21% de lignina insolúvel, 17% de hemiceluloses, 11% de cinza, 1% de lignina solúvel em ácido e componentes remanescentes como proteína, pectina e ácido glucurônico (MARTELLI-TOSI *et al.*, 2017; GHOSH *et al.*, 2017; CABRERA *et al.*, 2015).

3.1.2 Composição Biomassa Lignocelulósica

3.1.2.1 Celulose

A celulose é um homopolímero contendo como único monômero a glicose, conectadas por ligações β -(1,4)-glicosídicas, cujo grau de polimerização varia dependendo de sua fonte (entre 10000 a 15000). Forma microfibrilas com cadeias unidas por ligações de hidrogênio entre as hidroxilas. A organização de suas macromoléculas não é uniforme ao longo de toda sua estrutura, possuindo regiões amorfas e regiões cristalinas, que são altamente organizadas. A unidade básica de repetição do polímero de celulose consiste em duas unidades de anidrido de glicose, chamadas de unidade de celobiose. É o polímero vegetal mais abundante na terra, a Figura 1 ilustra a estrutura da celulose (NAGARAJAN *et al.*, 2019; SALAKKAM *et al.*, 2019; BALAT & KIRTAY, 2010; GURGEL, 2010).

Figura 1 – Estrutura Celulose.



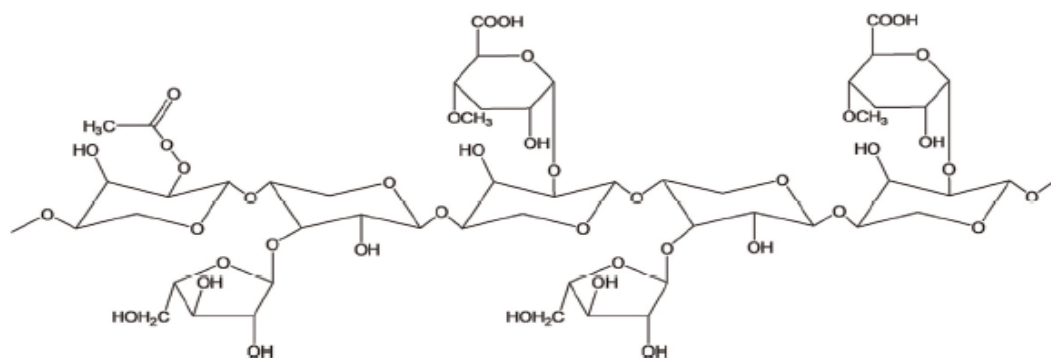
Fonte: SALAKKAM *et al.*, 2019.

3.1.2.2 Hemicelulose

Tem estrutura linear ramificada que pode conter unidades repetidas do mesmo açúcar (homopolímero) ou mistura de diferentes açúcares (heteropolímero), entre estes, pentoses (xilose, arabinose), hexoses (manose, glicose e galactoses) e alguns ácidos orgânicos como

ácido acético e ácidos urônicos (ácido 4-O-metilglucurônico, ácido galacturônico). São classificadas conforme suas ligações em xilanas (unidades de β -1,4-D-xilose ligadas), mananas (unidades de β -1,4-D-manose ligadas), arabinanas (unidades de α -1,5-L-arabinose ligadas), e galactanas (unidades de β -1,3-D-galactose ligadas). Em gramíneas e palhas de cereais, a principal hemicelulose é glucuronoarabinoxilana (Figura 2), sendo o suporte principal de xiloses (SALAKKAM *et al.*, 2019; GURGEL, 2011; KUMARI & SINGH, 2018; GURGEL, 2011; GÍRIO, 2010).

Figura 2 – Estrutura da Glucuronoarabinoxilana.

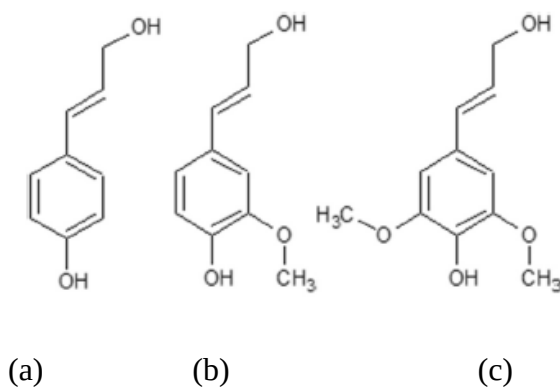


Fonte: SALAKKAM *et al.*, 2019.

3.1.2.3 Lignina

A lignina é o principal componente da biomassa lignocelulósica, sua estrutura amorfa não possui açúcares, mas unidades de fenilpropânicas ligadas a uma complexa estrutura tridimensional. Os três álcoois fenilpropânicos encontrados comumente como monômeros de lignina são o p -coumaril, coniferil e sinapil (Figura 3). A lignina confere estrutura e rigidez as plantas, envolvendo a celulose e a hemicelulose, é hidrofóbica, uma barreira físico-química das plantas a ataques microbianos (KUMARI & SINGH, 2018).

Figura 3 – Estruturas dominantes na lignina.



(a) p -coumaril, (b) coniferil, (c) sinapil.

Fonte: KUMARI & SINGH, 2018.

3.1.3 Pré-tratamento Biomassa Lignocelulósica

A etapa do pré-tratamento objetiva basicamente quebrar o escudo de lignina, composto de difícil degradação, romper a estrutura cristalina da celulose, preservar a hemicelulose e aumentar a porosidade da biomassa, tornando-a mais acessível ao ataque enzimático, possibilitando a conversão do substrato em açúcares solúveis, que poderão ser usados pelos microrganismos de forma direta para produção de hidrogênio, além de reduzir o tempo de hidrólise (CUI & SHEN, 2012; MOSIER *et al.*, 2005).

Os métodos de pré-tratamento da biomassa envolvem processos físicos (moagem, explosão a vapor, irradiação, exposição a altas pressões e temperaturas), processos químicos (ácido, alcalino e oxidativos), ou a combinação de ambos os processos. Os processos físicos têm como desvantagem em geral o alto custo com energia. Os químicos a corrosão de equipamentos, os custos com reagentes e a possível formação de inibidores ao processo fermentativo (GHOSH *et al.*, 2017).

A Tabela 1 reúne os métodos de pré-tratamento, seu efeito na biomassa e as principais vantagens e desvantagens.

Tabela 1 – Métodos de pré-tratamento, efeito, vantagens e desvantagens.

Método de Pré-tratamento	Efeito	Vantagens	Desvantagens
<i>Físico</i>			
Lascar, Triturar.	Reduzir a cristalinidade e o tamanho da partícula	Homogeneização do tamanho final da partícula	Alto consumo de energia.
Micro-ondas	Fragmentação da lignina	Rápida transferência de calor, curto tempo reacional	Baixa penetração da radiação em materiais com partículas grandes; Distribuição da radiação apenas superficial.
<i>Químico</i>			
Ácido	Fracionamento da lignina, celulose e hemicelulose.	Hidrólise da biomassa a açúcares fermentáveis.	Corrosividade e toxicidade. Formação de subprodutos inibidores ao processo.
Alcalino	Remoção da lignina e hemicelulose.	Reduz a absorção de celulose devido a eficiente remoção de lignina, baixo custo.	Longos tempos de residência. Formação de subprodutos inibidores
Iônico	Precipitação da celulose e remoção da lignina.	Condições de trabalho brandas.	Elevado custo, complexa purificação e síntese.

Continua

Continuação

<i>Químico</i>			
Solventes	Fracionamento da hemicelulose e remoção da lignina.	Formação de lignina de alta pureza.	Necessita de etapas de separação do solvente e lavagens. Alto custo de capital.
<i>Físico-químico</i>			
Explosão a vapor	Redução do tamanho de partícula, hidrólise parcial da hemicelulose, remoção de lignina	Menos uso de água, sem uso de produtos químicos, baixo impacto ambiental.	Alto custo com equipamentos.
Água quente	Hidrólise parcial da hemicelulose, remoção de lignina.	Não requer etapas de lavagem, recuperação química ou desintoxicação	Elevado consumo de energia e água.
<i>Biológico</i>			
Microrganismos e enzimas	Degradação da lignina, celulose e hemicelulose.	Degradação seletiva de lignina, hemicelulose e celulose. Ambientalmente amigável.	Baixa taxa de hidrólise e longo tempo de pré-tratamento.

Fonte: Adaptado de SALAKKAM *et al.*, 2019.

Atualmente, a hidrólise com ácido diluído vem sendo amplamente abordada na literatura. Segundo Silva e Bertucco (2018), isto se deve devido à simplicidade do pré-tratamento em tempo reduzido, e à alta reatividade com a celulose que pode proporcionar altas taxas de obtenção de açúcares.

Ácidos minerais como os ácidos sulfúrico e clorídrico são os mais empregados no pré-tratamento ácido, porém ácidos orgânicos também podem ser usados. O ácido sulfúrico é o mais usual por ser economicamente mais acessível e menos corrosivo do que outros ácidos, como ácido clorídrico, nítrico e perclórico (JONSSON & MARTIN, 2016).

Um maior interesse na utilização de soluções diluídas reside também no benefício econômico proporcionado por este processo, já que o baixo consumo de ácido diminui os custos com matéria-prima e equipamentos, devido à menor corrosividade destes (GURGEL, 2010).

A literatura reporta que o aumento da concentração do ácido diluído pode ser favorável para aumentar o rendimento de açúcares no meio após o pré-tratamento. Cabrera *et al.* (2015), que estudaram o efeito do pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído (1, 2 e 4% m/m) e do tempo de contato (30 e 60 min), a temperatura de 121°C, na quantificação de

açúcares da palha de soja, observaram que a elevação de ambos os parâmetros resulta numa maior quantificação de açúcares.

Em contrapartida, há autores que relatam, que com aumento da concentração de ácido no meio ocorre a degradação dos açúcares obtidos em compostos inibitórios aos processos fermentativos, como em 5-hidroximetil furfural (HMF) e furfural, e a formação de outros inibidores como ácidos orgânicos e compostos fenólicos, que causam efeito inibitório ao metabolismo dos microrganismos na etapa da fermentação (SOARES *et al.*, 2018; ALVIRA *et al.*, 2010; GURGEL, 2010; PALMQVIST & HAHN-HAGERDAL, 2000).

O estudo realizado por Ge *et al.* (2011) avaliou o pré-tratamento, com ácido sulfúrico diluído (0; 0,1; 0,2; 0,5 e 1,0% v/v) a 121°C, na sacarificação de resíduos da alga *Laminaria japonica*, e também constatou a eficiência do método, obtendo 225 mg/g alga seca no reator sem pré-tratamento e 277,5 mg/g alga seca no reator com melhor resultado que foi o de 0,1% v/v, e para todas as outras concentrações a quantificação de glicose foi inferior.

Pattra *et al.* (2008) estudaram a produção de hidrogênio utilizando como substrato o hidrolisado do bagaço da cana-de-açúcar. O pré-tratamento para obtenção do hidrolisado foi realizado em autoclave a 121°C, variando o tempo de contato da biomassa (15 a 240 min) e a concentração de ácido sulfúrico no meio (0,25 a 7% v/v). Os resultados mostraram que o aumento da concentração de H₂SO₄ reduziu o rendimento de açúcares no meio e aumentou a concentração de furfural. Ambos os resultados de forma significativa ($p < 0,05$).

Akanksha *et al.* (2014) estudaram a sacarificação do sorgo variando a carga de sólidos (10 – 15% m/m), a concentração de ácido sulfúrico (0,5 – 4% (v/v)), tempo de residência (15 – 60 min) e temperatura do pré-tratamento (120 – 200 °C). Os autores constataram que a partir da concentração de 1% de H₂SO₄ o rendimento de açúcares decaía, e relacionaram este resultado à possível formação de inibidores.

O pré-tratamento aumenta o rendimento de H₂. Han *et al.* (2012) avaliaram a produção biológica de hidrogênio a partir da palha da soja estudando o efeito do pré-tratamento ácido (HCl), alcalino (NaOH), peróxido de hidrogênio, peróxido ácido e peróxido alcalino na biomassa. O pré-tratamento com ácido diluído (0,5, 1,0, 2,0, 4,0 e 8,0% v/v de HCl), foi realizado sob fervura, com 30 min de tempo de contato. Foi realizada a fermentação com hidrolisado do pré-tratamento nas condições de 35°C, 120 rpm de agitação, e pH inicial 7,00, com lodo anaeróbio. O melhor rendimento de hidrogênio se deu com pré-tratamento ácido (HCl 4% v/v, fervido por 30 min) de 47,65 mL de H₂/g de biomassa seca, e este resultado foi 11 vezes melhor do que rendimento de hidrogênio apresentado pelo reator que não passou pelo pré-tratamento.

Cui e Shen (2012) estudaram a produção de hidrogênio a partir da grama por fermentação escura a 35°C, 120 rpm de agitação, pH inicial 7,00, carga de sólido de 5% m/v, com lodo anaeróbio. Os autores avaliaram os efeitos do pré-tratamento ácido (HCl) e alcalino (NaOH) nas seguintes concentrações para ambos 0,5%, 1%, 2%, 4% e 8% (m/v). O melhor rendimento de hidrogênio foi com pré-tratamento ácido (HCl 4% v/v, fervido por 30 min) de 72,21 mL de H₂/g de biomassa seca, e este resultado foi 16,45 vezes melhor do que rendimento de hidrogênio apresentado pelo reator que não passou pelo pré-tratamento.

3.2 Produção De Hidrogênio Por Fermentação

O gás hidrogênio é uma fonte alternativa de energia limpa, que em sua queima libera apenas energia e água, possui elevado poder calorífico de 120 kJ/g, maior que a metano (50 kJ/g), gasolina (46,70 kJ/g) e etanol (26,80 kJ/g), sendo assim uma alternativa interessante do ponto de vista ambiental e energético em substituição ao uso de combustíveis fósseis (ZHANG & HOU, 2019; ŁUKAJTIS *et al.*, 2018; ZAJIC *et al.*, 1978).

Ainda que a queima de gás hidrogênio não contribua com a poluição, sua difundida forma de obtenção está relacionada a fontes de energias não renováveis. A maior parte da produção de hidrogênio, cerca de 50%, é obtido a partir de processos catalíticos e de gaseificação utilizando gás natural, depois tem-se óleos pesados e nafta compondo a próxima maior fonte de obtenção, seguido pelo carvão, e apenas 4% gerado a partir da eletricidade e 1% a partir da biomassa (BALAT & KIRTAY, 2010).

As tecnologias para obtenção de hidrogênio a partir de combustíveis fósseis são industrialmente exploradas e consolidadas. Assim, além de viável economicamente é interessante que o processo de produção de hidrogênio em si possua apelos ambientais que envolvam recursos renováveis. A produção de hidrogênio por rotas biológicas possui potencial como fonte inesgotável, de baixo custo e renovável de energia limpa (ACAR & DINCE, 2019; REN *et al.*, 2009).

Os processos de produção de bio-hidrogênio envolvem a biofotólise da água usando algas e cianobactérias, e decomposição de compostos orgânicos por bactérias fotossintéticas (foto-decomposição) e fermentação escura (digestão anaeróbia). A fermentação escura tem como vantagens o baixo custo do processo aliado à facilidade de operação (REN *et al.*, 2009).

Na fermentação bactérias hidrolíticas, sob condições anóxicas e sem a presença de luz, produzem enzimas extracelulares, biocatalisadores altamente específicos, que são responsáveis pela degradação dos materiais particulados complexos em materiais dissolvidos mais simples, os quais são permeáveis às membranas celulares das bactérias fermentativas.

Estes componentes serão metabolizados por outros grupos de microrganismos que serão convertidos em compostos como ácidos orgânicos voláteis, álcoois, CO₂, H₂, além de novas células bacterianas (JANG, UCHIDA & WAKISAKA, 2012).

3.2.1 Fatores que influenciam a Produção de hidrogênio

A adaptação da fermentação anaeróbia às condições industriais envolve a otimização de parâmetros que interferem no rendimento da produção de hidrogênio. Tipos de microrganismos utilizados (culturas bacterianas puras ou mistas), método de preparação de inóculo e condições do processo que controlam metabolismo dos microrganismos são os principais fatores estudados em experimentos em batelada (KUMAR *et al.*, 2015).

3.2.1.1 Inóculo

São usados como inóculo na digestão anaeróbia culturas puras, bactérias selecionadas que são produtoras de hidrogênio, e mistas, provenientes de fontes naturais. As principais culturas puras utilizadas no processo incluem bactérias anaeróbias estritas (*Clostridium sp.*) e anaeróbias facultativas (*Enterobacter*, *Escherichia coli*, *Rhodopseudomonas*, *Citrobacter Thermoanaerobacterium*). A depender das condições do processo, a produção de hidrogênio a partir de culturas isoladas, é capaz de alcançar bons rendimentos (2 a 4 moles de H₂/mol de glicose consumida), mas a necessidade de condições estéreis no início da operação, para evitar o risco de contaminação, encarece o custo do processo (SOARES *et al.*, 2020).

Em escala industrial, o processo com culturas mistas é preferível por não necessitar de controle e operação em condições assépticas. As culturas mistas são consórcios de microrganismos provenientes principalmente de ambientes naturais, como lodo de reatores anaeróbios, resíduos da criação de bovinos e suínos, e resíduos agrícolas e urbanos. Nesses meios, além de bactérias produtoras de H₂, é possível observar a presença de bactérias consumidoras de H₂, como arqueias metanogênicas, bactérias homoacetogênicas e bactérias redutoras de sulfato e nitrato. Assim, faz-se necessário no processo a etapa de pré-tratamento do inóculo (processos químicos e físicos), que visa selecionar os microrganismos produtores de hidrogênio (SOARES *et al.*, 2020; USMAN *et al.*, 2019).

A produção de hidrogênio a partir de resíduos de biomassa lignocelulósica utilizando como inóculo culturas mistas foi reportada na literatura por diversos autores, pois a diversidade do meio microbiano permite o melhor aproveitamento do carbono disponível em formas diferentes (REN *et al.*, 2009).

Cui e Shen (2012) e Han *et al.*, (2012) estudaram a produção de hidrogênio a partir da grama e do hidrolisado da palha da soja, respectivamente, utilizando como inóculo do processo lodo anaeróbio. Chang *et al.* (2011) e Chen *et al.* (2012) avaliaram a produção de H₂ a partir da palha do arroz utilizado como inóculo lodo de esgoto. Nagaiah *et al.* (2016) estudaram a produção de H₂ a partir do hidrolisado do sorgo utilizando como inóculo resíduo proveniente da compostagem de esterco de búfalo.

3.2.1.2 Concentração de Substrato

Segundo Soares *et al.* (2018) e Pattra *et al.* (2008) quando a quantidade de substrato no meio excede o ideal, o metabolismo das bactérias produtoras de hidrogênio passa a ser voltado a produção de ácidos voláteis, que se acumulam no estágio inicial da produção de hidrogênio e, conseqüentemente, diminuem o pH no meio, levando redução da produção de hidrogênio.

Soares *et al.* (2018) estudaram o efeito da concentração do hidrolisado obtido a partir do pré-tratamento hidrotérmico (200°C) por 10 min a 16 bar, do bagaço da cana-de-açúcar na produção de hidrogênio em reatores bateladas usando como inóculo a cultura de *Clostridium butyricum* sob temperatura mesofílica (37°C). Os autores verificaram que o aumento da concentração de substrato no meio de 5 g/L para 6 g/L, reduziu a produção de hidrogênio de 1,53 para 0,95 mmol de H₂/ L.

Chang *et al.*, (2011), também reportaram que o aumento da concentração de carboidratos, reduz o rendimento de hidrogênio no processo fermentativo. Os autores estudaram o pré-tratamento da palha de arroz com diferentes ácidos, sulfúrico, nítrico e clorídrico (3% m/v) a 150°C por 1 hora, e após essa etapa foi realizada a desintoxicação de HMF e/ou furfural do meio. A digestão anaeróbia ocorreu com pH inicial 6,50 a 50°C, com agitação de 150 rpm e variando a concentração inicial de carboidratos no meio com a diluição do hidrolisado obtido na etapa do pré-tratamento em 3, 10, 20, 30, 40, e 50 g/L. Os autores alcançaram cerca de 35-65 g/L de carboidratos após o pré-tratamento, e o maior rendimento de H₂ obtido foi de 0,0624 mL de H₂/g de biomassa seca, conseguido utilizando ácido clorídrico com uma concentração de 3 g/L, a menor concentração de carboidratos estudada.

3.2.1.3 Inibidores

Diversos subprodutos, que interferem nos processos metabólicos, são formados na solubilização e/ou degradação da lignina e hemicelulose durante a etapa do pré-tratamento.

Eles podem ser classificados como componentes fenólicos (originários da degradação de lignina), derivados de furano tais como furfural e 5-hidroximetilfurfural (HMF) (gerados a partir da transformação de açúcares C5 e C6, respectivamente) e ácidos fracos, como ácido acético e ácido fórmico. Esses componentes inibitórios causam efeito tóxico no crescimento celular e atividade metabólica, por mecanismos distintos. Por exemplo, os agentes fenólicos mais venenosos prejudicam as membranas celulares, os derivados de furano interagem com enzimas envolvidas em bioreação fermentativa e carboxílicos não-dissociados (KUMAR *et al.*, 2015).

A elevação do teor de cinzas no hidrolisado da biomassa pré-tratada é outro fator que interfere no processo fermentativo, pois alguns ânions e cátions conseguem atravessar a parede celular, inibindo o crescimento microbiano. O teor de cinzas também aumenta com a neutralização do pH usando hidróxido de sódio (ZHOU *et al.*, 2015; ZHOU *et al.*, 2014; WATSON, PRIOR & LATENGA, 1984).

O teor de cinzas se refere aos materiais inorgânicos presentes na biomassa, que a depender do seu tipo, irá conter diferentes espécies e quantidades de componentes inorgânicos, sendo os principais: silício (Si), cálcio (Ca), potássio (K), sódio (Na) e magnésio (Mg) com vestígios de enxofre (S), fósforo (P), ferro (Fe), manganês (Mn) e alumínio (Al). Estes elementos estão ligados à estrutura da biomassa nas formas de óxidos, silicatos, carbonatos, sulfatos, cloretos e fosfatos (PATTIYA, CHAOW-U-THAI & RITTIDECH, 2013; RAVEENDRAN, GANESH & KHILAR 1995).

Zhou *et al.* (2015) avaliaram o efeito do pré-tratamento com ácido sulfúrico na alfafa a temperatura ambiente (22°C) nas concentrações de 35, 100 e 200 mg/L, assim como Syaichurrozi *et al.* (2019) estudaram o pré-tratamento ácido da *Salvinia molesta*, uma planta aquática, nas concentrações 2, 4, 6 % v/v de ácido sulfúrico a 30°C. Em ambos os trabalhos o teor de cinzas aumentou no hidrolisado, conforme o aumento da concentração de ácidos e do tempo de reação, influenciando na produção de etanol e biogás respectivamente.

A formação de subprodutos inibidores dos processos metabólicos é inevitável, mas pode ser minimizada através do controle e otimização das condições do pré-tratamento, por exemplo, tempo de exposição, temperatura, pressão e concentração de produtos químicos (KUMAR *et al.*, 2015).

3.2.2 Produção de Hidrogênio a partir da fermentação de resíduos agrícolas

A maior parte do resíduo gerado no campo vem das quatro principais culturas cultivadas mundialmente em relação a área plantada, trigo, milho, arroz e cana-de-açúcar,

respectivamente, gerando aproximadamente 5358,54 milhões de toneladas de biomassa seca por ano, que embora seja aproveitada em partes como ração animal, em sua grande maioria é incinerada. É importante frisar que a queima da biomassa libera CO₂, CH₄, e gases tóxicos para atmosfera, o que contribui para o efeito estufa e consequente aquecimento global. Assim, o aproveitamento de resíduos reduz o impacto ambiental causado pela agricultura (KUMARI & SINGH, 2018).

Bundhoo (2019) estimou o potencial de produção de bio-hidrogênio a partir da fermentação de resíduos agrícolas. Os diferentes resíduos agrícolas analisados pelo autor incluem palha e bagaço da cana-de-açúcar, palha de milho, sabugo de milho e milho, palha de trigo, palha e casca de arroz, palha de soja, cachos de restos de frutas, polpa de beterraba, resíduo de mandioca, palha de cevada e bagaço de sorgo.

Segundo o autor, que fez um levantamento dos rendimentos reportados pela literatura, o potencial de produção de bio-hidrogênio mundial a partir de palha de arroz é de 58 milhões de m³ de hidrogênio por ano e 34,68 milhões de m³ de hidrogênio por ano a partir da palha do trigo, isso para ambos os resíduos sem pré-tratamento, etapa que aumenta o rendimento de hidrogênio. Os volumes de hidrogênio correspondem a um potencial bioenergético de 623 PJ/ano e 373 PJ/ano, para palha de arroz e trigo respectivamente.

A Tabela 2 apresenta o rendimento de hidrogênio a partir de resíduos agrícolas.

Tabela 2 – Rendimentos de hidrogênio a partir de resíduo de biomassa agrícola.

Substrato	Inóculo (Pré-Tratamento)	Pré-Tratamento do Substrato	Condições Operacionais	Rendimento de H ₂	Referência
Hidrolisado do bagaço da cana	Lodo anaeróbico (90°C, 5 h)	0,5% (v/v) H ₂ SO ₄ (2 h) + explosão a vapor (195°C, 1,5 min)	pH: 6,05, Temperatura: 37°C	2,17 L/L	Thungklin <i>et al.</i> , 2018.
Palha de milho hidrolisada	<i>Thermoanaerobacterim thermosaccharolyticum</i> W16	Ácido/Aquecimento (1,69% H ₂ SO ₄ , 121°C ,117 min)	pH: 7,00, Temperatura: 60°C	2,24 mol H ₂ /mol açúcar	Cao <i>et al.</i> , 2009.
Palha de milho	Lodo anaeróbico granulado	Ácido/Aquecimento (1,7% H ₂ SO ₄ , 121°C, 1 h)	pH: 7,00, Temperatura: 36°C	7,74 mmol/g açúcar consumido	Zhang <i>et al.</i> , 2015.
Palha de trigo	Lodo de digestão anaeróbia (90°C, 10 min)	-	pH: 5,50, Temperatura: 37°C	10,52 mL/g SV	Quéméneur <i>et al.</i> , 2012.
Palha de arroz hidrolisada	Lodo de esgoto (95°C, 1 h)	Ácido/Aquecimento (3% m/v HCl, 150°C, 1 h)	pH: 6,50 Temperatura: 45°C Açúcares redutores: 3 g/L	0,0624 mmol/g de palha	Chang <i>et al.</i> , 2011.

Continua

					<i>Continuação</i>
Palha de arroz	Lodo de esgoto urbano (100°C, 40 min)	-	pH: 6,50 Temperatura: 55°C	24,80 mL/g palha seca	Chen <i>et al.</i> , 2012.
Hidrolisado da Palha da soja	Lodo anaeróbio	Ácido/Aquecimento (0,5% HCl, fervura, 30 min)	pH: 7,00 Temperatura: 35°C 120 rpm	60,20 mL/g palha seca	Han <i>et al.</i> , 2012.

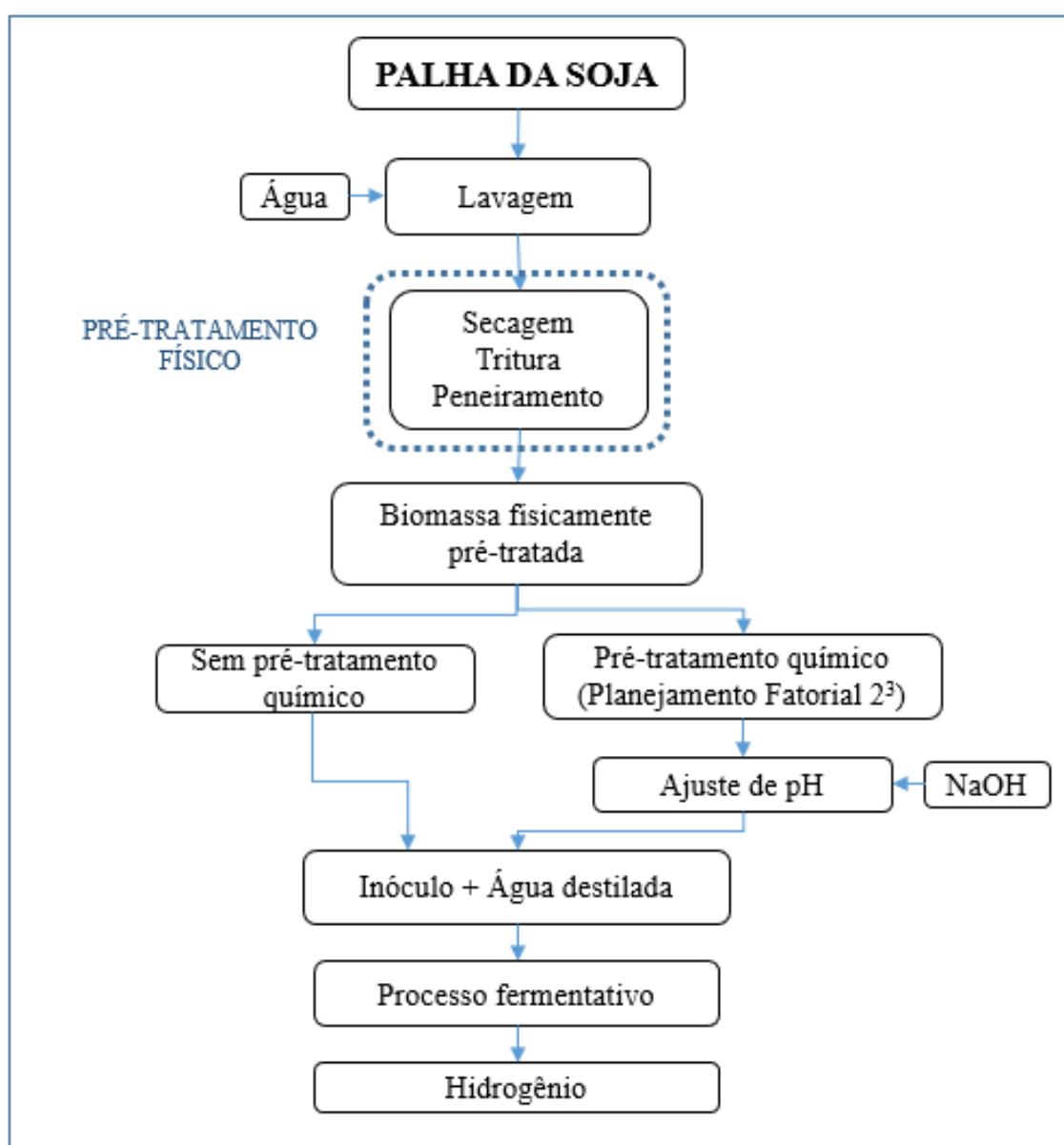
Fonte: Adaptado de Bundhoo *et al.*, 2019.

4 METODOLOGIA

A produção de bio-hidrogênio se deu por fermentação anaeróbia em reatores batelada usando como inóculo, lodo de biorreator UASB, e como substrato, o hidrolisado da palha da soja pré-tratada quimicamente com ácido sulfúrico diluído. Foram utilizados reatores anaeróbios operados em batelada de 120 mL, com volume reacional de 60 mL. Foi realizado planejamento fatorial 2^3 para avaliar o efeito ($p < 0,05$) da concentração de sólidos, concentração do ácido e tempo no pré-tratamento na produção biológica de hidrogênio.

O estudo foi planejado conforme mostra o fluxograma da Figura 5 abaixo:

Figura 4 – Fluxograma.



Fonte: Autora, 2020.

4.1 Preparo da Biomassa

A biomassa usada no experimento é conhecida popularmente como “palha da soja” que é composta pelo caule e folha, e foi proveniente do cultivo das espécies de soja: AS 3730 IPRO, BMX POTÊNCIA, BRS 9383, M 6210 IPRO, M 6210 IPRO, M 8349 IPRO e M 6410 IPRO. A biomassa foi coletada no Centro de Ciências Agrárias (CECA) da UFAL, localizado na BR 104 Norte, km 85, Rio Lago/AL, cujas coordenadas geográficas são: 09°28’02” de latitude sul e 35°49’43”, 127 m de altitude, localizado na região dos Tabuleiros Costeiros.

O resíduo foi lavado para remoção de areia e detritos, e seco em estufa de aeração forçada em sacos de papel *craft* a temperatura de 65°C por aproximadamente 72 h, para obtenção da massa seca, triturado em liquidificador e peneirado em peneira de 20 *mesh*. Com a redução do tamanho das partículas aumenta-se a área superficial do substrato, caracterizando o tratamento mecânico, o que facilita a ação da degradação da lignina, hemicelulose e celulose em açúcares pelo tratamento ácido.

4.2 Pré-tratamento do Inóculo

O inóculo utilizado no experimento é proveniente de lodo de reatores UASB coletado em uma estação de tratamento de esgoto doméstico (ETE) do residencial Cidade Jardins localizado na cidade de Maceió – AL. O lodo foi tratado termicamente, de modo que o material foi colocado em um aquecedor até que se atingisse a temperatura de 90°C, mantendo-o em temperatura constante por 10 min. Em seguida, resfriou-se o inóculo até que se alcançasse a temperatura de 25°C (MAINTINGUER *et al.*, 2011).

Este procedimento objetiva a seleção de microrganismos acidogênicos, a fim de favorecer a etapa da digestão anaeróbia onde são produzidos principalmente ácido acético, ácido butírico e etanol. Sob temperaturas termofílicas a membrana das arqueias responsáveis pela produção de metano se rompe, já os microrganismos acidogênicos esporulam, e sob condições favoráveis são capazes de retomar o metabolismo (CHERNICHARO, 2007).

4.3 PLANEJAMENTO FATORIAL 2³

Com intuito de estudar os efeitos da concentração de sólidos, concentração do ácido e tempo no pré-tratamento da biomassa e posterior produção de biológica de hidrogênio, foi realizado um planejamento fatorial 2³. A relação dos efeitos com os níveis está disposta na Tabela 3.

Tabela 3 – Variáveis de interesse.

Nível	Variáveis		
	1: Tempo (min)	2: Concentração H ₂ SO ₄ (%)	3: carga de sólidos (%)
- 1 (Mínimo)	30	1	5
+1 (Máximo)	60	4	10

Fonte – AUTORA, 2019.

As amostras submetidas ao pré-tratamento ácido foram preparadas na proporção de grama de biomassa/100 mL de solução de ácido sulfúrico diluído, de acordo com o planejamento experimental, e o experimento foi realizado a temperatura ambiente (26°C). Após o tempo de contato a amostra foi filtrada em papel filtro qualitativo de Ø 9 micras e o pH ajustado para 7,00, com solução de hidróxido de sódio a 50%, o pH neutro sugere que todo ácido está reagido com a base descontinuando assim a ação do pré-tratamento e padronizando o pH final após o pré-tratamento. A matriz experimental (Tabela 4) resultante envolveu 8 combinações, o experimento foi realizado em duplicada, totalizando 16 ensaios.

Tabela 4 – Matriz experimental planejamento fatorial 2³.

Reator	Tempo (min)	Ácido (% v/v)	S:L (% m/v)
1	30	1,0	5,0
2	60	1,0	5,0
3	30	4,0	5,0
4	60	4,0	5,0
5	30	1,0	10,0
6	60	1,0	10,0
7	30	4,0	10,0
8	60	4,0	10,0

Fonte – Autora, 2019.

Para interpretação dos resultados obtidos (glicose quantificada após pré-tratamento e produção acumulada de H₂) utilizou-se o software Minitab 17®.

4.4 Ensaio sem Pré-tratamento Químico

Foi realizado um ensaio com reator sem pré-tratamento químico após a batelada do planejamento experimental, onde os parâmetros escolhidos para tempo de contato e concentração de sólidos, foram os que resultaram em um maior rendimento de hidrogênio no planejamento experimental (ensaio 1 (89 mL de H₂/g_{biomassa})). No ensaio a amostra de biomassa com concentração de sólidos de 5% m/v, esteve em contato com apenas água destilada por 30 min a temperatura ambiente (26°C), e o hidrolisado obtido após filtração, foi

utilizado como substrato no ensaio. As condições de controle pré-estabelecidas estão dispostas na Tabela 5.

Tabela 5 – Condições ensaio da amostra sem pré-tratamento.

Reator	Substrato	Tempo (min)	Ácido (% v/v)	S:L (% m/v)
9	Hidrolisado da biomassa sem pré- tratamento	30 min	-	5

Fonte – Autora, 2020.

4.5 Processo Fermentativo

O hidrolisado obtido após a filtragem da amostra foi utilizado como substrato em reatores anaeróbios operados em batelada de 120 mL, com volume reacional de 60 mL, o hidrolisado representava cerca de 50% deste volume, 30 mL. Foi adicionado ao meio 25% de inóculo, 15 mL, e 15 mL de água destilada, o pH inicial dos reatores não foi ajustado, sendo de 7,70.

Foram realizadas 2 bateladas, cada uma 8 reatores, totalizando 16 reatores, cada batelada com 7 dias de duração. O ensaio com reator que continha hidrolisado que não foi quimicamente pré-tratado com ácido sulfúrico diluído, foi realizado com 2 reatores, e também teve a duração de 7 dias.

A anaerobiose nos reatores foi estabelecida pela substituição de todo o ar atmosférico presente no *headspace* dos frascos por meio do borbulhamento de argônio durante 3 min. Os reatores foram hermeticamente fechados com rolha de borracha de butila e lacre de metal, depois disso, foram dispostos em uma incubadora com agitação orbital (*shaker*) e com controle de temperatura, modelo TE-420 da Tecnal, a 120 rpm, e a temperatura mesofílica ($35\pm 1^\circ\text{C}$).

Os parâmetros escolhidos nesse projeto como concentração dos ácidos, temperatura, rotação da incubadora, proporção de substrato e de inóculo foram adotados com base nos experimentos de Han *et al.* (2012) e Cui e Shen (2012).

4.6 Análises Físico-químicas e Método Analítico

As análises foram realizadas no Laboratório de Saneamento Ambiental – LSA e no Laboratório de Controle Ambiental – LCA, no Centro de Tecnologia na Universidade Federal de Alagoas.

4.6.1 Análises físico-químicas

As análises físico-químicas realizadas durante o trabalho foram:

- Potencial hidrogeniônico (pH): feito de acordo com o APHA: *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (1998), para correlacionar o valor de pH com os metabólitos formados durante o processo, além do pH inicial e final dos reatores, e após a etapa de pré-tratamento ácido;
- Carboidratos totais: realizada pela metodologia de Dubois *et al.* (1956), utilizando como padrão a glicose. Análise realizada para se estimar a quantidade de açúcares obtidos após o pré-tratamento ácido, e seu consumo após processo fermentativo.
- Sólidos (sólidos totais fixos): realizado pelo método gravimétrico de acordo com APHA: *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (1998), para se determinar o teor de cinzas presente no meio após a etapa do pré-tratamento.

4.6.2 Cromatografia Gasosa

O hidrogênio coletado no *headspace* dos reatores em batelada, foi quantificado utilizando-se um cromatógrafo gasoso, modelo do equipamento GC-2010 *Plus* fabricado pela Shimadzu®, que possui um detector de condutividade térmica e uma coluna (*Supelco™ Carboxen-1010 PLOT*) com 30 m de comprimento e diâmetro interno de 0,53 mm (QIU *et al.*, 2016).

A amostra gasosa coletada no *headspace* foi introduzida na coluna cromatográfica com auxílio de uma seringa de vidro de 100 µL. A calibração da cromatografia gasosa foi realizada usando 99,99% (v/v) de H₂. As condições operacionais para a realização da cromatografia gasosa seguem o método ASTM D3612-96 para coluna *Carboxen-1010 PLOT*:

- Gás de arraste: Argônio, 3 mL/min;
- Temperaturas do forno: 35°C (5 min) até 250 °C a 24°C/min;
- Detector: TCD 230°C;
- Temperatura da coluna: 200°C.

4.7 Hidrogênio Produzido

A produção acumulada de bio-hidrogênio proveniente do processo fermentativo em batelada foi calculada conforme a Equação 1:

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

Onde: $V_{H,i}$ 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 do recipiente no tempo atual; $C_{H,i-1}$ é o volume de hidrogênio acumulado no headspace do recipiente no tempo anterior; $V_{G,i}$ é o volume total de biogás no tempo atual; $V_{G,i-1}$ é o volume total de biogás no tempo anterior; e $V_{H,0}$ é o volume de hidrogênio acumulado no tempo inicial.

A modelagem da produção de hidrogênio nos experimentos em batelada baseia-se na seguinte equação de Gompertz modificada (Equação 2) (HAN *et al.*, 2012):

$$H = P \cdot \exp \left[-\exp \left\{ \frac{R_m}{P} \cdot (\lambda - t) \cdot e + 1 \right\} \right] \quad (2)$$

Onde: H é a produção acumulada de hidrogênio (mL); P é potencial de produção de hidrogênio (mL); R_m é a taxa de produção de hidrogênio ($\text{mL} \cdot \text{h}^{-1}$); t é o tempo de incubação dos reatores (h); e é o número de Euler (2,71828); e λ é a fase lag (h). Os parâmetros cinéticos (P , R_m e λ) serão estimados via Excel.

O tempo no qual se obteve a máxima produção de hidrogênio foi calculado utilizando a Equação 3 (primeira derivada da Equação 2):

$$t_m = \lambda + \frac{P}{R_m \cdot e} \quad (3)$$

O rendimento de hidrogênio é dado neste trabalho em mL de $\text{H}_2/\text{g}_{\text{biomassa seca}}$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Efeito do Pré-tratamento na Quantificação de Carboidratos Totais

Os dados obtidos da quantificação de carboidratos totais (mg/L), após o pré-tratamento, foram organizados em uma matriz de planejamento 2³ como ilustrado na Tabela 6.

Tabela 6 – Matriz experimental (quantificação de carboidratos).

ENSAIO	1 (Tempo)	2 (Ácido %)	3 (S:L)	12	13	23	Carboidratos (mg/L)
1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	2946
2	+1	-1	-1	-1	-1	+1	3208
3	-1	+1	-1	-1	+1	-1	3050
4	+1	+1	-1	+1	-1	-1	3189
5	-1	-1	+1	+1	-1	-1	6032
6	+1	-1	+1	-1	+1	-1	6283
7	-1	+1	+1	-1	-1	+1	5893
8	+1	+1	+1	+1	+1	+1	6263

Fonte: AUTORA, 2020.

Com os resultados da Tabela 6 é possível observar que a carga de sólidos é o efeito que promove maior quantificação de carboidratos no meio, como se vê entre o ensaio 1 e 5, onde esse efeito contribuiu com um aumento de 104,77% no rendimento. O efeito da concentração de ácido sulfúrico foi praticamente indiferente ao experimento, sendo o aumento de rendimento mais expressivo de 3,53%, entre o ensaio 1 e 3. Já o tempo aumentou o índice de carboidratos de forma mais relevante se comparado o ensaio 1 e 2, de 8,91%, e de forma menos significativa, entre os ensaios 5 e 6, de 4,17%.

A Tabela 7 mostra os efeitos e a contribuição da concentração de ácido e tempo de exposição e concentração de sólidos para geração de carboidratos em cada uma das condições investigadas.

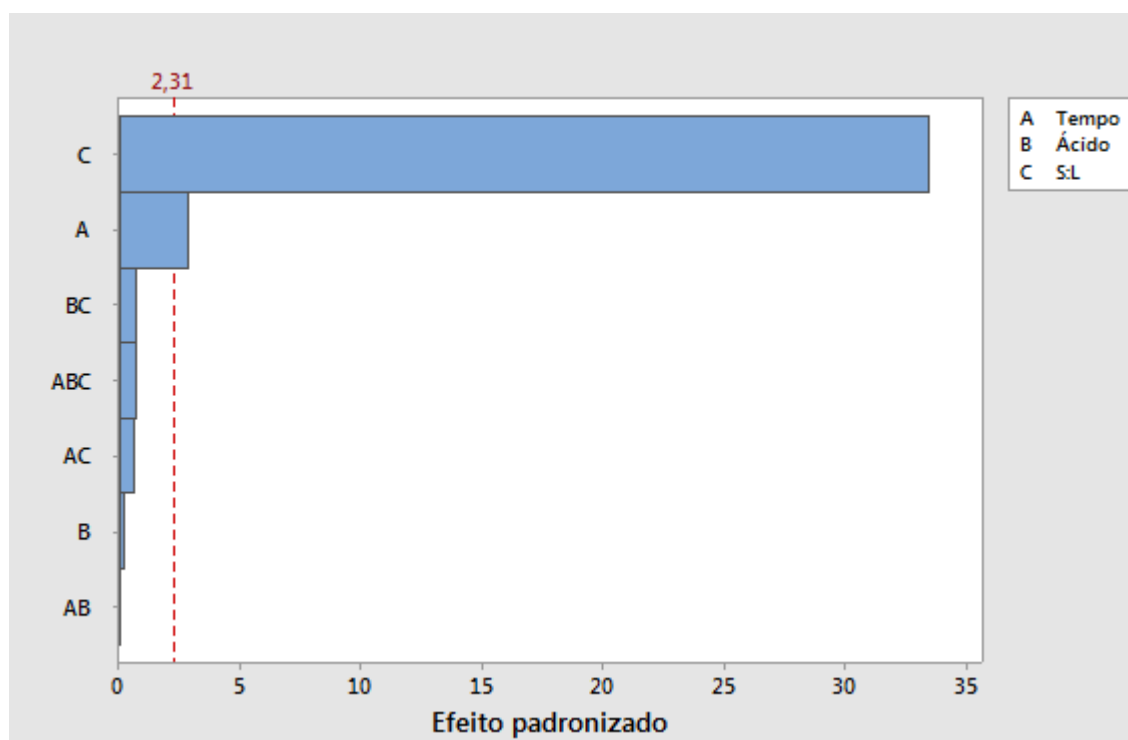
Tabela 7 – Efeito e contribuição dos fatores (quantificação de carboidratos).

FATOR	EFEITO	CONTRIBUIÇÃO
1: Tempo (min)	256 ± 90,143	0,71%
2: Concentração H ₂ SO ₄ (%)	-18,5 ± 90,143	0,00%
3: Carga de sólidos (%)	3019 ± 90,143	98,47%
12	-1 ± 90,143	0,00%
13	55 ± 90,143	0,03%
23	-61 ± 90,143	0,04%
123	60,5 ± 90,143	0,04%

Fonte: AUTORA, 2020.

A Figura 5 ilustra o gráfico de Pareto, gerado com software Minitab® 17, que mostra quais efeitos, entre os estudados no pré-tratamento (carga de sólidos, concentração de ácido e tempo de contato), foram significativos ($p < 0,05$).

Figura 5 – Gráfico de Pareto, efeito ($p < 0,05$) da carga de sólidos (5 e 10% m/v), concentração de ácido sulfúrico (1,0 e 4,0% v/v) e tempo de contato (30 e 60 min) na quantificação de carboidratos.



Fonte: AUTORA, 2020.

Conforme mostra a Tabela 7 e a Figura 5, os efeitos significantes ($p < 0,05$) foram apenas a carga de sólidos e o tempo de contato entre biomassa e pré-tratamento químico. Onde a carga de sólidos contribuiu em 98,47% com a quantificação carboidratos totais, já o tempo em 0,70%.

O efeito do tempo de contato possui um valor positivo (256), ou seja, quanto maior o tempo de contato da biomassa com pré-tratamento, maior a quantificação de carboidratos totais no meio. Isso se deve à hidrólise não homogênea da hemicelulose, onde uma porção hidrolisa rapidamente, enquanto a outra é gradual. Este comportamento é observado segundo os autores Lee, Iyer e Torget (1999) no pré-tratamento ácido da biomassa a temperaturas abaixo de 160°C.

O ataque do ácido diluído em diferentes concentrações (1 e 4% v/v) não contribuiu para aumentar os carboidratos do meio, e seu efeito foi negativo (-18,5), ou seja, quanto maior a concentração de H_2SO_4 menos carboidratos foram quantificados.

Antonopoulou e Lyberatos (2013) estudaram a sacarificação do sorgo com ácido sulfúrico diluído em diferentes concentrações (0,1, 0,5, 1,0, 1,5 e 2 % (m/v)) por 60 minutos a temperatura ambiente (25°C) e a 121°C. Os autores relataram que o aumento da concentração de ácido não foi efetivo para aumentar o rendimento de carboidratos no meio à temperatura ambiente, assim como reportado neste trabalho, porém à temperatura de 121°C houve um aumento na quantificação de açúcares conforme a elevação da concentração de H₂SO₄ de 0,1 a 1,0%, e o decaimento do rendimento nas concentrações de 1,5% e 2%, segundo os autores, devido à possível formação de inibidores.

Ainda que o aumento de carboidratos possa ser favorecido com a temperatura, a condição de processo a altas temperaturas pode não ser viável economicamente, e certamente é ambientalmente menos favorável devido ao alto consumo de energia, quando voltado para produção de hidrogênio a partir de resíduos por fermentação anaeróbia. Além disso, é possível que ocorra a degradação dos açúcares obtidos em 5-hidroximetil furfural (HMF) e furfural, e a formação de outros inibidores como ácidos orgânicos e compostos fenólicos, que causam efeito inibitório ao metabolismo dos microrganismos na etapa da fermentação (SOARES *et al.*, 2018; AKANKSHA *et al.*, 2014; GE *et al.*, 2011; PATTRA 2008; PALMQVIST & HAHN-HAGERDAL, 2000).

5.2 Efeito do Pré-tratamento no Teor De Cinzas

Os resultados referentes ao teor de cinzas (g/L) das amostras que passaram pelo pré-tratamento químico estão dispostos na matriz de planejamento 2³, como ilustrado na Tabela 8.

Tabela 8 – Matriz experimental (Teor de cinzas).

ENSAIO	1 (Tempo)	2 (Ácido %)	3 (S:L)	12	13	23	Teor de Cinzas (g/L)
1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	17
2	+1	-1	-1	-1	-1	+1	17
3	-1	+1	-1	-1	+1	-1	46
4	+1	+1	-1	+1	-1	-1	45
5	-1	-1	+1	+1	-1	-1	17
6	+1	-1	+1	-1	+1	-1	16
7	-1	+1	+1	-1	-1	+1	42
8	+1	+1	+1	+1	+1	+1	43

Fonte: AUTORA, 2020.

A Tabela 9 mostra os efeitos e a contribuição da concentração de ácido e tempo de exposição e concentração de sólidos no teor de cinzas em cada uma das condições investigadas.

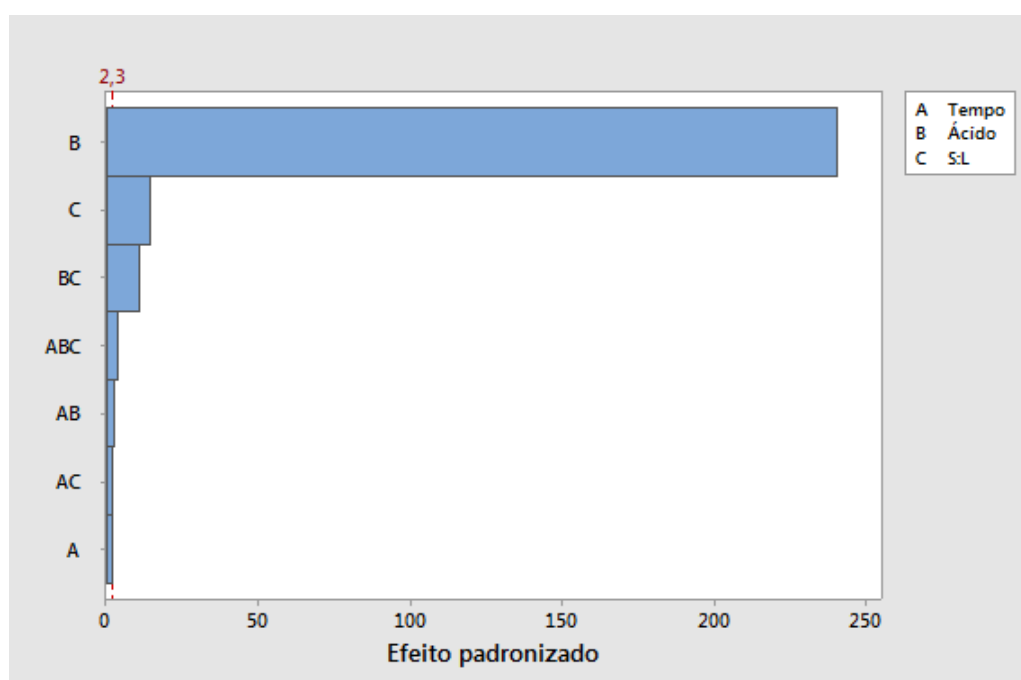
Tabela 9 – Efeito e contribuição dos fatores (teor de cinzas).

FATOR	EFEITO	CONTRIBUIÇÃO
1: Tempo (min)	0,207 ± 0,113	0,01%
2: Concentração H ₂ SO ₄ (%)	27,266 ± 0,113	99,38%
3: carga de sólidos (%)	-1,642 ± 0,113	0,21%
12	0,300 ± 0,113	0,01%
13	0,232 ± 0,113	0,01%
23	-1,209 ± 0,113	0,20%
123	0,425 ± 0,113	0,02%

Fonte: AUTORA, 2020.

A Figura 6 ilustra o gráfico de Pareto, gerado com software Minitab® 17, que aponta quais efeitos foram significativos ($p < 0,05$) entre os estudados:

Figura 6 – Gráfico de Pareto, efeito ($p < 0,05$) da carga de sólidos (5 e 10% m/v), concentração de ácido sulfúrico (1,0 e 4,0% v/v) e tempo de contato (30 e 60 min) no teor de cinzas.



Fonte: AUTORA, 2020.

Com os dados da Tabela 8 e 9 tem-se que o principal efeito que contribui (99,38%), de forma significativa ($p < 0,05$), para o aumento do teor de cinzas foi a concentração de ácidos. Conforme a concentração de H₂SO₄ aumentava de 1 para 4%, o teor de cinzas nas amostras pré-tratadas subia em média 61,85%. A contribuição dos demais efeitos foi pequena (0,62%) se comparada a concentração de ácidos (99,38%).

Syaichurrozi *et al.* (2019) também constataram que ocorre o aumento de cinzas no hidrolisado com o aumento da concentração de ácido sulfúrico, os autores reportaram que o

aumento do teor de cinzas nos hidrolisados nas concentrações de H_2SO_4 de 2, 4, 6 % v/v, foi de 48,31, 57,60 e 64,81%, respectivamente, em relação ao hidrolisado que não passou por pré-tratamento.

5.3 Efeito do Pré-tratamento no Rendimento de Hidrogênio

Os dados obtidos do rendimento de hidrogênio ($\text{mL H}_2/\text{g}_{\text{biomassa seca}}$) foram organizados em uma matriz de planejamento 2^3 como ilustrado na Tabela 10.

Tabela 10 – Matriz experimental (rendimento H_2).

ENSAIO	1 (Tempo)	2 (Ácido %)	3 (S:L)	12	13	23	Rendimento de H_2 ($\text{mL/g}_{\text{biomassa}}$)
1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	89
2	+1	-1	-1	-1	-1	+1	32
3	-1	+1	-1	-1	+1	-1	61
4	+1	+1	-1	+1	-1	-1	60
5	-1	-1	+1	+1	-1	-1	36
6	+1	-1	+1	-1	+1	-1	49
7	-1	+1	+1	-1	-1	+1	17
8	+1	+1	+1	+1	+1	+1	14

Fonte: AUTORA, 2020.

A Tabela 11 mostra os efeitos e a contribuição da concentração de ácido, tempo de exposição e concentração de sólidos para produção de hidrogênio em cada uma das condições investigadas.

Tabela 11 – Efeito e contribuição dos fatores (rendimento de H_2).

FATOR	EFEITO	CONTRIBUIÇÃO
1: Tempo (min)	$-12,125 \pm 4,267$	6,12%
2: Concentração H_2SO_4 (%)	$-13,375 \pm 4,267$	7,45%
3: carga de sólidos (%)	$-31,875 \pm 4,267$	42,32%
12	$10,375 \pm 4,267$	4,48%
13	$16,875 \pm 4,267$	11,86%
23	$-13,875 \pm 4,267$	8,02%
123	$-18,125 \pm 4,267$	13,68%

Fonte: AUTORA, 2020.

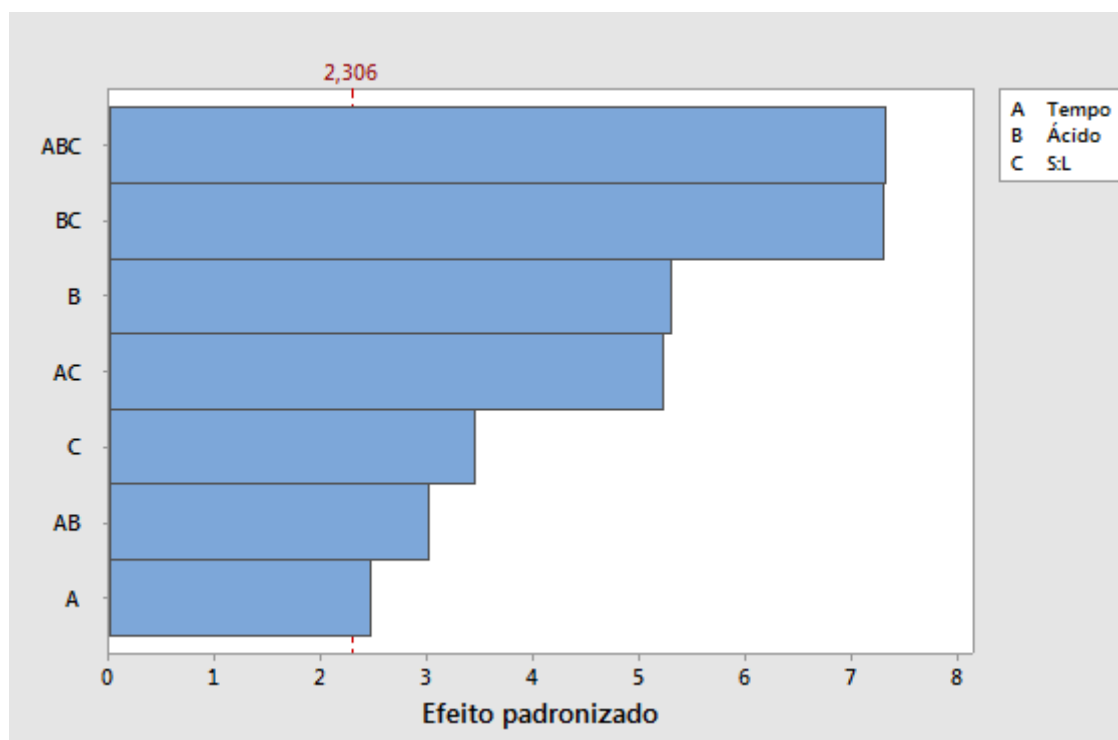
Analisando os dados da Tabela 11, tem-se que, com exceção da combinação do tempo com a carga de sólidos (10,375), e do tempo com a concentração de ácidos (16,875), os demais efeitos foram negativos, de forma que quando o pré-tratamento passava do nível inferior para o superior, o rendimento de hidrogênio reduzia. Assim, as condições de pré-tratamento mais brandas, com 1% de ácido diluído, tempo de contato de 30 min e

concentração de sólidos de 5,0% foram as que resultaram no maior rendimento de hidrogênio (89 mL de H_2 /g_{biomassa}).

O fator principal que menos influenciou o processo foi o tempo (contribuição de 6,12%), seguido da concentração de ácidos (7,45%), já a carga de sólidos teve a maior contribuição entre os três (42,32%). A interação dos 3 fatores principais e a interação da carga de sólidos com a carga de sólidos foram os parâmetros que mais influenciaram no processo como um todo, com uma contribuição de 13,68% e 42,32%, respectivamente.

Na Figura 7 ilustra o gráfico de Pareto, gerado com software Minitab® 17, aponta quais os efeitos estudados foram significativos no processo fermentativo para produção de hidrogênio.

Figura 7 - Gráfico de Pareto, efeito ($p < 0,05$) da carga de sólidos (5 e 10% m/v), concentração de ácido sulfúrico (1,0 e 4,0% v/v) e tempo de contato (30 e 60 min) no rendimento de hidrogênio.



Fonte: AUTORA, 2020.

O gráfico de Pareto da Figura 7 mostra que todos os fatores afetaram o rendimento de hidrogênio de forma significativa ($p < 0,05$). A carga de sólidos foi o efeito que mais influenciou o rendimento de H_2 , seguido da combinação dos três efeitos, da combinação da carga de sólidos com concentração de ácidos, da carga de sólidos com o tempo, da concentração de ácido, do tempo e da combinação da concentração de ácido com o tempo.

Com os resultados foi possível associar que tanto o aumento de carboidratos no meio no processo fermentativo, decorrente do aumento da carga de sólidos, quanto o aumento do

teor de cinzas, resultante do aumento da concentração do ácido sulfúrico e do tempo de contato, na etapa de pré-tratamento, diminuíram o rendimento de hidrogênio. Em média a redução do rendimento de hidrogênio com o aumento da carga de sólidos foi de 52%, já a redução com aumento da concentração de ácidos foi de 17%.

Chang *et al.* (2011) e Soares *et al.* (2018), também reportaram que o aumento da concentração de carboidratos, reduz o rendimento de hidrogênio no processo fermentativo. O maior rendimento de hidrogênio obtido pelos autores (0,0624 mL de H₂/g de biomassa seca e 1,53 mmol de H₂/ L, respectivamente), foi alcançado utilizando a menor concentração de carboidratos estudada (3 g/L e 5g/L, respectivamente).

Zhou *et al.* (2015) e Syaichurrozi *et al.* (2019) avaliaram que o teor de cinzas aumenta no hidrolisado conforme o aumento da concentração de ácidos e do tempo de reação, na etapa do pré-tratamento, e isto afeta negativamente na produção de etanol e biogás, respectivamente.

5.4 Ajuste dos Dados Experimentais

Os parâmetros de modelagem cinética (P, potencial de produção de hidrogênio (mL); R_m, taxa de produção de hidrogênio (mL/h); λ, fase lag (h)), obtidos através da equação de Gompertz Modificado, o tempo (t_m) onde ocorre a máxima taxa produção de hidrogênio (R_m), e a eficiência de consumo de carboidratos (EC), estão dispostos na Tabela 12 abaixo:

Tabela 12 – Parâmetros produção acumulada de H₂.

ENSAIO	1 (Tempo (min))	2 (Ácido (%))	3 (S:L (%))	HY ^b	EC ^c (%)	P (mL)	R _m (mL/h)	λ (h)	t _m (h)	R ²
1	30	1	5	89	49,96	159	1,22	29	77	0,9965
2	60	1	5	32	51,15	54	0,43	15	61	0,9959
3	30	4	5	61	48,71	106	0,80	30	79	0,9990
4	60	4	5	60	46,89	110	0,72	22	78	0,9988
5	30	1	10	36	71,57	145	0,82	20	85	0,9932
6	60	1	10	49	66,30	182	1,23	32	87	0,9989
7	30	4	10	17	61,78	58	0,46	34	80	0,9972
8	60	4	10	14	67,11	42	0,36	21	64	0,9866
9 ^a	30	0	5	5	49,89	8	0,14	0	21	0,9919

^a Ensaio realizado sem pré-tratamento da biomassa; ^b Rendimento de H₂ (mL/g_{biomassa seca}); ^c EC: eficiência consumo de carboidratos.

Fonte: AUTORA, 2020.

Como exposto na Tabela 12 o valor de R² variou de 0,9866 a 0,9990 mostrando que os dados do experimento se ajustam ao modelo proposto. O apêndice A traz as curvas de cada experimento ajustadas ao modelo proposto pela equação de Gompertz Modificado.

O maior potencial de produção de hidrogênio (P) foi alcançado no ensaio 4 de 182 mL, seguido do ensaio 1 com 159 mL. Porém o ensaio 1 foi realizado com metade da concentração de sólidos do ensaio 4, o que levou a um melhor rendimento de hidrogênio no ensaio 1 em relação ao 4, de 89 e 49 mL de H_2 /g_{biomassa seca}, respectivamente. A máxima taxa de produção de H_2 foi próxima em ambos os ensaios, sendo de 1,22 mL/h no ensaio 1 e 1,23 mL/h no ensaio 4.

O aumento da concentração de carboidratos no meio fermentativo (10% v/v), devido ao aumento da carga de sólidos na etapa do pré-tratamento, resultou em uma fase lag (λ) mais prolongada (20 a 34 horas), na maior eficiência de consumo de carboidratos (61,78 a 71,57%), e também em menores rendimentos de H_2 (14 a 49 H_2 /g de biomassa seca). Assim, os microrganismos presentes no meio utilizaram os carboidratos como fonte de energia para seu crescimento, aumentando a fase lag, e reduzindo o rendimento de hidrogênio (CHANG *et al.*, 2011).

A elevação da concentração do H_2SO_4 também resultou em um aumento da fase lag (22 a 34 horas), da mesma forma que observado por Cui e Shen (2012), onde o aumento na concentração de ácido na etapa do pré-tratamento, ocasionou um atraso no processo da fermentação anaeróbia, prejudicando a conversão da matéria orgânica e consequentemente, a produção de hidrogênio.

Ainda segundo Cui e Shen (2012), o reator que possuía a menor fase lag foi o que não passou por pré-tratamento, assim como neste trabalho, onde o ensaio 9 não apresentou fase lag. O rápido consumo dos açúcares, devido à ausência de fase lag, não foi favorável a produção de hidrogênio neste caso.

As mesmas tendências observadas para fase lag, podem ser estendidas ao tempo (t_m) onde ocorre a máxima taxa produção de hidrogênio (R_m).

O pré-tratamento aumentou o rendimento de H_2 , o melhor resultado de 89 mL de H_2 /g de biomassa seca, foi 17,8 vezes melhor do que rendimento de hidrogênio apresentado pelo reator que não passou pelo pré-tratamento (5 mL de H_2 /g de biomassa seca).

Han *et al.*, (2012) também obtiveram maiores rendimentos de H_2 nos ensaios onde o substrato hidrolisado era de amostra quimicamente pré-tratada, em relação ao ensaio no qual o hidrolisado foi proveniente de amostra que não foi quimicamente pré-tratada. O melhor rendimento de hidrogênio alcançado pelos autores foi com pré-tratamento ácido (HCl 4% v/v, fervido por 30 min) de 47,65 mL de H_2 /g de biomassa seca, e este resultado foi 11 vezes melhor do que rendimento de hidrogênio apresentado pelo reator que não passou pelo pré-tratamento.

Para Cui e Shen (2012) o melhor rendimento de hidrogênio foi com pré-tratamento ácido (HCl 4% v/v, fervido por 30 min) de 72,21 mL de H₂/g de biomassa seca, e este resultado foi 16,45 vezes melhor do que rendimento de hidrogênio apresentado pelo reator que não passou pelo pré-tratamento.

O maior rendimento de hidrogênio alcançado neste trabalho foi 89 mL de H₂/g biomassa de seca, com o pré-tratamento a 1% v/v de H₂SO₄ a temperatura ambiente (26°C), e carga de sólidos de 5% m/v, este valor é superior aos resultados alcançados pelos autores Cui e Shen (2012) (72,21 mL de H₂/g de biomassa seca) e *Han et al.*, (2012) (47,65 mL de H₂/g de biomassa seca) em condições ainda mais brandas de ácido e temperatura. A possível presença de inibidores, como furfural, produzidos na etapa de pré-tratamento na degradação da hemicelulose a partir da fervura do meio pode ter levado a formação destes componentes influenciando no rendimento de H₂ em relação aos trabalhos reportados.

6 CONCLUSÃO

Foi possível obter hidrogênio pela metodologia proposta, 89 mL de H_2 /g de biomassa seca, nas condições mais brandas de pré-tratamento (com 1% v/v de ácido diluído, tempo de contato de 30 min e concentração de sólidos de 5,0% m/v), indicando que o processo de produção de hidrogênio por fermentação escura foi inibido em condições de incremento desses parâmetros, possivelmente pelo aumento do teor de cinzas nos ensaios ocasionado pelo aumento da concentração de ácidos, e pelo aumento da concentração de carboidratos totais, resultante do aumento da carga de sólidos na etapa do pré-tratamento.

O intervalo escolhido de tempo de contato (30 e 60 min) e concentração de ácido sulfúrico diluído (1 e 4% v/v) não foram significativos ($p > 0,05$) para maior quantificação de açúcares na etapa do pré-tratamento da palha da soja a temperatura ambiente (26°C), porém a concentração de sólidos (5 e 10% m/v) sim.

Na produção biológica de hidrogênio todos os parâmetros estudados foram significativos ($p < 0,05$). O maior rendimento de H_2 obtido (89 mL de H_2 /g de biomassa seca) nas condições de pré-tratamento de com 1% v/v de H_2SO_4 , tempo de contato de 30 min e concentração de sólidos de 5,0% m/v, foi 17,8 vezes maior que o rendimento de H_2 obtido (5 mL de H_2 /g de biomassa seca) no ensaio que a biomassa não passou pelo pré-tratamento.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Avaliar a produção de inibidores após a etapa do pré-tratamento;
- ✓ Avaliar o pré-tratamento ácido na degradação da biomassa;
- ✓ Utilizar temperaturas termofílicas no pré-tratamento químico;
- ✓ Estudar a ampliação de escala do experimento;
- ✓ Avaliar condições mais brandas de concentração de ácido no pré-tratamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACAR, C.; DINCER, I. Review and evaluation of hydrogen production options for better environment. *Journal of cleaner production*, 2019.
- AKANKSHA, K.; PRASAD, A.; SUKUMARAN, R. K.; NAMPOOTHIRI, M. K.; PANDEY, A.; RAO, S. S.; BINOD, P.; Dilute acid pretreatment and enzymatic hydrolysis of sorghum biomass for sugar recovery – a statistical approach. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 52, p. 1082-1089, 2014.
- ALVIRA, P. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, p. 4851-4861, 2010.
- ANTONOPOULOU, G.; LYBERATOS, G. Effect of pretreatment of sweet sorghum biomass on methane generation. **Waste and Biomass Valorization**, v. 4, n. 3, p. 583-591, 2013.
- APHA, Awwa. Wef. **Standard methods for the examination of water and wastewater**, v. 21, p. 1378, 1998.
- BALAT, H.; KIRTAY, E. Hydrogen from biomass—present scenario and future prospects. **International journal of hydrogen energy**, v. 35, n. 14, p. 7416-7426, 2010.
- BUNDHOO, Z. M. Potential of bio-hydrogen production from dark fermentation of crop residues: A review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, n. 32, p. 17346-17362, 2019.
- CABRERA, E.; MUÑOZ, M. J.; MARTÍN, R.; CARO, I.; CURBELO, C.; DÍAZ, A. B. Comparison of industrially viable pretreatments to enhance soybean straw biodegradability. **Bioresource technology**, v. 194, p. 1-6, 2015.
- CAO, G.; REN, N.; WANG, A.; LEE D. J.; GUO, W.; LIU, B.; ZHAO, Q. Acid hydrolysis of corn stover for biohydrogen production using *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* w16. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 17, p. 7182-7188, 2009.
- CHANG A. C. C, TU Y-H., HUANG M-H, LAY C-H, LIN C-Y. Hydrogen production by the anaerobic fermentation from acid hydrolyzed rice straw hydrolysate. **International journal of hydrogen energy**, v. 36, n. 21, p. 14280-14288, 2011.
- CHEN, C. C.; CHUANG, Y. S.; LIN, C. Y.; LAY, C. H.; SEN, B. Thermophilic dark fermentation of untreated rice straw using mixed cultures for hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 20, p. 15540-15546, 2012.
- CHERNICHARO, C. A. L.; **Anaerobic reactors**. IWA publishing, 2007.
- CONAB, **Fechamento da safra 2018/19 aponta produção recorde de grãos de 242,1 milhões de t**. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/3042-fechamento-da-safra-2018-2019-aponta-producao-recorde-de-graos-estimada-em-242-1-milhoes-de-t>>. Acesso em: 02 de mar. de 2020.

CUI, M.; SHEN, J.; Effects of acid and alkaline pretreatments on the biohydrogen production from grass by anaerobic dark fermentation. **International Journal Of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 1, p. 1120-1124, 2012.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. T.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

EMPRAPA. **Soja em números (safra 2018/19)**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/web/portal/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>>. Acesso em: 02 de mar. de 2020.

FÍLBIDA G. F. **Avaliação da Palhada da Soja como Matéria-Prima para a Produção de Etanol Combustível Auxiliado por Tratamentos Químicos**. Trabalho de conclusão do curso de Engenharia Ambiental, Universidade de Rio Verde – UniRV, 2017.

GE, L.; WANG, P.; MOU, H. Study on saccharification techniques of seaweed wastes for the transformation of ethanol. **Renewable Energy** 36, 84–89, 2011.

GHOSH, S.; CHOWDHURY, R.; BHATTACHARYA, P. Sustainability of cereal straws for the fermentative production of second generation biofuels: a review of the efficiency and economics of biochemical pretreatment processes. **Applied energy**, v. 198, p. 284-298, 2017.

GÍRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; MARQUES, S.; BOGEL-ŁUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, p. 4775-4800, 2010.

GURGEL, L. V. A. **Hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar**. Tese (Doutorado em Química) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

HAN, H.; WEI, L.; LIU, B.; YANG, H.; SHEN, J. Optimization of biohydrogen production from soybean straw using anaerobic mixed bacteria. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37 n. 17, p. 13200-13208, 2012.

JANG, S.; SHIRAI, Y.; UCHIDA, M.; WAKISAKA, M. Production of Mono Sugar from Acid Hydrolysis of Seaweed. *Afr. J. Biotechnol.* 11, 1953–1963. 2012.

JÖNSSON, L. J.; MARTÍN, C. Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. **Bioresource technology**, v. 199, p. 103-112, 2016.

KUMAR, G.; BAKONYI, P.; PERIYASAMY, S.; KIM, S. H., NEMESTÓTHY, N.; BÉLAFI-BAKÓ, K.; Lignocellulose biohydrogen: practical challenges and recent progress. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 44, 728-737. 2015.

KUMARI, D.; SINGH, R. Pretreatment of lignocellulosic wastes for biofuel production: a critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 90, p. 877-891, 2018.

LEE, Y. Y.; IYER, P.; TORGET, R. W. Dilute-acid hydrolysis of lignocellulosic biomass. In: Recent progress in bioconversion of lignocellulosics. **Springer**, Berlin, Heidelberg, p. 93-115, 1999.

ŁUKAJTIS, R.; HOŁOWACZ, I.; KUCHARSKA, K.; GLINKA, M.; RYBARCZYK, P.; PRZYJAZNY, A.; KAMIŃSKI, M. Hydrogen production from biomass using dark fermentation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 91, p. 665-694, 2018.

MAINTINGUER, S. I.; FERNANDES, B. S.; DUARTE, I. C.; SAAVEDRA, N. K.; ADORNO, M. A. T.; VARESCHE, M. B. A. Fermentative hydrogen production with xylose by *Clostridium* and *Klebsiella* species in anaerobic batch reactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 21, p. 13508-13517, 2011.

MARTELLI-TOSI, M.; ASSIS, O. B.; SILVA, N. C.; ESPOSTO, B. S.; MARTINS, M. A.; TAPIA-BLÁCIDO, D. R. Chemical treatment and characterization of soybean straw and soybean protein isolate/straw composite films. **Carbohydrate polymers**, v. 157, p. 512-520, 2017.

MOOD, S. H.; GOLFESHAN, A. H.; TABATABAEI, M.; JOUZANI, G. S.; NAJAFI, G. H.; GHOLAMI, M.; ARDJMAND, M. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 77-93, 2013.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; H. M.; Ladisch, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource technology**, v. 96, n. 6, p. 673-686, 2005.

NAGAIHAH, D.; CHIRANJEEVI, T.; RAO, P. S.; UMA, A.; PRAKASHAM, R. S.; Fermentation of Pretreated High-Biomass Sorghum Hydrolysates to Biohydrogen by Mixed Consortia. **Sugar Tech**, v. 18, n. 3, p. 266-272, 2016.

NAGARAJAN, D.; LEE, D.; CHANG, J. Recent insights into consolidated bioprocessing for lignocellulosic biohydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, n. 28, p. 14362-14379, 2019.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B.; Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition, **Bioresource Technology** v. 74 p. 25-33, 2000.

PATTIYA, A.; CHAOW-U-THAI, A.; RITTIDECH, S. The influence of pretreatment techniques on ash content of cassava residues. **International journal of green energy**, v. 10, n. 5, p. 544-552, 2013.

PATTRA, S.; SANGYOKA, S.; BOONMEE, M.; REUNGSANG, A.; Bio-hydrogen production from the fermentation of sugarcane bagasse hydrolysate by *Clostridium butyricum*. **International journal of hydrogen energy**, v. 33, n. 19, p. 5256-5265, 2008.

QIU, C.; ZHENG, Y.; ZHENG, J.; LIU, Y.; XIE, C.; SUN, L. Mesophilic and thermophilic biohydrogen production from xylose at various initial pH and substrate concentrations with microflora community analysis. **Energy & Fuels**, v. 30, n. 2, p. 1013-1019, 2016.

QUÉMÉNEUR M., BITTEL M., TRABLY E., DUMAS C., FOURAGE L., RAVOT G., STEYER J., CARRERE H. Effect of enzyme addition on fermentative hydrogen production from wheat straw. *International journal of hydrogen energy*, v. 37, n. 14, p. 10639-10647, 2012.

RAVEENDRAN, K., GANESH, A., KHILAR, K. C. Influence of mineral matter on biomass pyrolysis characteristics. **Fuel**, v. 74, n. 12, p. 1812-1822, 1995.

REHFELD, O.; BLASCZYK, G., Utilização da palha de arroz e da palha de soja como único volumoso para bezerros após a desmama. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 7, n. 1, p. 13-15, 1972.

REN, N.; WANG, A.; CAO, G.; XU, J.; GAO, L. Bioconversion of lignocellulosic biomass to hydrogen: potential and challenges. **Biotechnology advances**, v. 27 n. 6, p 1051-1060, 2009.

RESTLE, J.; ALVES FILHO, D. C.; BRONDANI, I. L.; FLORES, J. L. C. Palha de Soja (*Glycine Max*) como Substituto Parcial da Silagem de Sorgo Forrageiro (*Sorghum Bicolor* (L.) Moench) Na Alimentação De Terneiros De Corte Confinado. **Ciência Rural**, v. 30, n. 2, p. 319-324, 2000.

SALAKKAM, A.; PLANGKLANG, P.; SITTIJUNDA, S.; KONGKEITKAJORN, M. B.; LUNPROM, S.; REUNGSANG, A. Bio-hydrogen and Methane Production from Lignocellulosic Materials. In **Biomass for Bioenergy-Recent Trends and Future Challenges**. IntechOpen, 2019.

SILVA, C. E. F.; BERTUCCO, A. Severity Factor as an Efficient Control Parameter to Predict Biomass Solubilization and Saccharification During Acidic Hydrolysis of Microalgal Biomass. **BioEnergy Research**, v. 11, n. 3, p. 491-504, 2018.

SILVA, M. S. Avaliação química e biológica do resíduo de soja, **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 26 (3): 571-576, 2006.

SOARES, J. F.; CONFORTIN, T. C.; MAYER, F. D.; MAZUTTI, M. A.; Dark fermentative biohydrogen production from lignocellulosic biomass: Technological challenges and future prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 117, p. 109484, 2020.

SOARES, L. A.; RABELO, C. A. B. S.; SAKAMOTO, I. K.; DELFORNO, T. P.; SILVA, E. L.; VARESCHE, M. B. A.; Metagenomic analysis and optimization of hydrogen production from sugarcane bagasse. **Biomass and Bioenergy**, v. 117, p. 78-85, 2018.

SYAICHURROZI, I.; VILLTA, P. K.; NABILAH, N.; RUSDI, R Effect of sulfuric acid pretreatment on biogas production from *Salvinia molesta*. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 7, n. 1, p. 102857, 2019.

THUNGKLIN P.; SITTIJUNDA S.; REUNGSANG A; Sequential fermentation of hydrogen and methane from steam exploded sugarcane bagasse hydrolysate. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 43, n. 21, p. 9924-9934, 2018.

USMAN, T. M.; BANU, J. R.; GUNASEKARAN, M.; KUMAR, G. Biohydrogen production from industrial wastewater: An overview. **Bioresource Technology Reports**, v. 7, p. 100287, 2019.

WATSON, N. E., PRIOR, B. A., LATEGAN, P. M.; LUSSI, M. Factors in acid treated bagasse inhibiting ethanol production from D-xylose by *Pachysolen tannophilus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 6 n. 10, p. 451-456, 1984

XIONG, J.; HASSAN, M.; WANG, W.; DING, W. Methane enhancement by the co-digestion of soybean straw and farm wastewater under different thermo-chemical pretreatments. **Renewable Energy**, v. 145, p. 116-123, 2020.

ZAJIC, J. E., KOSARIC, N., BROSSEAU, J. D. Microbial production of hydrogen. **In: Advances in Biochemical Engineering**, Volume 9. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 57-109, 1978.

ZHANG, K., REN, N. Q., WANG, A. J. Fermentative hydrogen production from corn stover hydrolyzate by two typical seed sludges: effect of temperature. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, n. 10, p. 3838-3848, 2015.

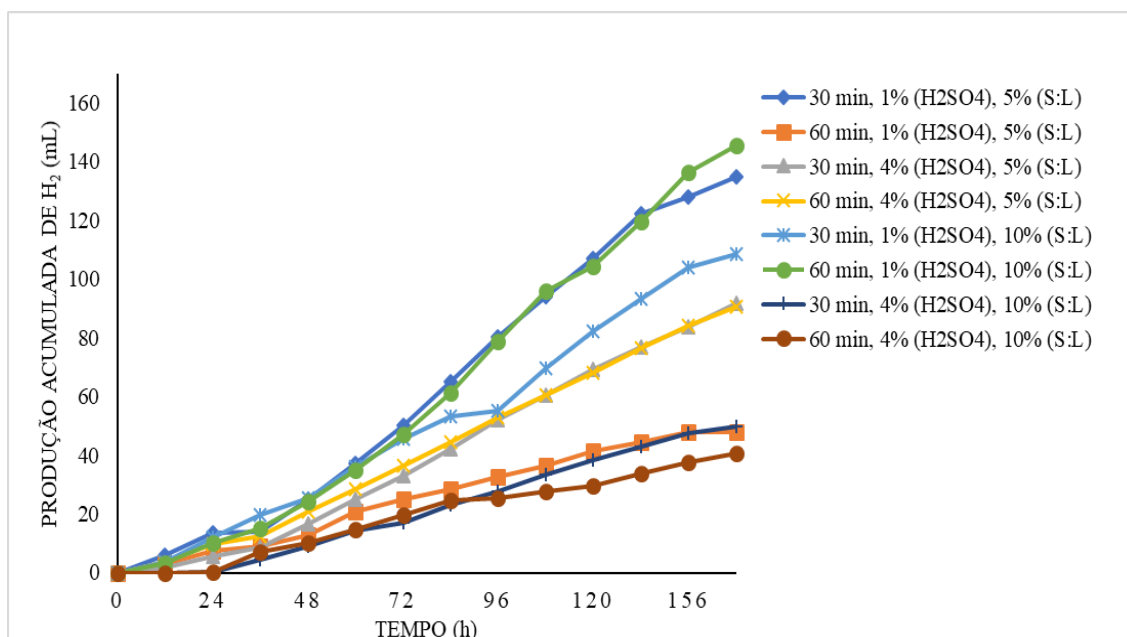
ZHANG, X.; HOU, X. S. **Experimental Research on low calorific value gas blended with hydrogen engine**. Energy Procedia, v. 158, p. 459-464, 2019.

ZHOU, S.; RUNGE, TROY M. Mechanism of improved cellulosic bio-ethanol production from alfalfa stems via ambient-temperature acid pretreatment. **Bioresource technology**, v. 193, p. 288-296, 2015.

ZHOU, S.; WEIMER, P. J.; HATFIELD, R. D.; RUNGE, T. M.; DIGMAN, M. Improving ethanol production from alfalfa stems via ambient-temperature acid pretreatment and washing. **Bioresource technology**, v. 170, p. 286-292, 2014.

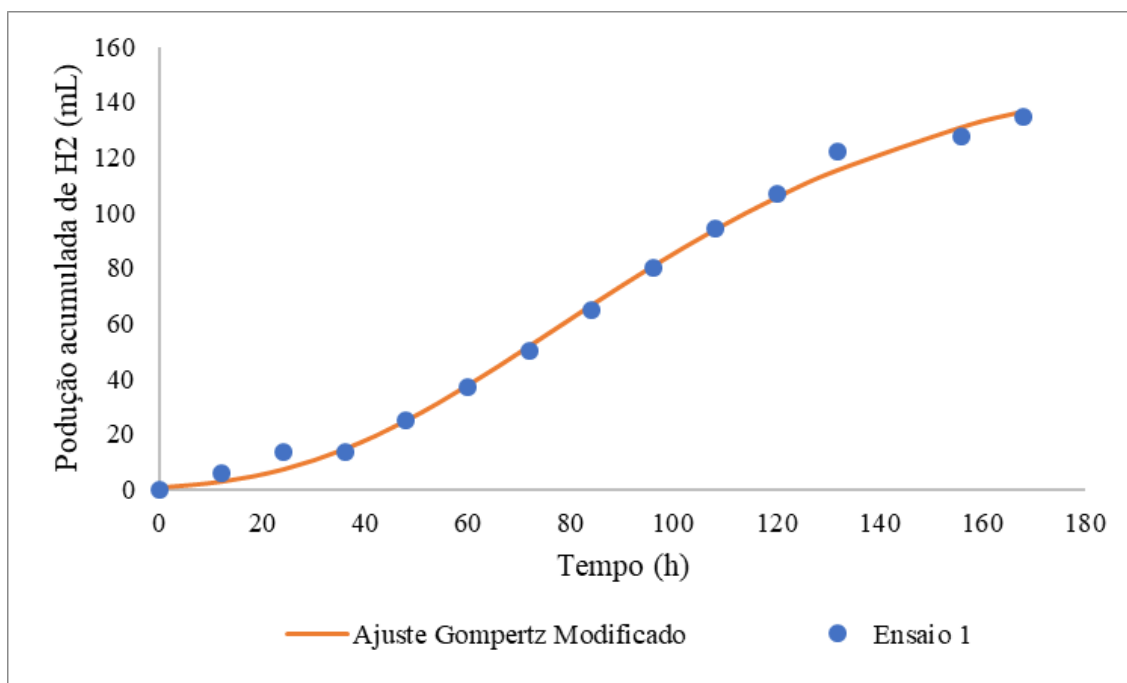
APÊNDICE A

Figura 8 – Curvas de produção de hidrogênio acumulado.



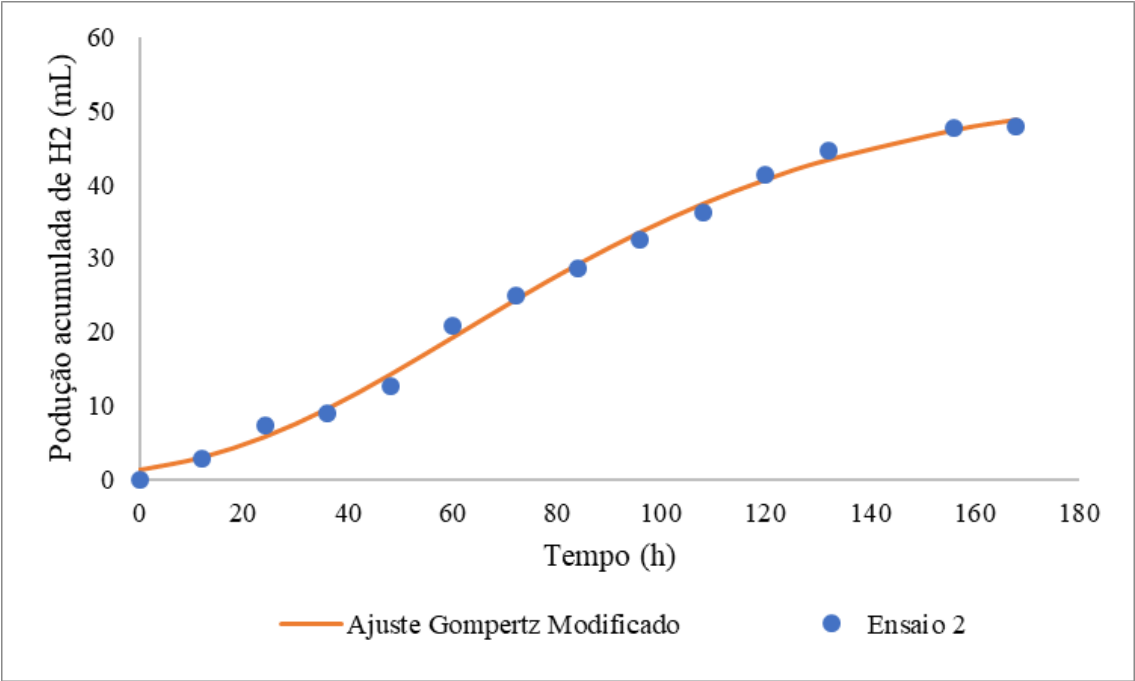
Fonte: AUTORA, 2020.

Figura 9 – Ensaio 1 (ajuste de Gompertz Modificado).



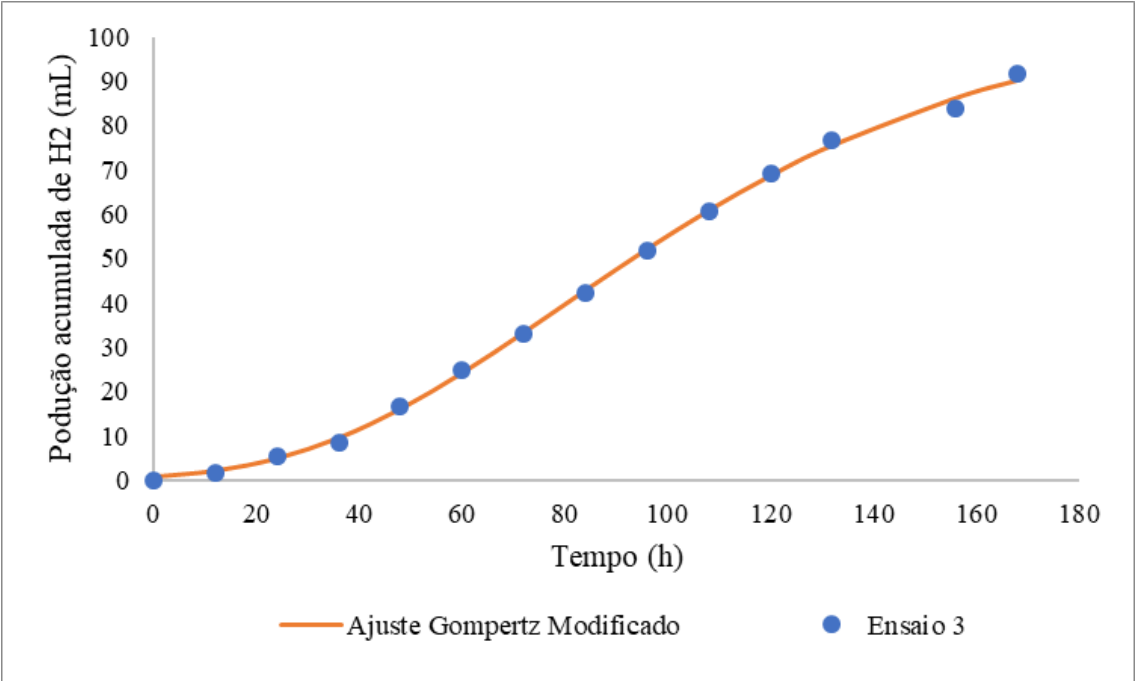
Fonte: AUTORA, 2020.

Figura 10 – Ensaio 2 (ajuste de Gompertz Modificado).



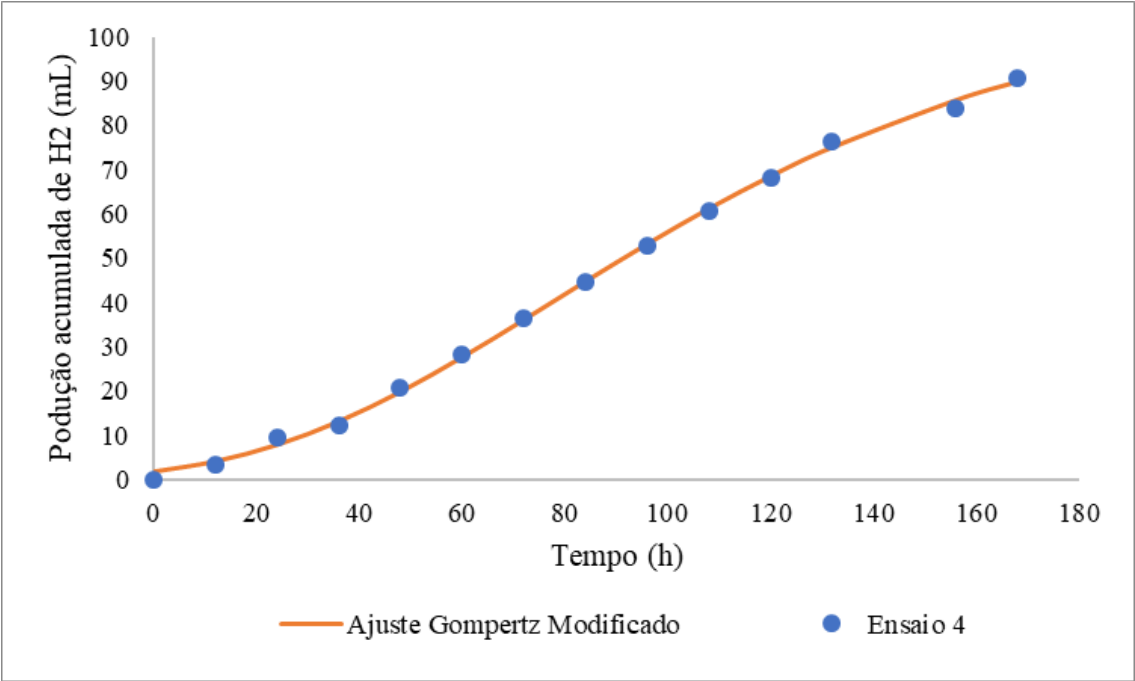
Fonte: AUTORA, 2020.

Figura 11 – Ensaio 3 (ajuste de Gompertz Modificado).



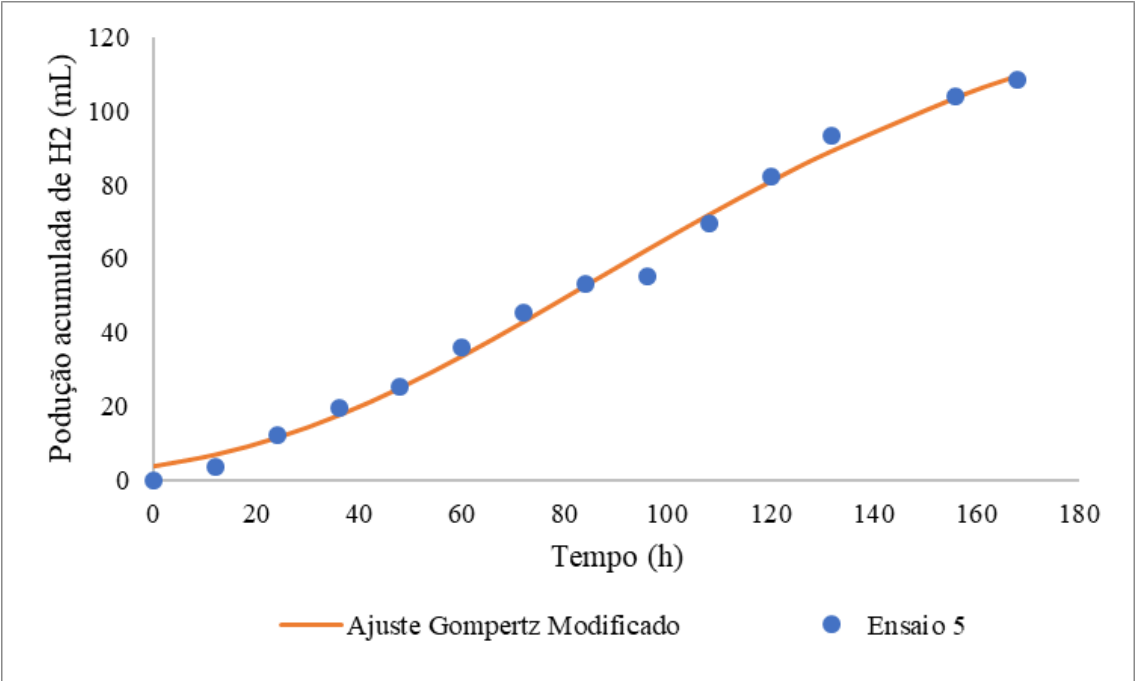
Fonte: AUTORA, 2020.

Figura 12 – Ensaio 4 (ajuste de Gompertz Modificado).



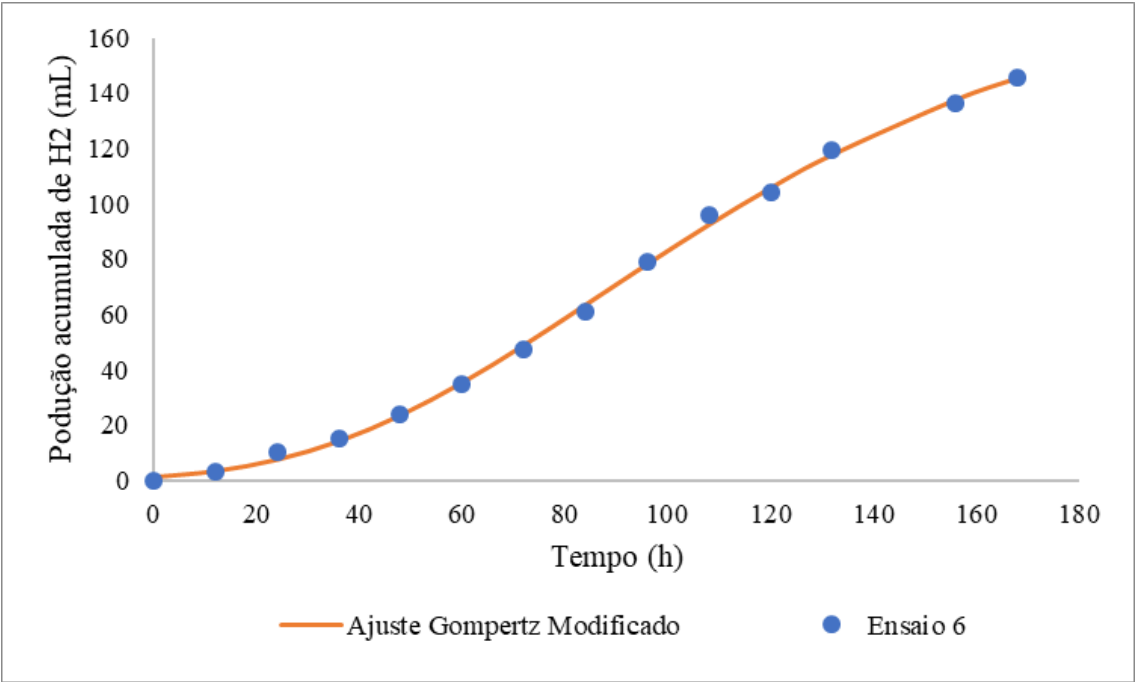
Fonte: AUTORA, 2020.

Figura 13 – Ensaio 5 (ajuste de Gompertz Modificado).



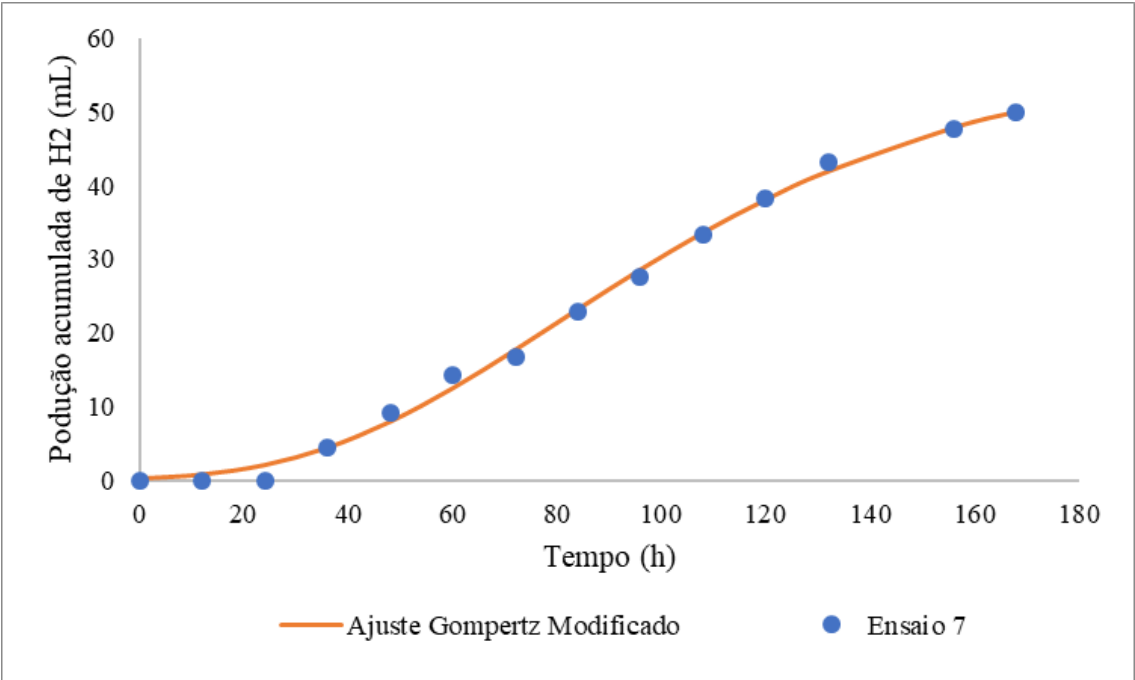
Fonte: AUTORA, 2020.

Figura 14 – Ensaio 6 (ajuste de Gompertz Modificado).



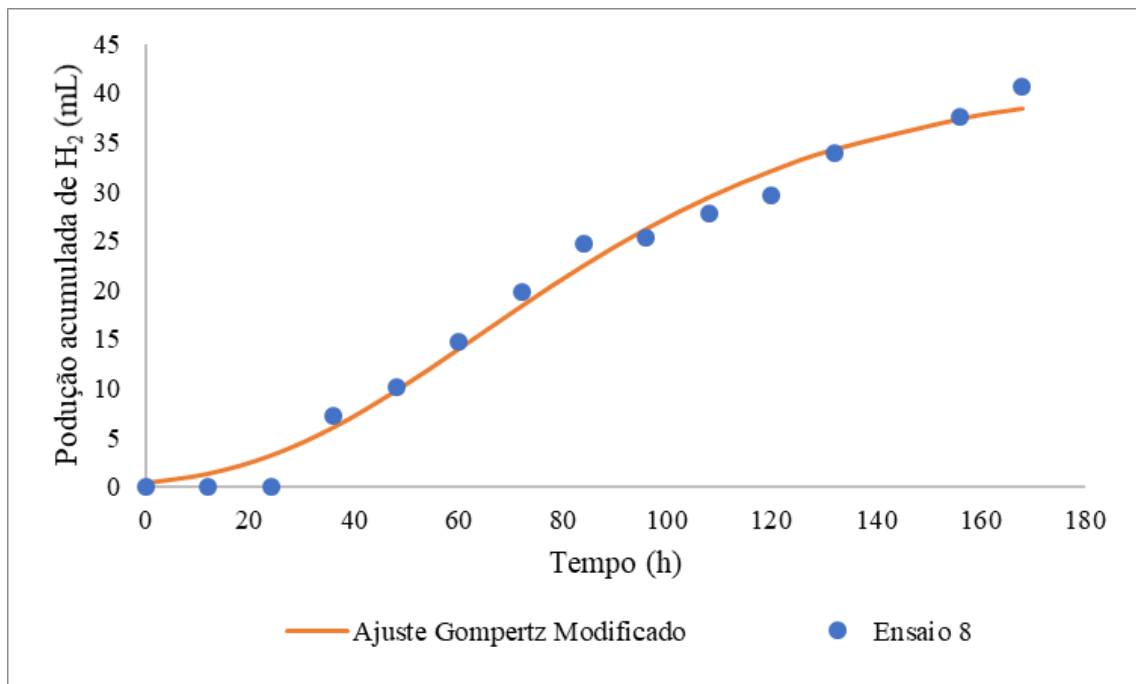
Fonte: AUTORA, 2020.

Figura 15 – Ensaio 7 (ajuste de Gompertz Modificado).



Fonte: AUTORA, 2020.

Figura 16 – Ensaio 8 (ajuste de Gompertz Modificado).



Fonte: AUTORA, 2020.