

LUANA CARDOSO GRANGEIRO

Estudo do crescimento e controle de biomassa na produção de biohidrogênio a partir da fermentação escura de vinhaça de cana-de-açúcar usando reatores contínuos de tubos múltiplos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como requisito para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadores:

Prof^a Dr^a Kelly J. Dussán Medina

Prof^o Dr^o Marcelo Zaiat

Araraquara

2022

G757e

Grangeiro, Luana Cardoso

Estudo do crescimento e controle de biomassa na produção de biohidrogênio a partir da fermentação escura de vinhaça de cana-de-açúcar usando reatores contínuos de tubos múltiplos / Luana Cardoso Grangeiro. -- Araraquara, 2022
177 f.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química, Araraquara

Orientadora: Kelly Johana Dussán Medina

Coorientador: Marcelo Zaiat

1. Fermentação. 2. Biomassa. 3. Biorreatores. 4. Cana-de-açúcar. 5. Hidrogênio. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Estudo do crescimento e controle de biomassa na produção de biohidrogênio a partir da fermentação escura de vinhaça de cana-de-açúcar usando reatores contínuos de tubos múltiplos"

AUTORA: LUANA CARDOSO GRANGEIRO

ORIENTADORA: KELLY JOHANA DUSSAN MEDINA

COORDENADOR: MARCELO ZAIAT

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:

Kelly Johana Dussan M.

Profa. Dra. KELLY JOHANA DUSSAN MEDINA (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia, Física e Matemática / Instituto de Química - UNESP – Araraquara

Arnaldo Sarti

Prof. Dr. ARNALDO SARTI (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia, Física e Matemática / Instituto de Química - UNESP – Araraquara

Loirena Oliveira Pires

Prof.^a Dr.^a LORENA OLIVEIRA PIRES (Participação Virtual)
~~Departamento de Engenharia, Física e Matemática / Instituto de Química - UNESP – Araraquara~~

[Signature]
Prof. Dr. LUCAS TADEU FUESS (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia Química / Escola Politécnica - USP - São Paulo

Ana Paula Trevisan

Dr.^a ANA PAULA TREVISAN (Participação Virtual)
Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE - Toledo

Araraquara, 27 de maio de 2022

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Luana Cardoso Grangeiro

Nome em citações bibliográficas: Grangeiro, L. C.; Grangeiro, Luana Cardoso; Grangeiro, Luana

ENDEREÇO PROFISSIONAL: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP Campus de Araraquara, Instituto de Química de Araraquara: Rua Prof. Francisco Degni, n. 55, Bairro Quitandinha, CEP: 14800-060 Araraquara/ SP Brasil.

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2017-2022: Doutorado em Biotecnologia

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP Araraquara, Brasil.

Título: Estudo do crescimento e controle de biomassa na produção de biohidrogênio a partir da fermentação escura de vinhaça de cana-de-açúcar usando reatores contínuos de tubos múltiplos

Orientadora: Kelly Johana Dussán Medina

Coorientador: Marcelo Zaiat

Bolsista do Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.

2014-2016: Mestrado em Engenharia Química.

Universidade Federal do Pará, UFPA, Brasil.

Título: Avaliação da capacidade biolixiviante de um minério de ouro do Estado do Pará por *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Orientador: Kleber Bittencourt Oliveira

Coorientadora: Denise Bevilaqua

Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Grande Área: Engenharias

2008 – 2014: Graduação em Engenharia Química

Universidade Federal do Pará, UFPA, Brasil.

Com período sanduíche em Instituto Superior Técnico – Lisboa, Portugal

Título: *Preparation, characterization and performance of chromatographic membrane with phenylboronate ligands for the biomolecules purification.*

Orientador: Marília Clemente Velez Mateus

Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Capítulos de livros:

- **Grangeiro, L. C.**; de Almeida, S. G. C.; Mello, B. S.; Fuess, L. T.; Sarti, A.; Dussán, K. J. New trends in biogas production and utilization. In: Mahendra Rai; Avinash P. Ingle. (Org.). Sustainable Bioenergy. 1ed. Amsterdã: Elsevier, 2019, v. 1, p. 199-223. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817654-2.00007-1>.
- Rodrigues, B.C.G., de Mello, B.S., **Grangeiro, L.C.**, Sarti, A., Dussán, K.J. Microbial degradation in the biogas production of value-added compounds. Recent Advances in Microbial Degradation. 2021. DOI: 10.1007/978-981-16-0518-5_3

Artigo publicado

- Silva, D. D.V.; Dussán, K. J.; Idarraga, A.; **Grangeiro, L.**; Silva, S. S.; Cardona, C. A.; Quintero, J.; Felipe, M.G.A. Production and purification of xylitol by *Scheffersomyces amazonenses* via sugarcane hemicellulosic hydrolysate. Biofuels, Bioproducts & Biorefining-Biofpr, v. 14, p. 344-356, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/bbb.2085>

Participação em eventos científicos

Apresentação de trabalho

- **Luana Cardoso Grangeiro**; Marcelo Zaiat; Kelly Johana Dussán Medina. New proposal of reactor configuration for biohydrogen production from Brazilian sugarcane vinasse. In: **7th Brazilian Biotech Congress and 2nd Biotech Ibero-**

American Congress. November 18-21, 2018. Brasília, Brazil. Poster presentation.

- **Luana Cardoso Grangeiro**, Lucas Tadeu Fuess, Marcelo Zaiat, Kelly Johana Dussán Medina. Avaliação de reatores tubulares para a produção de biohidrogênio a partir de água sintética (sacarose). Em: **1º Congresso da Associação Brasileira do Hidrogênio**. 07 e 08 de novembro, 2019. Rio de Janeiro, Brasil. Apresentação de Pôster.
- Ana Paula Trevisan, Eduardo B. Lied, Willyan G. de Souza, Kauanna U. Devens, Tamiris U. Tonello, Giovane Biasotto, Luana C. L. Rossi, José R. Fernandes, **Luana Cardoso Grangeiro**, Simone D. Gomes. Efeito da carga orgânica e TDH na produção de biohidrogênio. Em: **1º Congresso da Associação Brasileira do Hidrogênio**. 07 e 08 de novembro, 2019. Rio de Janeiro, Brasil. Apresentação de Pôster.
- Willyan G. de Souza, Ana Paula Trevisan, Tamiris U. Tonello, **Luana Cardoso Grangeiro**, Simone D. Gomes. Diferença de inóculos na produção de biohidrogênio com efluente de fecularia de mandioca em RCTM. Em: **1º Congresso da Associação Brasileira do Hidrogênio**. 07 e 08 de novembro, 2019. Rio de Janeiro, Brasil. Apresentação de Pôster.
- Kauanna U. Devens, Ana Paula Trevisan, Tamiris U. Tonello, Giovane Biasotto, Luana C. L. Rossi, José R. F. Santos, Eduardo B. Lied, **Luana Cardoso Grangeiro**, Simone D. Gomes. Produção de H₂ e CH₄ em reator AnSBBR alimentado com efluente de mandioca. Em: **1º Congresso da Associação Brasileira do Hidrogênio**. 07 e 08 de novembro, 2019. Rio de Janeiro, Brasil. Apresentação de Pôster.

Trabalhos completos publicados em anais

- **Grangeiro, L.C.**; Fuess, L.T; Zaiat, M.; Dussán, K. J. Avaliação de reatores contínuos tubulares para a produção de biohidrogênio a partir de água sintética com base sacarose. Em: III Seminário do Projeto Temático FAPESP, 2019, São

Carlos. Anais do III Seminário do Projeto Temático FAPESP "Aplicação do conceito de biorrefinaria a estações de tratamento biológico de águas residuárias", 2019. v. 1. p. 193-201.

- **Grangeiro, L.C.**; Fuess, L.T; Zaiat, M.; Dussán, K. J. Avaliação de reatores contínuos tubulares para a produção de biohidrogênio a partir de vinhaça de cana-de-açúcar. Em: IV Seminário do Projeto Temático FAPESP, 2020, São Carlos.
- Braga, A. F. M.; **Grangeiro, L.C.**; Fermoso, F. G.; Zaiat, M. Precipitação química de SO_4^{2-} com BaCl_2 : estratégia de aumento da produção de CH_4 a partir da vinhaça. Em: IV Seminário do Projeto Temático FAPESP, 2020, São Carlos.

Outros

- Participação no 1º Workshop de Empreendedorismo realizado no Instituto de Química –UNESP Araraquara, no dia 18 de junho de 2018, com duração de 3 horas.
- Coorientação do aluno bolsista PIBIC-Junior (ENSINO_MEDIO_CNPQ - Ensino Médio) Raphael Felix Toledo Mendes. Projeto intitulado: Obtenção de lignina de biomassa de cana-de-açúcar visando a produção de energia, 2018.
- Participação no evento científico intitulado "One-day Workshop on metal recovery from mining waters and electronic waste and energy and material recovery from agro-industrial waste" realizado na Escola de Engenharia – USP, São Carlos, no dia 10 de Julho de 2019.
- Participação como avaliadora de trabalhos na 4ª Semana de Engenharia Química a ser realizada no Instituto de Química –UNESP Araraquara, nos dias 13 a 16 de agosto, 2019.

Dedico esta tese de doutorado a mim!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por segurar a minha mão e ser a força que eu precisava em cada etapa da construção desta tese, assim como em cada etapa da minha vida. Obrigada Senhor por eu chegar até aqui com fé, esperança e amor.

Agradeço a mim! Sim, à Luana que a cada dia é construída dentro de mim. O doutorado acabou, mas continuo a minha jornada como profissional e pessoa. Agradeço a mim por ter a paciência e a resiliência de permanecer estudando e lutando pela otimização do meu processo! Por não ter desistido e por estar hoje escrevendo esta tese!

Agradeço a minha família. Nossa, como eu amo vocês e sou feliz por ter vocês como família! Meus pais Marcos e Dete, meus maiores incentivadores para eu ser a primeira doutora da família, como eles falam para todos que encontram! Obrigada por compreenderem a minha saída de casa e a minha ausência em tantos momentos para lutar por esse sonho que hoje se torna realidade! Sem o apoio de vocês, sem dúvida, eu não estaria aqui! Obrigada por terem me criado e me instruído a seguir sempre o caminho da honra, da gratidão e do amor. Amo tanto vocês, meus velhinhos lindos! Meus irmãos gordinhos Maykson e Luciana, vocês são os meus primeiros e melhores amigos da vida! Como eu sinto a falta de vocês todos os dias. Tenho orgulho de ver os adultos que nos tornamos. Obrigada por entenderem a minha ausência nos aniversários, formaturas, natais, em todos os grandes momentos de comemoração, por escutarem o que eu fazia no laboratório e por todas as vezes que assistiram com paciência as minhas apresentações/seminários. Minha cunhada Ingrid e minha sobrinha Ana Clara, vocês são tão importantes para mim! Obrigada por chegarem em nossa família e trazer tanta alegria! Obrigada por entenderem que eu era a cunhada e tia distante porque estava em São Paulo fazendo o doutorado. Amo todos vocês! Sem o apoio diário de vocês, eu teria voltado para casa rapidinho!

Agradeço aos meus pastores Marcelo e Vanessa. Obrigada por me acolherem em sua casa, me alimentarem e me ajudarem nesta caminhada. Obrigada por todos os conselhos e por me lembrar que eu deveria fazer o meu doutorado com amor e excelência!

Agradeço a minha orientadora e mentora, Dra Kelly Dússan Medina. Nossa, quanta coisa vivemos ao longo destes anos. Quantas reuniões, encontros de grupo, discussões de vários temas e alinhamentos. Como falamos na primeira conversa: o doutorado é como um casamento, por isso precisamos entender de verdade o que queremos! Hoje entendo cada orientação, hoje mais madura, quero dizer o quanto você me ajudou, investiu tempo e dinheiro, lutou junto comigo para o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada por tudo! Conseguimos!!!

Agradeço aos meus orientadores Dr. Lucas Fuess e Prof. Dr. Marcelo Zaiat pelo apoio e conhecimento compartilhado. Obrigada pela paciência e acolhimento no Laboratório de Processos Biológicos - LPB. Trabalhar na mesma equipe que vocês foi uma oportunidade incrível de aperfeiçoamento profissional e também pessoal!

Agradeço a todos os amigos maravilhosos que fiz ao longo deste doutorado! Não irei citar nomes porque com certeza vou esquecer alguém, e meu objetivo é demonstrar a minha gratidão sincera por cada pessoa que conheci e convivi neste período de pós-graduação na cidade de São Carlos e Araraquara. Foram 5 anos, conheci muitas pessoas incríveis, outras não tão incríveis assim e sim, fiz muitas amizades!!! Por isso agradeço aos amigos da igreja, amigos nacionais e internacionais, as técnicas do laboratório, aos pós doutorandos, alunos de mestrado e doutorado, professores, aos funcionários da universidade. Eu só consegui desenvolver o meu doutorado porque eu não trabalhei sozinha! Eu tive ajuda de amigos incríveis! *Amo vocês! Love you! Te quiero! Saranghe!*

Quero agradecer a minha primeira casa, a Universidade Federal do Pará, por ter me dado todas as oportunidades que eu precisava para ser a engenheira química que eu sou. Agradeço a Universidade Estadual Paulista e a Universidade de São Paulo, minhas segundas casas ao mesmo tempo, lugares onde validei conhecimentos, construí novos e reformulei alguns. Ainda, agradeço a CAPES e FAPESP, pela concessão da bolsa de estudos e recursos para desenvolver a minha pesquisa de doutorado.

Ah, não podia deixar de agradecer aos meus reatores e bactérias que me fizeram companhia de dia, de tarde e noite, durante a semana e finais de semana! Eu passei

mais tempo com vocês do que com seres humanos nos últimos anos! Só nós sabemos o que compartilhamos, jamais esquecerei! Foi difícil me despedir de vocês, mas a nossa relação foi boa e agradeço por toda a nossa convivência. Afinal, sem vocês, literalmente, eu não teria os resultados da tese!

E claro, sou muito grata a todas as xícaras de café que tomei! Meu querido café, companheiro de escrita e experimentos de dia, de tarde, de noite e de madrugada! Obrigada por me manter acordada sempre que precisei!

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior - Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

“Muito dos fracassos da vida acontecem porque as pessoas não percebem quão próximas estavam do sucesso no momento em que desistiram.”

Thomas Edison

“Nunca, nunca, nunca desista! E nunca ceda, a não ser às convicções de honra e bom senso.”

Winston Churchill

RESUMO

Estudos mostram que a perda de desempenho em sistemas fermentativos após 20 dias de operação pode estar associada ao crescimento inadequado de microrganismos, resultando em excesso ou falta de biomassa nos reatores. O parâmetro que permite medir a relação alimento/microrganismo e consequentemente controlar a biomassa nos reatores é chamado de carga orgânica volumétrica específica (COVe). Desta forma, desenvolver um projeto de reator que permita o controle adequado da COVe pode ser um fator chave na produção de biohidrogênio (BioH₂) a longo prazo. Neste contexto, os reatores contínuos de tubos múltiplos (RCTMs) tem se destacado como uma tecnologia promissora devido à sua estrutura fornecer uma região de tubos para fixação da biomassa microbiana, sem utilização de material suporte e ainda permitir a manutenção da COVe, por meio do descarte contínuo da biomassa. Nesta sequência, o objetivo desta pesquisa foi estudar RCTMs com 10 (RCTM10) e 18 (RCTM18) tubos no controle de processo em função da COVe. Na primeira etapa, o RCTM18 foi operado sob condição mesofílica de temperatura (25°C), inoculado por processo de autofermentação e alimentado com água residuária sintética, à base de sacarose como fonte de carbono. Os resultados mostraram que o RCTM18 apresentou o controle adequado de COVe (3,3 – 6,33 gDQOg⁻¹SSV d⁻¹), porém apresentou baixo rendimento médio de hidrogênio (0,043 ± 0,006 molH₂.molCH₄⁻¹), com uma produção volumétrica máxima igual a 415,1 ± 422,1 mLH₂ L⁻¹d⁻¹, em faixa de operação de pH 4-5,5. Na segunda etapa, os RCTMs sob condições termofílicas de temperatura (55°C) foram inoculados por processo de autofermentação e alimentados com vinhaça de cana-de-açúcar, como fonte de carbono. O RCTM18 apresentou o melhor resultado no controle da COVe (2,0 - 8,0 gDQO.g⁻¹SSV.d⁻¹) em comparação com o RCTM10 (0,5 – 4,0 gDQO g⁻¹SSV d⁻¹), e semelhante a faixa ótima (2,0 - 7,0 gDQO.g⁻¹SSV.d⁻¹) encontrada na literatura. O RCTM18 (0,0006 ± 0,014 molH₂.gDDQO⁻¹) e o RCTM10 (0,0013 ± 0,003 molH₂.gDQO⁻¹) apresentaram rendimentos médios de hidrogênio quase nulos. Na terceira etapa, as biomassas acidogênicas dos RCTMs obtidas na operação contínua foram testadas em reatores em modo batelada, as quais produziram hidrogênio e ácidos orgânicos. A quarta e última etapa consistiu no estudo de biologia molecular para a quantificação de metabólitos e caracterização da microbiota, o qual apresentou valores de abundância relativa ao gênero *Clostridium* sensu stricto 7 (19,87%) no RCTM10 e *Bacillus* (18,32%) no RCTM18. Isto permitiu a discussão e fundamentação dos

resultados desta pesquisa, verificando que os RCTMs se mostraram configurações com potencial para o controle da COVe em meio sintético e vinhaça de cana-de-açúcar, sem a necessidade de descarte de biomassa ou material suporte para adesão dos microrganismos.

Palavras-chaves: Fermentação escura, biomassa microbiana, carga orgânica volumétrica específica, vinhaça de cana-de-açúcar.

ABSTRACT

Studies have shown that the loss of performance after 20 days of operation may be associated with factors such as inadequate growth of microorganisms (excess or lack of biomass in the reactors). The specific organic loading rate (SOLR) is the parameter that allows to measure the food/microorganism ratio and consequently control the biomass in the reactors. Thus, developing a reactor design that allows adequate control of the SOLR may be a key factor in long-term BioH₂ production. Based in this background, continuous multiple tube reactors (CMTRs) have stood out as a promising technology due to their structure providing a region of tubes for microbial biomass retention, without the use of support material and also allowing the maintenance of the SOLR, by continuous biomass disposal. Accordingly, the aim of this study was to evaluate the performance of two CMTRs with different number of tubes in controlling SOLR. At first step, the control reactor (CR) and the CMTR18 was operated under mesophilic temperature conditions (25°C), inoculated by a natural fermentation process and fed with synthetic wastewater based on sucrose as the carbon source. The results showed the CMTR18 presents the adequate SOLR control (3,3 – 6,33 gCDO g⁻¹SSV d⁻¹) but showed low yield of hydrogen (0,043 ± 0,006 molH₂.molCH⁻¹), maximum volumetric production equal 415,1 ± 422,1 mLH₂ L⁻¹d⁻¹, working in a range of pH 4-5,5. At second step, CMTRs with 10 and 18 tubes were operated under thermophilic temperature conditions (55°C), inoculated by a natural fermentation process and fed with sugarcane wastewater. The CMTR18 presented the best performance in the SOLR (2,0 - 8,0 gDQO.g⁻¹SSV.d⁻¹) relate to CMTR10 (0,5 – 4,0 gDQO g⁻¹SSV d⁻¹), and similar to the optimal SOLR control range found in the literature (2,0 - 7,0 gDQO.g⁻¹SSV.d⁻¹). CMTR18 (0,0006 ± 0,014 molH₂.gDDQO⁻¹) and CMTR10 (0,0013 ± 0,003 molH₂.gDQO⁻¹) have obtained average yields of hydrogen near zero. At third step, the acidogenic biomasses produced in the CMTRs were tested in batch mode reactors to check the hydrogen production potential of these biomasses. The final step consisted of the molecular biology study for the quantification of metabolites and characterization of the microbiota in strategic points of all operations, which presented values of relative abundance to the genus *Clostridium sensu stricto* 7 (19.87%) in CMTR and *Bacillus* (18.32%) in CMTR18. This allowed the discussion and substantiation of the results of this research, verifying that the CMTRs showed configurations with potential for the control of SOLr in synthetic medium and sugarcane

vinasse, without the need to discard biomass or support material for adhesion of microorganisms.

Keywords: Dark fermentation, biomass, specific organic loading rate, sugarcane vinasse.

Lista de Figuras

Figura 1. Processos biológicos dependentes e independentes de energia luminosa aplicados para a produção de hidrogênio.....	34
Figura 2. Sequências metabólicas e grupos microbianos envolvidos na digestão anaeróbia.	36
Figura 3. Fluxograma simplificado da produção de açúcar e etanol.....	50
Figura 4. Características construtivas do RCTM: A) dimensões do reator e B) ranhuras confeccionadas nas paredes internas dos tubos no formato rosca sem fim. Legenda: 1) saída de efluente, 2) tubos de PVC, 3) câmara de saída do efluente, 4) saída	
Características construtivas do RCTM com 12 tubos: A) dimensões do reator e B) ranhuras confeccionadas nas paredes internas dos tubos no formato rosca sem fim. Legenda: 1) saída de efluente, 2) tubos de PVC, 3) câmara de saída do efluente, 4) saída do biogás, 5) dreno do efluente.....	75
Figura 5. Fluxograma das etapas do processo de obtenção de hidrogênio: A) Operação com água sintética e B) Operação com vinhaça de cana-de-açúcar.....	80
Figura 6. Representação esquemática do aparato experimental utilizado. Legenda: 1 reservatório de afluente sintético; 2- bombas peristálticas, 3- RCTM, 4- medidores de gás, 5- sistema Arduino, (□) correntes líquidas, (--) correntes de biogás.	84
Figura 7. Detalhes do aparato experimental utilizado: A) Montagem dos reatores na câmara climatizada, B) Reservatório para alimentação dos reatores acidogênicos, C) Medidor tubo em U e sistema Arduino.....	85
Figura 8. Representação esquemática do aparato experimental utilizado. Legenda: 1 reservatório de vinhaça de cana-de-açúcar; 2- bombas dosadoras, 3- RCTM10, 4- RCTM 18, 5- medidores de gás, 6- sistema Arduino, (□) correntes líquidas, (--) correntes de biogás.....	89
Figura 9. Características construtivas A) RCTM10 e B) RCTM18.	90
Figura 10. Detalhes do aparato experimental utilizado: A) Montagem dos reatores na câmara climatizada, B) Reatores acidogênicos, C) Medidor tubo em U e sistema arduino.	91
Figura 11. Representação esquemática do sistema experimental em batelada.	94
Figura 12. Detalhes do sistema experimental dos reatores em batelada: A) Montagem dos reatores no shaker com agitação e temperatura, B) Inoculação dos reatores e C) Fluxionamento de nitrogênio para anaerobiose.	94
Figura 13. Fluxograma informativo de quantidades de amostras coletadas para realização de análise de biologia molecular.....	106
Figura 14. Produção de BioH ₂ : A) produção volumétrica de hidrogênio (PVH), B) rendimento de hidrogênio (HY), C) proporção de H ₂ e CO ₂ na composição de biogás. Legenda: A) PVH (-■-); HY (-□-), B) CO ₂ (-■-); H ₂ (-□-)	108
Figura 15. Monitoramento do RCTM18: A) pH, B) conversão de carboidrato total, C) redução DQOt.	116
Figura 16. Dinâmica da retenção e acúmulo de biomassa no RCTM18.	117
Figura 17. Metabólitos solúveis quantificados no RCTM18 ao longo da operação da fase acidogênica: A) perfil temporal de concentração de metabólitos e B) proporção de metabólitos Concentração e distribuição de ácidos.	125
Figura 18. Produção de BioH ₂ nos RCTMs: A) Produção volumétrica de hidrogênio (PVH). B) rendimento de hidrogênio (HY) na operação dos RCTMs com vinhaça de cana de açúcar.....	127
Figura 19. Composição de biogás nos reatores acidogênicos: A) composição de biogás no RCTM10 e B) composição de biogás no RCTM18.....	129

Figura 20. Monitoramento dos reatores acidogênicos em relação: A) pH, B) consumo do carboidrato total, C) consumo de glicerol e D) DQOt.....	132
Figura 21. Dinâmica da retenção e acúmulo de biomassa nos reatores acidogênicos.	135
Figura 22. Metabólitos solúveis quantificados no RCTM10 ao longo da operação da fase acidogênica: A) perfil temporal de concentração de metabólitos e B) proporção de metabólitos.	142
Figura 23. Metabólitos solúveis quantificados no RCTM18 ao longo da operação da fase acidogênica: A) perfil temporal de concentração de metabólitos e B) proporção de metabólitos.	143
Figura 24. Perfil de produção de H ₂ em mols ao longo da operação em batelada. .	146
Figura 25. Representação filogenética da comunidade microbiana nas amostras obtidas durante: A) início da operação contínua dos RCTMs e B) final da operação em batelada, baseando-se no 16S RNAr (região V4).....	148
Figura 26. Composição microbiana no nível gênero das amostras obtidas durante: A) início da operação contínua dos RCTMs e B) final da operação em batelada, baseando-se no 16S RNAr (região V4).	149
Figura 27. Balanço de massa global da fase acidogênica RCTM10. Cálculos em relação à DQOs efluente; Cálculos em relação à DQOt afluente.....	154
Figura 28. Balanço de massa global da fase acidogênica RCTM18. Cálculos em relação à DQOs efluente; Cálculos em relação à DQOt afluente.....	154

Lista de Tabelas

Tabela 1. Reações envolvidas na fermentação escura.	42
Tabela 2. Resumo de valores de COVe em que ocorreu produção de H ₂	61
Tabela 3. Apresentação de trabalhos dos últimos 20 anos sobre as principais configurações dos reatores utilizados na produção de hidrogênio.	68
Tabela 4. Solução de micronutrientes (água residuária sintética).	81
Tabela 5. Caracterização físico-química das amostras de vinhaça de cana-de-açúcar coletadas na safra de 2019 para alimentar os reatores.	86
Tabela 6. Resumo das dimensões dos reatores RCTM10 e RCTM18.	88
Tabela 7. Resumo das condições operacionais da operação com os RCTMs.	92
Tabela 8. Condições operacionais do reator em batelada com biomassa obtida do RCTM10.	95
Tabela 9. Condições operacionais para o reator em batelada com biomassa obtida do RCTM18.	95
Tabela 10. Análises e metodologias utilizadas para o monitoramento dos reatores acidogênicos.	96
Tabela 11. Fatores de equivalência aplicados no balanço de massa.	105
Tabela 12. Desempenho do RCTM18 no ensaio realizado com água sintética.	112
Tabela 13. Balanço de biomassa no RCTM18 com TDH de 4h.	119
Tabela 14. Resultados principais de metabolitos produzidos.	124
Tabela 15. Balanço de biomassa dos reatores.	139
Tabela 16. Balanço de massa da fase solúvel e balanço de massa global calculados para a fase acidogênica do RCTM18.	153
Tabela 17. Balanço de massa da fase solúvel e balanço de massa global calculados para a fase acidogênica do RCTM10.	153

Lista de abreviaturas e siglas

AFBR: reator anaeróbio de leito fluidizado (*anaerobic fluidized-bed reactor*)
APBR: reator de leito fixo empacotado (*anaerobic packed-bed reactor*)
ASBR: reator anaeróbio em bateladas sequenciais (*anaerobic sequencing batch reactor*)
ASTBR: reator anaeróbio de leito estruturado (*anaerobic structured-bed reactor*)
 $C_{12}H_{22}O_{11}$: sacarose
 CH_4 : metano
 CO_2 : dióxido de carbono, gás carbônico
COVa: carga orgânica volumétrica aplicada
COVe: carga orgânica volumétrica específica
CSTR: reator anaeróbio continuamente agitado (*continuously stirred-tank reactor*)
DQOt: demanda química de oxigênio total
EC_{SAC}: eficiência de conversão de sacarose
EGSB: reator de leito expandido granular (*expanded granular sludge-bed reactor*)
ER_{DQO}: eficiência de remoção de DQO
EtOH: etanol
 H_2 : hidrogênio molecular
 H_2O : água
HAc: ácido acético
HBu: ácido butírico
HLa: ácido láctico
HPr: ácido propiônico
HY: rendimento de hidrogênio
 N_2 : nitrogênio molecular
PVH: produção volumétrica de hidrogênio
RCTM: reator contínuo de tubos múltiplos (*continuous multiple tube reactor*)
RCTM10: reator contínuo de tubos múltiplos com 10 tubos
RCTM18: reator contínuo de tubos múltiplos com 18 tubos
SSV: Sólidos suspensos voláteis
T: temperatura,
TCD: detector de condutividade térmica (*termal conductivity detector*)
TDH: tempo de detenção hidráulica
TRS: tempo de retenção de sólidos

UASB: reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (*upflow anaerobic sludge blanket reactor*)

VBG: vazão de biogás

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO E MOTIVAÇÃO DO PROJETO	23
2.	HIPÓTESE E OBJETIVOS.....	26
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
3.1.	Transição energética mundial	28
3.2.	Energia renovável, meio ambiente e políticas.....	29
3.3.	Hidrogênio: o carreador de energia do futuro	31
3.4.	Processos de produção de hidrogênio.....	32
3.5.	Processos biológicos	33
3.6.	Digestão anaeróbia.....	35
3.6.1.	<i>Fermentação escura: fundamentos</i>	37
3.7.	Interferentes do processo	41
3.7.1.	<i>Tempo de detenção hidráulica – TDH</i>	43
3.7.2.	<i>Potencial hidrogeniônico – pH</i>	44
3.7.3.	<i>Temperatura</i>	45
3.7.4.	<i>Substratos</i>	47
3.7.5.	<i>Inóculo e pré-tratamento</i>	53
3.7.6.	<i>Carga orgânica volumétrica - COVa</i>	55
3.7.7.	<i>Carga orgânica volumétrica específica – COVe</i>	57
3.7.8.	<i>Configuração de reatores</i>	64
3.8.	Reatores contínuos de tubos múltiplos	73
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	79
4.1.	Instalação e organização dos experimentos	79
4.2.	Metodologia aplicada para a operação com água sintética	81
4.2.1.	<i>Substrato sintético</i>	81
4.2.2.	<i>Inóculo</i>	82
4.2.3.	<i>Montagem e operação dos reatores acidogênicos</i>	82

4.3.	Metodologia aplicada para a operação com a vinhaça de cana-de-açúcar	85
4.3.1.	<i>Origem, coleta e caracterização da vinhaça</i>	85
4.3.2.	<i>Inóculo</i>	87
4.3.3.	<i>Montagem e operação dos reatores acidogênicos</i>	87
4.4.	Metodologia aplicada para a operação com reatores em modo batelada.	92
4.5.	Avaliação e monitoramento dos reatores acidogênicos	95
4.6.	Principais equações utilizadas para verificação do desempenho dos reatores	98
4.7.	Cálculo da Carga Orgânica Volumétrica Específica (COVe)	100
4.8.	Balanço de massa	103
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	107
5.1.	Desempenho do RCTM18: água sintética	107
5.1.1.	<i>Produção e Rendimento de hidrogênio</i>	107
5.1.2.	<i>Conversão de substratos e pH</i>	113
5.1.3.	<i>Produção de biomassa e dinâmica da COVe</i>	117
5.1.4.	<i>Produção de metabólitos secundários para RCTM18 com água sintética</i>	122
5.2.	Desempenho dos RCTM10 e RCTM18: vinhaça de cana-de-açúcar	126
5.2.1.	<i>Produção e rendimento de H₂</i>	126
5.2.2.	<i>Conversão de substratos e pH</i>	130
5.2.3.	<i>Produção e dinâmica da COVe</i>	134
5.2.4.	<i>Produção de metabólitos secundários</i>	139
5.3.	Desempenho dos reatores em batelada	145
5.4.	Estrutura e dinâmica microbiana nos reatores acidogênicos	146
5.5.	Balanço de massa: fração solúvel e global	151
6.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	155
7.	REFERÊNCIAS	158

1. INTRODUÇÃO E MOTIVAÇÃO DO PROJETO

A ciência está conectada com todas as transformações mundiais, sejam transformações econômicas, políticas, industriais, energéticas, etc. Projetos e pesquisas são desenvolvidos para buscar soluções às problemáticas que tem impactado cidades, países, mundo. Desta forma, esta pesquisa foi motivada em uma das temáticas mais discutidas nos últimos anos: a transição energética.

A transição na matriz energética mundial tem sido discutida por organizações como o Conselho Mundial de Energia, a Organizações das Nações Unidas, e pode ser entendida como a transformação da matriz energética mundial. Esta transformação significa mudar a fonte de geração de energia, isto é, ao invés de utilizar fontes não renováveis como os combustíveis fósseis (petróleo, carvão e gás natural) para gerar energia, passa-se a utilizar fontes renováveis como a solar fotovoltaica, eólica, biomassa, geotérmica, hidrogênio, entre outras. Uma das principais motivações desta transição é a proteção de vida no planeta e do meio ambiente, consequentemente a conservação de recursos naturais, combate às mudanças climáticas e desenvolvimento de práticas de produção e consumo mais sustentáveis. No entanto, esta transição não é simples, envolve alterações nos setores de ciência e tecnologia, pesquisa, economia, meio ambiente, política, ainda, engloba desafios e entendimento de conceitos importantes como economia circular, sustentabilidade, indústria 4.0, descarbonização, entre outros.

Considerando este cenário de transição e desafios, trabalhos científicos têm procurado tecnologias alternativas para a geração de energia com o uso de fontes renováveis, com objetivo de contribuir para a redução dos impactos ambientais como a emissão de gases poluentes na atmosfera. Assim, as tecnologias de produção do hidrogênio (H_2) tem se destacado como potenciais sucessoras aos combustíveis fósseis. Isto porque o H_2 é visto como carreador de energia do futuro por ser destacar como o elemento mais abundante no universo, e ainda ser considerado um combustível com alto valor energético em relação aos combustíveis convencionais (poder calorífico do H_2 = $28.642 \text{ kcal kg}^{-1}$; Gasolina = $11.00 \text{ kcal kg}^{-1}$), além de gerar apenas vapor d'água como subproduto após combustão (PARSAEE et al., 2019; CASTELLÓ et al., 2020).

Nos últimos anos, os processos biológicos têm se destacado como tecnologias alternativas para a geração de H_2 , a partir de resíduos e subprodutos provenientes de

diferentes setores industriais. Além de promover a utilização de fontes de energia renováveis, os processos biológicos representam economia com etapas de tratamento de resíduos uma vez que estes processos promovem o reaproveitamento de resíduos gerando um valor agregado a estes materiais que, na maioria das vezes, são apenas descartados. Um exemplo de substrato utilizado em pesquisas brasileiras de produção biológica de H_2 , é a vinhaça de cana-de-açúcar. Esta água residuária é utilizada por apresentar elevada quantidade de matéria orgânica biodegradável a qual serve como substrato (alimento) para microrganismos (FUESS & GARCIA, 2014; MORAES et al., 2014). Além disso, é um subproduto abundante no Brasil (Estado de São Paulo), o qual é obtido na etapa de destilação da produção de etanol, em que cada litro de etanol gera em torno de 10 a 15 litros de vinhaça (PARSAEE et al, 2019; MILANEZ et al., 2018; CONAB, 2020).

Dentre os processos biológicos, o processo de fermentação escura (acidogênese) vem sendo abordada pela literatura em diferentes configurações de reatores contínuos e também em modo batelada. Diversos artigos abordam que o rendimento da produção de H_2 em reatores anaeróbios usando vinhaça de cana-de-açúcar, por exemplo, ainda é baixo ($< 2 \text{ molH}_2 \text{ molcarboidrato}^{-1}$) quando comparado com os rendimentos de processos e tecnologias convencionais de H_2 como: eletrólise da água, reforma de CH_4 , gaseificação do carvão, entre outros, porém estes processos consomem elevadas quantidades de energia de origem fóssil (GHIMIRE et al., 2015; PARSAEE et al., 2019).

De uma forma geral, a justificativa para os baixos rendimentos na fermentação escura (acidogênese) associa-se a diversos fatores como o tipo de configuração do reator utilizado, tipo de suporte, retenção de biomassa dentro do reator, otimização e controle de parâmetros operacionais, como por exemplo, o tempo de detenção hidráulica (TDH), tipos e concentração de substrato, pH, temperatura, pressão parcial e aplicação de sub ou sobrecargas de matérias orgânicas (substratos) (FUESS et al., 2016; CASTELLÓ et al., 2020). Além disso, a produção de $BioH_2$ está associada à produção de metabólitos secundários como ácidos orgânicos voláteis e solventes, assim o tipo de biomassa envolvida no processo e as condições operacionais aplicadas na adesão desta biomassa pode influenciar na definição de rotas metabólicas favoráveis ou desfavoráveis a produção de hidrogênio (ANZOLA-ROJAS et al., 2015).

Em todo este contexto, vários estudos destacam que a escolha bem-sucedida do reator no processo de produção de bioenergia envolvendo águas residuárias está relacionada, principalmente, com a retenção de biomassa adequada dentro do reator. Várias configurações novas e/ou modificadas tem sido estudadas visando melhorar o crescimento de biomassa, por exemplo, reatores com células suspensas, células aderidas, sistemas de leitos fixos, ou ainda as combinações deles (LETTINGA et al., 1980; BAL & DHAGAT, 2001; CHERNICHARO et al., 2015; LEITE et al., 2008; GOMES et al., 2015; GOMES et al., 2016; CORBARI et al., 2019; FUESS et al., 2017, 2019, 2021; OLIVEIRA et al., 2020).

Em resumo, a chave para a produção contínua e estável de hidrogênio pode ser o controle da carga orgânica volumétrica específica (COVe), a qual representa a relação alimento/microrganismo, ou seja, a quantidade de substrato disponível por microrganismo. O controle deste parâmetro permite controlar a retenção de biomassa dentro do reator. De acordo com Anzola-Rojas (2015), a COVe representa um fator significativo na produção contínua e estável de hidrogênio, pois observa-se que baixos valores de COVe, ou seja, excesso de microrganismo em relação ao alimento podem causar influência direta na conversão do substrato e mudanças nas rotas metabólicas dos microrganismos.

Desta forma, a configuração de reator contínuo de tubos múltiplos (RCTM) destaca-se como uma proposta de unidade de trabalho para o controle de processo em função de COVe, na produção de H_2 sem material suporte. Esta configuração de reator, apresentada por Gomes et. al. (2015), tem uma estrutura que fornece uma área de superfície maior para a fixação de sólidos em comparação com reatores tubulares convencionais sem material suporte, já que a região de reação é formada por um grupo de tubos paralelos de pequeno diâmetro com ranhuras internas. Tem como diferencial a descarga contínua da biomassa devido não apresentar material suporte, assim, facilitando o arraste de biomassa ao longo da operação. Ainda, pode evitar o acúmulo de biomassa e auxiliar na manutenção da carga orgânica volumétrica específica (COVe) (GOMES et al., 2015; 2016).

O desempenho de RCTMS na produção de hidrogênio é discutido em poucos trabalhos na literatura. Alguns fatores investigados até agora foram: tempo de detenção hidráulica (TDH), material suporte na câmara de saída, diferentes concentrações do meio sintético em termos de DQO (demanda química de oxigênio), estratégias de alimentação (GOMES et. al., 2015; 2016) e o acúmulo e adesão de

biomassa no interior destes reatores (GOMES et al., 2015; 2016; TREVISAN et al., 2019). Estas publicações reportam testes de RCTM com 12 tubos na produção de biohidrogênio a partir de água residuária sintética com base sacarose e a partir de água residuária real (processo de mandioca), ainda relacionam dados de acúmulo de biomassa no interior do reator através do controle de COVe. Em geral, os testes de operação com as características construtivas originais dos RCTMs foram caracterizados por instabilidade no início de produção, com rendimentos máximos observados que não superaram $0,6 \text{ molH}_2.\text{molCH}^{-1}$. Logo, ainda é necessário propor e realizar pesquisas científicas a nível de bancada para testar esta configuração e verificar, por exemplo, se o aumento de número de tubos pode influenciar a produção de biohidrogênio uma vez que ocasiona alteração da área superficial do reator e isto pode permitir ou não mais espaço para a adesão de biomassa. Ainda, se as ranhuras nos interiores dos tubos maximizam a retenção de biomassa.

Diante deste cenário, a proposta deste trabalho foi avaliar o desempenho dos RCTMs, modificados em números de tubos e ranhuras internas, como unidades de controle de processo, em função da COVe relacionada à produção de H_2 em um sistema termofílico alimentado com vinhaça de cana-de-açúcar. As configurações de RCTMs modificadas com 12 e 18 tubos nunca foram testadas para produção de BioH_2 a partir de vinhaça de cana-de-açúcar e nem em processo anaeróbio termofílico.

2. HIPÓTESE E OBJETIVOS

O desenvolvimento desta pesquisa baseou-se na ideia central de que, embora a acidogênese da vinhaça seja um processo consideravelmente explorado nos últimos 10 anos, ainda existem limitações referentes às configurações de reatores comumente usadas, principalmente devido ao crescimento e aderência de microrganismos nestas tecnologias, isto é, no controle adequado da relação alimento/microrganismo dentro do reator para um crescimento adequado de biomassa. Por isso, o objetivo principal deste trabalho focou no estudo tecnológico de RCTMs, um com 10 tubos (RCTM10) e outro com 18 tubos (RCTM18), com volumes finais próximos de 2L, no controle do parâmetro operacional carga orgânica volumétrica específica (COVe), ao longo do processo de produção de biohidrogênio a partir de uma água residuária complexa (vinhaça de cana-de-açúcar), na presença de culturas mistas de microrganismos anaeróbios termofílicos.

Para atingir o objetivo principal foram formulados os seguintes objetivos específicos:

- Objetivo específico 1: Avaliar experimentalmente o controle da COVe no RCTM18 em relação ao tempo de detenção hidráulica (TDH, 4 horas) e a concentração de substrato, para a produção de BioH₂, a partir de água residuária sintética na presença de culturas mistas de microrganismos anaeróbios mesofílicos;
- Objetivo específico 2: Avaliar experimentalmente o controle da COVe nos RCTMs aplicando três diferentes TDHs e COVas, no processo de produção de BioH₂ utilizando a vinhaça de cana-de-açúcar na presença de culturas mistas de microrganismos anaeróbios termofílicos;
- Objetivo específico 3: Avaliar experimentalmente os metabólitos secundários produzidos durante o processo de obtenção de biohidrogênio;
- Objetivo específico 4: Avaliar experimentalmente em reatores em batelada o potencial de produção de hidrogênio das biomassas acidificadas provenientes dos RCTMs operados em condições termofílicas;
- Objetivo específico 5: Caracterizar o consorcio microbiano presente em pontos estratégicos do processo de obtenção de biohidrogênio em operação contínua e em batelada.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O presente capítulo apresenta informações consultadas na literatura, consideradas fundamentais para a contextualização e o entendimento dos assuntos abordados neste projeto de doutorado, atuando como base para a discussão, validação e conclusão dos resultados obtidos em todas as etapas experimentais. Portanto, a revisão bibliográfica inclui:

- i. Contextualização e importância do hidrogênio na transição de matriz energética mundial e nacional, bem como a apresentação dos principais processos de produção de hidrogênio e a relação com o meio ambiente;
- ii. Conceitos e fundamentos da produção de etanol e a aplicação da vinhaça de cana-de-açúcar como substrato em processos biológicos;
- iii. Conceitos e fundamentos da digestão anaeróbia, destacando a etapa de acidogênese (fermentação escura) na produção de H₂ e metabólitos secundários, e as rotas metabólicas envolvidas neste processo;

- iv. Parâmetros que exercem influência na produção de H_2 , com destaque para COVe, pH e substratos;
- v. Conceitos sobre os diferentes tipos de configurações de reatores e suas relações com estabilidade e rendimento de produção.

3.1. Transição energética mundial

Estudos mostram que nos últimos 30 anos, um dos assuntos mais discutidos é a necessidade de transição energética, isto é, a necessidade de mudança nos modelos de produção e consumo de energia que movem o mundo na era pós-revolução industrial. Isto porque os modelos atuais têm afetado, principalmente o ambiente, com poluição do ar, poluição de rios, mares e oceanos, entre outros. (INGRAO et al., 2018). Neste cenário, ações e políticas tem surgido para incentivar o consumo de energias renováveis e o aproveitamento de resíduos para esse fim. Um exemplo é a Agenda das Nações Unidas a qual apresenta os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS). Estes objetivos visam o desenvolvimento de ações que ajudem a combater as alterações climáticas e garantir o acesso universal à energia limpa e ao ar. Além disso, envolvem a preocupação da segurança energética, segurança alimentar e a redução dos resíduos eliminados no ambiente (BIJARCHIYAN et al., 2020; HOLM-NIELSEN et al., 2009). No entanto, sabe-se que nenhum processo de transição é rápido, demanda tempo, principalmente, quando envolve vários setores, como é o caso da transição energética, a qual está conectada com setores de economia, meio ambiente, ciência e tecnologia, dentro de um país.

No contexto de transição de energia, em que se considera o reaproveitamento de resíduos industriais, a transformação de “lixos orgânicos” em energia renovável pode ser um caminho com oportunidades de produção e modelos de consumo circular, em que os recursos são utilizados e reutilizados, assegurando que a procura de energia possa ser satisfeita enquanto o ambiente pode ter benefícios mais amplos (BIJARCHIYAN ET AL., 2020; VALENTI et al., 2020).

Nesta linha, a produção de energia renovável torna-se uma chave importante para a transição da sociedade e economias mais sustentáveis (INGRAO et al., 2018). No entanto, é importante citar que sistemas como os socioeconômicos, políticos, industriais, agrícolas, empresariais, energéticos, entre outros, terão de se adaptar a

mudanças significativas, bem como ao desenvolvimento de sistemas energéticos mais competitivos, seguros e sustentáveis (MCCORMICK & KAUTTO, 2013).

Dados mostram a mudança de uma economia linear para uma economia circular proporciona não só a substituição de matérias-primas fósseis, mas também a adoção de um sistema regenerativo, no qual recursos e resíduos, incluindo emissões e perdas de energia, são atenuados pelo fluxo fechado de processamento de matérias-primas e utilização de energia. No mesmo contexto, o estudo de Geissdoerfer et al. (2017) afirma que projetos que abrangem, por exemplo, reciclagem, tratamento de resíduos e outras formas de gestão integral da recuperação de matérias-primas apresentam a capacidade de gerar conhecimentos para o desenvolvimento económico, social e ambiental sustentável (GEISSDOERFER et al., 2017).

Desta forma, seguindo o conceito de economia circular, a proposta de obter fontes de energia mais limpas a partir de fontes renováveis, promove a redução de emissões de poluentes na atmosfera, um caminho para a melhor gestão de resíduos e utilização de recursos, além de maior integração entre as comunidades rurais e industriais resultando em uma nova perspectiva do setor energético (BELAUD et al., 2019).

3.2. Energia renovável, meio ambiente e políticas

Ao longo dos anos, o mundo tem vivenciado transformações e desequilíbrios ambientais. Um exemplo é a intensificação do efeito estufa.

O efeito estufa é o mecanismo natural responsável por manter a temperatura terrestre em intervalos aceitáveis para a sobrevivência. Este fenômeno engloba gases passíveis de recondução como o dióxido de carbono (CO_2), metano (CH_4), óxido nítrico (N_2O), halocarbonos e vapor de água. Estes gases são responsáveis pela absorção de uma fração dos raios solares e os distribuem sob a forma de radiação infravermelha para a atmosfera, aquecendo assim o planeta (AKITT, 2018). Desta forma, cerca de 70% dos raios solares são absorvidos por estes gases e 30% não conseguem ultrapassar esta barreira, de tal modo que são refletidos de volta para o espaço. No entanto, o aumento da emissão dos gases citados, oferece uma maior resistência à dissipação de calor, causando assim um desequilíbrio do efeito de estufa (KIRK-DAVIDOFF, 2018).

Estudos mostram que a intensificação do efeito pode ser explicada pelo aumento das fontes antropogênicas, entre elas, principalmente, a queima de combustíveis fósseis, atividades industriais, crescimento acelerado da economia e aumento da população nos países em desenvolvimento (KANG et al., 2016).

O resultado do aumento do efeito estufa leva ao aquecimento global, uma vez que a temperatura do planeta tenta compensar este desequilíbrio energético aumentando a sua média. Neste sentido, um dos principais desafios nos próximos anos é assegurar uma certa qualidade de vida para a população mundial e ao mesmo tempo minimizar os impactos no meio ambiente. Considerando isto, uma das formas de reduzir impactos ambientais é visto na redução da dependência de fontes de energia não renováveis, isto é, no aumentar da utilização de energias renováveis (LEE, 2017; LINDOSO et al., 2011).

Com base nesta premissa, a energia renovável é qualquer fonte de energia em que, além de não ser derivada de uma fonte finita como o petróleo e o carvão, contribui para a redução real das emissões de gases com efeito de estufa (KANG et al., 2016). E ainda, permite a diversificação da matriz energética, descentralizando assim a dependência da energia fóssil.

Algumas das principais fontes de energia renovável já são utilizadas há mais tempo, como a energia solar (SANSANIWAL et al., 2018), eólica (ISHAQ et al., 2018), geotérmica (MANZANO-AGUGLIARO et al., 2013) e centrais hidroelétricas (APERGIS et al., 2016). No entanto, quando comparadas com fontes de energia convencionais, algumas fontes de bioenergia têm um carácter instável, tais como a energia solar e eólica (SANSANIWAL et al., 2018, ISHAQ et al., 2018). Isto porque o comportamento da radiação solar e da velocidade do vento pode variar ao longo da estação. Como solução, o que tem sido explorado é a integração de várias fontes de bioenergia, uma vez que como uma única fonte não é suficiente para o fornecimento contínuo. Assim, a utilização de fontes bioenergéticas combinadas, inicialmente notada em áreas remotas, tem sido vista em grandes centros e cidades (GUO et al., 2018).

Outro ponto em destaque, é o aumento no interesse de bioenergia derivadas de biomassa, como por exemplo, biodiesel, bioetanol e biogás. A produção deste tipo de energia envolve culturas energéticas, resíduos agrícolas ou industriais ou, ainda, águas residuais. Além disso, pode ser visto como um processo estratégico que engloba uma solução viável: destino correto para os vários fluxos de resíduos e produção de energia (SAHOTA et al., 2018). Desta forma, a diversificação das fontes de energia

a fim de intensificar a utilização da bioenergia é vista como uma das formas mais eficazes de promover soluções energéticas com baixo teor de carbono. Utilizando cada vez mais estas fontes de forma sustentável e alargando a utilização da bioenergia a outras regiões, as reduções das emissões de carbono podem ser alcançadas mais rapidamente (DAHALL et al., 2018).

Estudos mostram que existem muitas tecnologias de produção de bioenergia, as quais podem ser categorizadas em: tecnologias químicas, bioquímicas e térmicas (SILVA et al., 2014). Independentemente da tecnologia escolhida, cada uma apresentará vantagens e desvantagens, bem como os requisitos para a sua implementação (FIORESE et al., 2014).

No cenário brasileiro, a expansão do tratamento de efluentes urbanos, a recuperação de aterros sanitários e o desperdício de alimentos podem tornar o Brasil um dos maiores produtores de bioenergia a partir de fontes renováveis. É importante destacar que o perfil brasileiro de geração de bioenergia é mais robusto e tecnológico, focado no desenvolvimento de energias renováveis, porém necessita de mais incentivos e investimentos econômicos para desenvolver processos de produção de energia a partir de biomassa (MILANEZ et al., 2018).

Desta forma, é possível concluir que para produzir energia por via sustentável é necessário investimento de capital para desenvolver biotecnologias eficientes de produção, armazenamento e distribuição da bioenergia. Isto envolve também a política de cada país e os incentivos relacionados com a transição do sistema energético. Vale ainda ressaltar que esta transição da cadeia de fornecimento de energia inclui mudanças nas tecnologias energéticas, políticas sociais, econômicas e reguladoras em cada país (DAHALL et al., 2018).

3.3. Hidrogênio: o carreador de energia do futuro

O átomo de hidrogênio (H) é o elemento mais leve, sendo o seu isótopo mais comum constituído apenas por um próton e um elétron. Este elemento é um importante constituinte da água e de toda a matéria orgânica, além de estar distribuído não só na terra, mas também por todo o Universo. Pode formar moléculas de hidrogênio (H_2) as quais são as menores quando comparadas com a maioria das outras moléculas. A molécula H_2 é incolor, inodora e insípida (semelhante ao metano) e difunde-se mais rapidamente que qualquer outro gás (APERGIS et al., 2016).

O hidrogênio apresenta uma densidade de $0,09 \text{ kg/m}^3$ e, ainda, se destaca por apresentar significativa capacidade térmica ($14,4 \text{ kJ/kg K}$) (PAREEK et al., 2020).

O hidrogênio é, sem dúvida, o portador de energia do futuro. Ao contrário dos combustíveis fósseis, este elemento tem um baixo impacto ambiental, especialmente no que diz respeito à sua combustão limpa, com a formação de apenas água como subproduto (OLABI et al., 2021). Além disso, o hidrogênio é um combustível atraente por apresentar um elevado teor energético ($141,9 \text{ MJ kg}^{-1}$) quando comparado com o gásóleo (45 MJ kg^{-1}), gasolina (47 MJ kg^{-1}) e CH_4 ($50,02 \text{ MJ kg}^{-1}$), por exemplo, (SETA et al., 2018).

Estudos afirmam que H_2 apresenta potencial para ser um dos substituintes dos combustíveis fósseis como centro de produção de energia em todo o mundo, atuando como fonte de energia primária para a geração de eletricidade, combustível para aquecimento central, e combustível para transporte de caminhões, navios e aviões (OLIVEIRA et al., 2020). Portanto, o H_2 é um promissor vetor energético no panorama de transição energética mundial de combustíveis fósseis para energia limpa e sustentável (EGELAND-ERIKSEN et al., 2021).

3.4. Processos de produção de hidrogênio

A escolha do melhor método de produção de H_2 dependerá da quantidade de energia a ser produzida e do seu grau de pureza. A literatura relata vários exemplos de tecnologias disponíveis para a produção de H_2 , as quais podem ser tecnologias convencionais e tecnologias biológicas (ANZOLA -ROJAS et al., 2015).

As tecnologias de produção de H_2 convencionais podem ser a reforma a vapor do gás natural e do petróleo, a decomposição catalítica do gás natural, a oxidação parcial da fração de hidrocarbonetos pesados do petróleo e a gaseificação do carvão ou coque (HOLLADAY et al., 2009). Estes métodos são caracterizados por elevadas demandas de energia e requerem altas temperaturas ($> 700 \text{ }^\circ\text{C}$) (HOLLADAY et al., 2009).

Outro método convencional de produção de H_2 é eletrólise da água, o qual requer eletricidade proveniente de centrais elétricas, carvão ou gás natural ou, ainda, de centrais nucleares. Este processo resulta na emissão de dióxido de carbono para a atmosfera (DINCER & ACAR, 2014). Estudos ainda mostram outros métodos para produzir H_2 , como por exemplo, a gaseificação fotocatalítica, plasmquímica,

magnetolítica ou radiolítica da água, a gaseificação de hidrocarbonetos por plasma a alta temperatura (PAREEK et al., 2020), ou ainda, a produção de H_2 por decomposição da água através da divisão mecanocatalítica (FATSIKOSTAS et al., 2002)

De uma forma geral, os processos básicos para a produção do gás hidrogênio, a partir de fontes primárias de energias não-fósseis demandam energia, estrutura e custo (CHANDRASEKHAR et al., 2015). Por isso, o maior desafio envolvido na utilização do H_2 como transportador de energia é o desenvolvimento de uma produção sustentável e de baixo custo. É neste contexto que entram as tecnologias biológicas para produzir H_2 .

Os processos biológicos são vistos como rotas econômicas e promissoras por envolverem a ação de microrganismos sob métodos, como a fermentação (METCALF & EDDY, 2003), em que matéria orgânica é convertida em bioenergia pela ação destes microrganismos. Além disso, estas rotas verdes empregam condições amenas de temperatura e pressão resultando em um menor consumo energético (ALEXANDROPOULOU et al., 2018; ANZOLA-ROJAS et al., 2015; FERNANDES et al., 2013; LUO et al., 2010) e, também, permitem a utilização de resíduos industriais e águas residuárias como substratos o que contribui para a redução de utilização de fontes não renováveis, e consequentemente para a proteção ambiental como a redução de gases de efeito estufa. No entanto, a aplicação industrial para a produção de H_2 em larga escala ainda não foi implementada devido a desafios de processo como a produção estável em processo contínuo acima de 30 dias de operação, armazenamento e transporte do gás.

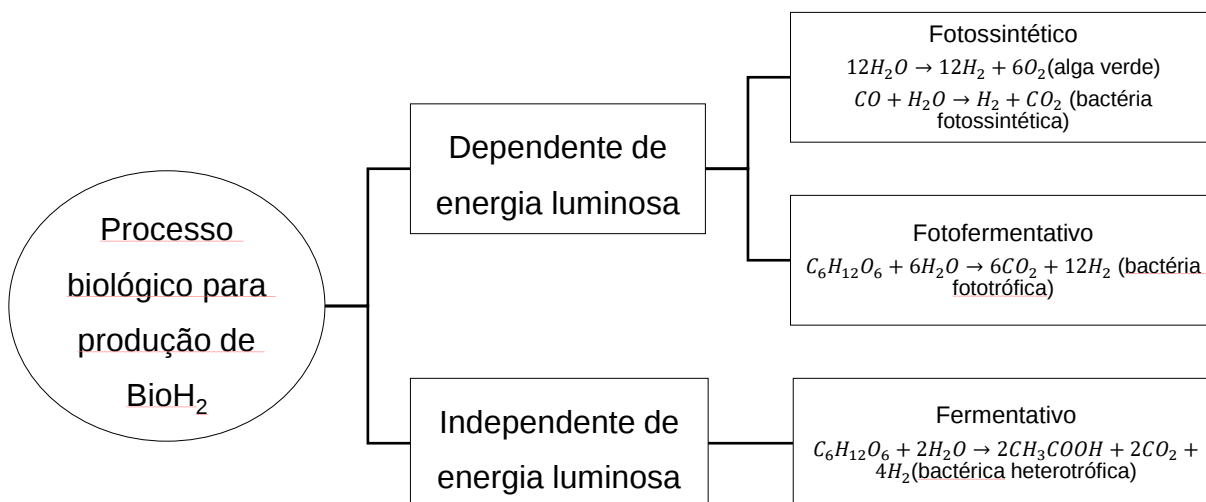
3.5. Processos biológicos

Uma alternativa limpa e promissora é a produção de hidrogênio através de vias biológicas. O biohidrogênio ($BioH_2$) pode ser obtido por meio de processos fotossintéticos, como por exemplo, a biofotólise da água por cianobactérias e algas verdes, e a foto decomposição de matéria orgânica por bactérias fotossintéticas (ANWAR et al., 2021). Ainda, o $BioH_2$ pode ser obtido por processos fermentativos independente de energia luminosa (*dark fermentation*, do inglês) por meio da degradação de compostos orgânicos em condições anaeróbias (DAS, 2002; GHIMIRE ET AL., 2015). Em resumo, a obtenção de $BioH_2$ a partir de vias biológicas pode ocorrer por meio de processos

dependentes de energia luminosa e independentes de energia luminosa, conforme é apresentado na Figura 1.

O hidrogênio produzido por via biológica é chamado de biohidrogênio (BioH₂).

Figura 1. Processos biológicos dependentes e independentes de energia luminosa aplicados para a produção de hidrogênio



Fonte: Adaptado de Ghimire et al. (2015) e Trevisan et al.(2019).

A produção de BioH₂ por fermentação escura tem se destacado entre os processos biológicos, principalmente, por ser um processo robusto e econômico que não precisa de fonte luminosa aliado a ação de microrganismos fermentativos os quais são vistos como mais eficazes na produção de hidrogênio, em um curto intervalo de tempo, quando comparados aos microrganismos responsáveis pelos processos dependentes de luz (HALLENBECK, 2009). Além disso, a fermentação escura é considerada um método mais sustentável e atrativo devido à utilização de resíduos orgânicos como substrato, integrando simultaneamente o tratamento de resíduos e a produção de energia limpa (URBANIEC & BAKKER, 2015).

3.6. Digestão anaeróbia

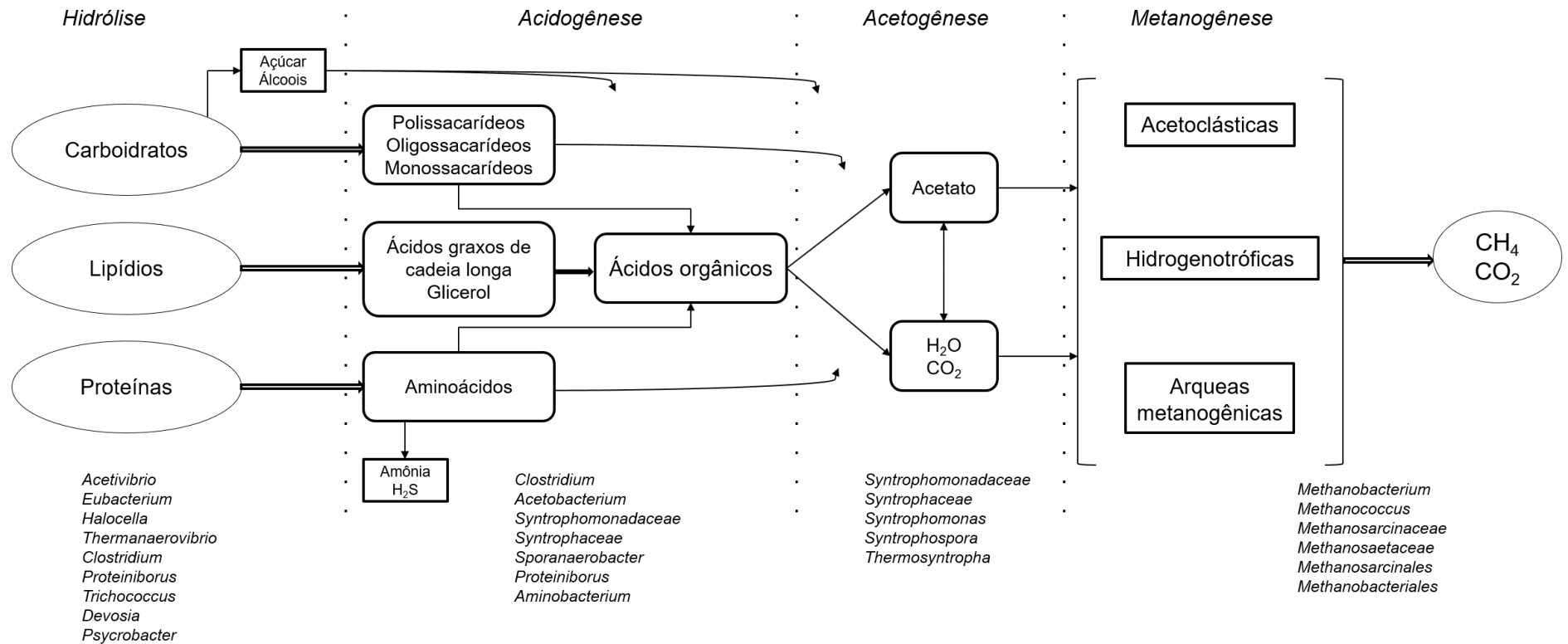
Para entender o conceito de fermentação escura é necessário entender primeiro o conceito de digestão anaeróbia (DA), uma vez que a fermentação escura ou acidogênese é uma etapa dentro do processo de DA.

A digestão anaeróbia é uma tecnologia consolidada na qual ocorre a produção de biogás através da degradação de matéria orgânica na ausência de oxigênio. As transformações bioquímicas da DA resultam em quatro fases principais (hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese) as quais envolvem um complexo consórcio de microrganismos (Figura 2).

Nas etapas de hidrólise e acidogênese, é possível observar a ação de bactérias hidrolíticas e fermentativas as quais convertem compostos de cadeia longa (carboidratos, lipídeos e proteínas) em compostos de cadeia simples, produzindo ácidos graxos voláteis (AGVs), álcoois, CO_2 e H_2 . Na etapa de acetogênese ocorre a ação de bactérias acetogênicas as quais transformam ácidos orgânicos e álcoois em ácido acético, H_2 e CO_2 . Estes compostos são os substratos utilizados na etapa seguinte (metanogênese) em que ocorre a produção de metano pelas arqueias metanogênicas. Por sua vez, as arqueias metanogênicas hidrogenotróficas convertem H_2 e CO_2 em CH_4 , enquanto as metanogênicas acetoclásticas utilizam o acetato (CHERNICARO et al, 2015).

Geralmente, a composição do biogás produzido na DA consiste em 35-75% metano, 25-65% dióxido de carbono, 1-5% hidrogênio e quantidades vestigiais de outros gases, tais como vapor de água, amoníaco, sulfeto de hidrogênio e halogenetos (YENTEKAKIS & GOULA, 2017). É importante ressaltar que a qualidade e rendimento deste biogás está estreitamente ligada ao tipo de matéria-prima utilizada na DA, além de fatores ambientais e parâmetros físicos - químicos que podem influenciar as etapas do processo (BIJARCHIYAN et al., 2020; GHIMIRE et al., 2015; MAO et al., 2015).

Figura 2. Sequências metabólicas e grupos microbianos envolvidos na digestão anaeróbia.



Fonte: Adaptado de Rodrigues et al. (2021b).

Em geral, vários microrganismos estão envolvidos nas etapas do processo DA, tais como *Clostridium spp.*, *Peptococcus anaerobus*, *Bifidobacterium spp.*, *Micrococcus spp.*, *Bacillus spp.*, *Desulphovibrio spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Lactobacillus*, *Actinomyces*, *Staphylococcus spp.*, *Escherichia coli*, *Methanobacterium*, *Methanobacillus*, *Methanococcus*, *Methanospirillum*, *Methanosaeta*, *Methanothrix* e *Methanosarcina* (LIU et al., 2020; CHERNICHARO, 2007), como é possível identificar na Figura 2. Quando os substratos utilizados na DA são ricos em sulfato, pode ocorrer a redução do sulfato para sulfeto durante o processo e isto será realizado por um grupo específico de bactérias redutoras de sulfato (BRS) (LIMA et al., 2015).

É importante citar que nas etapas de hidrólise, acidogênese e acetogênese pode estar presente bactérias anaeróbias obrigatórias (ou estritas) ou facultativas, ou seja, cujo metabolismo funciona na ausência de oxigênio (O_2) (SANTOS et al., 2014).

Ainda sobre o processo de DA, podem ser gerados metabolitos secundários de valores biotecnológicos e agregados, além do hidrogênio, tais como ácidos orgânicos voláteis (acético, butírico, propiônico, capróico, láctico, valérico), 1,3 propanodiol (1,3 PD) e alguns biocombustíveis (etanol, butanol, metanol) que são produzidos na fase acidogênica e acetogênica (NDABA et al., 2015). Estes subprodutos gerados dependem do tipo de substrato utilizado na DA, por exemplo, podem ser resíduos agroindustriais, tais como glicerol bruto, resíduos lácteos, resíduos de fruta, vinhaça da produção de açúcar e etanol, etc.

Considerando todo o conceito sobre DA, quando o objetivo é obter taxas elevadas de H_2 , é necessário gerar condições que permitam restringir o processo de DA à fase acidogênica. Em outras palavras, devem ser estabelecidas condições favoráveis para as bactérias acidogênicas, enquanto a atividade dos microrganismos consumidores de H_2 como as bactérias homoacetogênicas e arqueias metanogênicas, deve ser evitada (MAINTINGUER et al., 2011; PACHIEGA et al., 2019; ROSSI et al., 2011).

3.6.1. Fermentação escura: fundamentos

Na literatura, a digestão anaeróbia para produção de hidrogênio é também referida como fermentação escura (FE) e é realizada na fase acidogênica a partir da inibição da fase metanogênica, principalmente através da aplicação de cargas orgânicas adequadas e condições de pH (METCALF & EDDY, 2003). Este processo

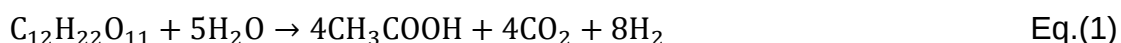
é uma abordagem atrativa para a geração de bioenergia porque tem o potencial de reutilizar águas residuais e resíduos como fontes de carbono e, ainda, apresenta o potencial de produzir metabolitos secundários de interesse industrial tais como ácidos orgânicos e biopolímeros (FUESS et al., 2016).

A FE é baseada na oxidação parcial da matéria orgânica por microrganismos sob condições anaeróbias e sem luz (CABROL et al., 2017). Este processo ocorre nas primeiras etapas da digestão, principalmente na etapa acidogênica. Nestas primeiras etapas, a conversão do substrato é mediada por bactérias hidrolíticas e fermentativas. O BioH₂ é gerado nos processos redox juntamente com ácidos graxos voláteis (AGV) e/ou álcoois como o aceptor final de elétrons (CABROL et al., 2017). O rendimento do BioH₂ depende da via metabólica adotada pelo consórcio microbiano para converter o substrato e os compostos orgânicos intermediários formados.

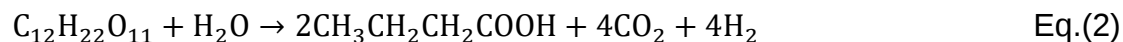
Os principais substratos utilizados para produzir BioH₂ são ricos em carboidratos devido ao maior rendimento obtido pelos microrganismos que utilizam estes compostos (SHARMA et al., 2020). Dependendo da complexidade do substrato, pode ser necessário submetê-lo a uma etapa biológica ou físico-química para quebrar a matriz de carboidratos complexos e liberar dissacarídeos ou monossacarídeos capazes de atravessar a célula microbiana para iniciar o processo de fermentação (SHARMA et al., 2020).

A hidrólise da sacarose na fermentação escura dá origem a glicose e frutose. Durante a degradação da sacarose, pode ocorrer a produção de hidrogênio de acordo com reações, como por exemplo: (i) consumo de sacarose e geração de ácido acético e (ii) consumo de sacarose e geração de ácido butírico, conforme descrito nas Equações 1 e 2. Ainda, pode ocorrer a produção de etanol sem produção de hidrogênio, conforme a Equação (3), e a rota de produção de etanol e hidrogênio ao mesmo tempo, apresentada na Equação (4), em que o rendimento máximo de produção é igual a 4 mol H₂ por 1 mol de sacarose. Vale citar que ácido propiônico também é formado a partir da sacarose.

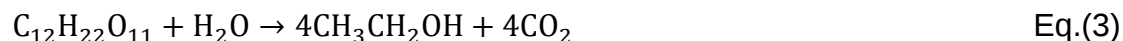
Rota produtiva de ácido acético



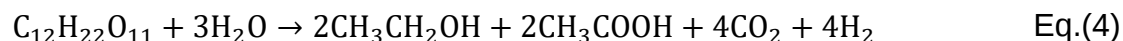
Rota produtiva de ácido butírico



Rota produtiva de etanol



Rota produtiva de etanol e hidrogênio



A conversão teórica máxima de sacarose em BioH₂ é igual a 1 mol de sacarose, que gera 8 moles de gás hidrogênio na produção do ácido acético. No entanto, a produção de 4 moles de BioH₂ por 1 mol de sacarose ocorre se a sacarose for convertida em ácido butírico. Desta forma, a principal produção teórica de hidrogênio engloba o acetato como o produto final da fermentação.

Na prática, a alta produção de BioH₂ está relacionada à presença de produtos de fermentação, como ácidos acético e butírico; enquanto a baixa produção de BioH₂ está associada à formação de ácido propiônico e produtos como álcoois e ácido láctico.

De acordo com Sá et al. (2014), a ação dos microrganismos na decomposição de um determinado substrato em H₂ está relacionada à presença de enzimas específicas, como por exemplo, as hidrogenases, as quais são responsáveis pela catálise da reação reversível de oxidação do hidrogênio, apresentado na Equação 5.



O hidrogênio por ser obtido a partir da glicose proveniente da degradação da sacarose. Assim, sabe-se que um mol de glicose formam 2 moles de piruvato, juntamente com 2NADH, e isto pode acontecer por duas rotas principais: (I) piruvato: formiato liase (PFL) comumente encontrado em anaeróbios facultativos, tais como *Enterobacteria* (Equações 6-7); e (II) piruvato: ferredoxina oxidoredutase (PFOR) gerando ferredoxina reduzida, acetil CoA e CO₂ (Equações 8-10) (CABROL *et al.*, 2017).

Rota PFL:



Rota PFOR



Na rota do PFL, o BioH₂ é produzido pela reação do formiato liase e hidrogênio, em que ocorre a quebra do formiato em H₂ e CO₂ (Equação 7). Enquanto, a rota PFOR, resumida pela equação (3), tem-se a produção de acetil CoA acoplada à redução de NAD⁺, o qual é reoxidado depois pela ferredoxina e gera BioH₂ na rota NADH: ferredoxina oxidorreductase (NFOR) (Equações 9-10) (CAI *et al.*, 2011). Da mesma forma, microrganismos capazes de realizar a via do PFOR podem reoxidar o NADH da glicólise através do NFOR, resultando no rendimento teórico máximo de BioH₂ igual a 4 mols por 1 mol de glicose (CAI *et al.*, 2011). A obtenção do rendimento teórico máximo de BioH₂ seria possível produzindo acetato como metabólitos solúveis a partir de acetil CoA através da via PFOR (Tabela 1 – reação 1), embora o crescimento microbiano desvie parte do NADH reduzido durante a glicólise tornando o rendimento real de BioH₂ menor do que 4 mols (CABROL *et al.*, 2017; GONZÁLEZ-CABALEIRO *et al.*, 2015).

É importante ressaltar que a rota metabólica deve fornecer o equilíbrio redox e ser termodinamicamente favorável; assim, a redução do metabólito solúvel produzido se torna uma alternativa para reoxidar o NADH (Tabela 1) (GONZÁLEZ-CABALEIRO *et al.*, 2015).

A formação de ácido butírico a partir de acetil CoA proporciona a regeneração de 2 mols de NADH e produz 2 mols de BioH₂ (Tabela 1 – reação 2) (SAADY, 2013). As bactérias lácticas produzem ácido láctico diretamente via piruvato como estratégia para garantir a disponibilidade de NAD⁺ e impedir o aumento da pressão de H₂ do sistema (Tabela 1 – reação 6) (SAADY, 2013).

A produção de etanol é resultado da conversão de acetil CoA e pode ser considerada uma alternativa para diminuir a pressão de H₂ do sistema, pois demanda os 4 mols de NADH reduzidos no processo (Tabela 1 – reação 7) (SAADY, 2013).

Alguns microrganismos desenvolvem o metabolismo heterofermentativo, assim, dois ou mais metabólitos solúveis podem ser formados a partir da conversão do substrato (Tabela 1 – reações 3,4,8) (GUO *et al.*, 2008; ZIDWICK *et al.*, 2013). Além disso, em um sistema de cultivo misto, os metabólitos solúveis gerados por alguns

microrganismos podem ser utilizados como substratos para outros no consórcio microbiano. Além disso, o BioH₂ pode ser usado como substrato na rota Wood-Ljungdahl (homoacetogênese) em sistemas sob alta pressão de H₂ ou baixa concentração de substrato orgânico (Tabela 1 – reação 9) (SAADY, 2013).

3.7. Interferentes do processo

De acordo com diversos estudos, ocorreu um aumento em pesquisas voltadas produção de biohidrogênio (BioH₂) por via biotecnológica, como a FE. O processo de FE permite a ação de microrganismos na transformação de substratos em bioprodutos como o BioH₂. Em contraste, pesquisas afirmam que baixos rendimentos na FE estão associados a diferentes fatores, como tipo de efluente, configuração do reator, concentração de substrato, pH, temperatura, pressão parcial de H₂, sub ou sobrecargas de taxas de carregamento orgânico e concentração de células dentro do reator.

Para entender como e quais são os parâmetros operacionais interferentes da FE, é necessário entender primeiro como ocorrem as rotas de conversão da matéria orgânica no processo anaeróbio (Figura 2). Com base nestas rotas, observa-se que o acúmulo de BioH₂ no meio é apresentado a partir de um desequilíbrio entre as populações acidogênicas e metanogênicas no reator, ocasionado pelo controle de diversos parâmetros operacionais: pH, TDH, relação carbono/nitrogênio (C/N), tipo de inóculo (cultura mista ou pura) e de pré-tratamento aplicado, tipo de substrato, condições de temperatura, tipo de material suporte (para o caso de reatores de leito fixo), tipo de configuração do reator, COVa, COVe, entre outros (FERNANDES et al., 2013; PENTEADO et al., 2013; ANZOLA-ROJAS et al., 2015; GOMES et al., 2015, FUESS et al. 2016; SÁNCHEZ et al., 2021; FUESS et al., 2021). Este controle é feito na etapa acidogênica da DA, como mencionado anteriormente, de modo que ocorre a eliminação das principais bactérias consumidoras de BioH₂ arqueias metanogênicas hidrogenotróficas).

Tabela 1. Reações envolvidas na fermentação escura.

Nº	Reação	ΔG° (kJ.mol ⁻¹)	Referência
Rotas produtoras de BioH ₂			
1	$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COOH + 4H_2 + 2CO_2$	-206.0	(SAADY, 2013)
2	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3(CH_2)_2COOH + 2H_2 + 2CO_2$	-254.0	(SAADY, 2013)
3	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 0.75CH_3(CH_2)_2COOH + 0.5CH_3COOH + 2H_2 + 2CO_2$	-357.0	(GUO <i>et al.</i> , 2008)
4	$C_6H_{12}O_6 + H_2O \rightarrow CH_3CH_2OH + CH_3COOH + 2H_2 + 2CO_2$	-205.2	(GUO <i>et al.</i> , 2008)
5	$CH_3COOH + 2CH_3CH(OH)COO$ $\rightarrow H_2 + 1.5CH_3(CH_2)_2COOH + 2CO_2 + H_2O$	-156.6	(FUESS <i>et al.</i> , 2018)
Rotas não produtoras de BioH ₂			
6	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CH(OH)COOH + H^+$	-225.4	(SAADY, 2013)
7	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CH_2OH + 2CO_2$	-164.8	(SAADY, 2013)
8	$1,5 C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CH_2COOH + CH_3COOH + CO_2 + H_2O$	-374.6	(ZIDWICK <i>et al.</i> , 2013)
Rotas consumidoras de BioH ₂			
9	$2CO_2 + 4H_2 \rightarrow CH_3COOH + 2H_2O$	-104	(SAADY, 2013)
10	$C_6H_{12}O_6 + 2H_2 \rightarrow 2CH_3CH_2COOH + 2H_2O$	-279.4	(SAADY, 2013)

Fonte: Autor (2022).

Apesar do fato da produção de BioH₂ por FE ser considerada uma tecnologia estabelecida, ainda existem desafios na análise e o entendimento da influência dos parâmetros operacionais na FE, o que nos leva a um leque de oportunidades de estudos para verificar a influência destes parâmetros nas variáveis respostas do processo, até atingir a padronização que existe com os sistemas metanogênicos.

Os principais parâmetros operacionais que influenciam a FE são descritos nos itens 3.7.1 a 3.7.8.

3.7.1. Tempo de detenção hidráulica – TDH

O TDH é um parâmetro indispensável na FE e pode ser controlado através da vazão do fluxo que alimenta o reator em estudo, com a intenção de observar o comportamento da produção de biogás (AMORIM et al., 2009). Este parâmetro é o tempo em que um substrato permanece em uma câmara de reator. Trabalhar com uma faixa de TDH mínimo reduz o volume do reator e, conseqüentemente, reduz os custos de capital (SPEECE et al., 1997). Tem um grande impacto na produtividade do biogás durante o processo quando realizado em modo contínuo ou semi-contínuo.

A Literatura discute que uma das principais influências do TDH na produção de BioH₂ é a capacidade de induzir um balanço de biomassa favorável à produção de H₂. Nesse contexto, este parâmetro se torna uma ferramenta operacional que pode ser usada para selecionar populações microbianas pois as taxas de crescimento são capazes de acompanhar a diluição mecânica criada pela vazão contínua. Ainda, quando as operações são realizadas com valores baixos de TDH isto contribui para inibição da atividade metanogênica através da lavagem das arqueas metanogênicas dos reatores ao longo da operação (LEE, 2017) A lavagem de arqueias produtoras de metano dos reatores ocorreu à velocidade específica de crescimento (μ) - cerca de 0,4 dia⁻¹ (ou 0,0167 h⁻¹) enquanto a velocidade específica das bactérias acidogênicas é de aproximadamente 0,083 h⁻¹. Isto evidencia que a taxa específica de crescimento pode provocar o arraste completo das arqueias metanogênicas, enquanto que a população de produtoras de hidrogênio permanece no sistema (HALLENBECK, 2009) Portanto, isso ratifica que o TDH apresenta a capacidade de inibir a metanogênese na produção de hidrogênio por digestão anaeróbia.

Considerando a influência do TDH, pode-se afirmar que este parâmetro afeta a formação de metabólitos, uma vez que a diminuição do TDH é capaz de reduzir a diversidade microbiana associada à inibição da produção de ácido propiônico, e resultando no aumento no rendimento de hidrogênio (MARTINS & AMORIM, 2016).

3.7.2. Potencial hidrogeniônico – pH

A concentração de íons H^+ desempenha um papel importante no processo de FE, pois o valor do pH tem um impacto direto na atividade da microbiota, nas vias metabólicas dos microrganismos, bem como na sua morfologia e estrutura celular (LIN e outros, 2012). O que direciona para a importância do controle adequado do pH do efluente, pois sistemas acidogênicos operados sem o devido controle do pH se tornam vulneráveis a perdas de desempenho devido a inúmeros fatores que dependem estritamente deste parâmetro, tais como a atividade das hidrogenases, as rotas metabólicas predominantes e ainda, fenômenos de floculação e aderência microbiana (FUESS et al., 2016).

Os microrganismos acidogênicos são capazes de crescer em uma ampla faixa de pH produzindo continuamente $BioH_2$. No entanto, o pH interno da célula da maioria dos microrganismos é mantido em torno do valor neutro para garantir a integridade das macromoléculas por mecanismo homeostático, permitindo o transporte de compostos através da membrana celular semipermeável (GONZÁLEZ-CABALEIRO et al., 2015).

Estudo como o de Fuess et al. (2019) afirma que o pH do efluente do reator foi o principal fator que influenciou a produção de $BioH_2$ a partir da vinhaça de cana-de-açúcar usando um reator com material suporte, e impôs mudanças na via metabólica, ou seja, produção de lactato em $pH < 5,0$, produção de $BioH_2$ através de ácido butírico na faixa de pH de 5,0 a 5,5, e redutor de sulfato, juntamente com a produção de $BioH_2$ em $pH > 6,0$, na razão $DQOt/SO_4^{2-}$ igual a 24. Esses autores observaram rendimentos de $BioH_2$ de $0,2 \pm 0,2$, $3,0 \pm 2,8$, $4,4 \pm 0,8$ e $3,8 \pm 1,5$ $molH_2 g^{-1}$ DQO convertido, respectivamente, para pH $4,44 \pm 0,06$, $4,78 \pm 0,41$, $5,24 \pm 0,16$ e $6,51 \pm 0,64$, o que indica a faixa de pH de 5,0 a 5,5 a mais adequada para a produção de $BioH_2$ a partir da vinhaça de cana-de-açúcar. Os resultados obtidos por Toledo-Cervantes et al. (2020) para a produção de $BioH_2$ a partir da vinhaça de

tequila ratifica os resultados obtidos, atingindo pH ao final dos ensaios em batelada igual a 5,5 (FUESS et al., 2019).

A literatura apresenta que embora seja possível encontrar alguma concordância para pH inicial em torno de 6,5-7,0 e pH do efluente em torno de 5,0-5,5 para a produção de BioH₂, a fermentação escura sob pH mais baixo também é possível. Oliveira et al. (2020) demonstraram que a produção contínua de BioH₂ também é possível em valores baixos de pH operando um ASTBR alimentado com melaço de cana a 60 gDQO L⁻¹d⁻¹, favorecendo a via metabólica para produção de ácido butírico e BioH₂ a partir da conversão de ácidos acético e láctico (Tabela 1 – Reação 5) com predominância do gênero *Thermoanaerobacterium*.

3.7.3. Temperatura

A temperatura afeta a taxa de crescimento das bactérias e a eficiência de conversão dos substratos em BioH₂ no processo de FE (SÁNCHEZ et al., 2021b)

Os microrganismos podem ser classificados em vários grupos de temperatura : psicrófilos (0-25 °C), mesófilos (25-45 °C), termófilos (45-65°C), termófilos extremos (65-80°C) e hipertermófilos (acima de 80°C) (LEVIN et al., 2004). Neste contexto, os microrganismos possuem uma temperatura ótima de crescimento, portanto, o controle da temperatura operacional é uma ferramenta para selecionar os consórcios microbianos no reator. Na temperatura mínima, o transporte na célula microbiana e outras atividades metabólicas tornam-se prejudicadas devido à solidificação da membrana citoplasmática semifluida (MADIGAN et al., 2012). A temperatura máxima provoca a desnaturação das enzimas, a lise térmica e o colapso da membrana citoplasmática (MADIGAN et al., 2012).

Estudos como o de Toledo-Cervantes et al. (2020) sobre a temperatura otimizada para condições mesofílicas (27,92 - 42,7°C) e termofílicas (47,92 - 62,07°C) para produção de BioH₂ a partir da vinhaça de tequila mostram que os valores otimizados obtidos foram, respectivamente, 35°C e 55°C, alcançando rendimento de BioH₂ sob condições mesofílicas de 15% maior do que em condições termofílicas. Apesar de operar reatores anaeróbios em batelada sequencial (ASBR) nas condições mesofílica (37°C) e termofílica (55°C), o reator termofílico apresentou melhor desempenho que o mesófilo e obteve um rendimento de BioH₂ 22% maior. Esses autores afirmaram que a menor solubilidade do H₂ em temperatura mais alta pode

ter dificultado as vias de consumo de hidrogênio em condições termofílicas em comparação com a condição mesofílica, uma vez que o teor de H_2 no biogás a 55°C foi duas vezes maior que o teor em 35°C e a formação de ácido propiônico foi observado apenas na condição mesofílica.

Flutuações na temperatura de operação de reatores com biomassa aclimatada podem causar mudanças na comunidade microbiana com diminuição no rendimento de $BioH_2$, como observado quando um inóculo enriquecido a 55°C foi submetido a variação de temperatura de 35 - 45°C e 65 - 75°C) (OKONKWO et al., 2019, 2020). A dominância de *Thermoanaerobacteriales* (98-77%), seguida de *Bacillales* (<1-22%) e *Clostridiales* (<1-3%) a 55°C foi deslocada para dominância de Clostridiales em direção a uma condição mesofílica, com abundância relativa igual a 84% e 74% obtidas para as respectivas temperaturas 35 e 45°C, enquanto *Thermoanaerobacteriales* manteve a dominância para a condição hipertermofílica (97%). Apesar da pequena mudança na dominância microbiana em temperaturas mais altas, esses autores verificaram que a perda na diversidade, devido ao desaparecimento de *Clostridiales* presentes no consórcio após o retorno a 55°C, prejudicou a recuperação do rendimento de $BioH_2$. A diminuição da temperatura levou a um aumento nas vias consumidoras de H_2 , como homoacetogênese e produção de ácido láctico, enquanto a 65°C a via metabólica mudou da via do acetato butírico para a via etanol-acetato, com apenas 5% de degradação do substrato a 75°C. No entanto, a produção contínua de $BioH_2$ hipertermofílico de 1,9 mol H_2 mol⁻¹glicose poderia ser alcançada em um reator anaeróbio de leito estruturado, utilizando vinhaça de cana-de-açúcar como substrato, através da via do ácido butírico quando o inóculo é fermentado naturalmente a 70°C (NIZ et al., 2019).

Portanto, é importante ressaltar que a seleção da temperatura ideal depende do tipo de bactéria utilizada durante a fermentação, tanto para culturas puras quanto para consórcios. Além disso, a atividade de enzimas específicas, responsáveis pela produção de $BioH_2$, dependerá da temperatura e ao mesmo tempo a temperatura ideal da fermentação dependerá do tipo de bactéria e do tipo de substrato utilizado. Vale ressaltar que temperaturas maiores são favorecidas devido à alta temperatura de geração (ŁUKAJTIS et al., 2018).

3.7.4. Substratos

A literatura apresenta que os substratos usados para FE podem ser sólidos, semi-sólidos ou líquidos. Substratos em estado sólido, que possuem alto teor de umidade em sua composição, ganham notoriedade para uso em processos de geração de biogás, pois deixaram de ser utilizados para geração de energia em usinas térmicas e podem ser gerados em diversos segmentos industriais. Assim, esta é uma rota mais sustentável para o seu destino. Substratos líquidos, geralmente chamados de efluentes, podem apresentar altas concentrações de matéria orgânica em sua composição diluída em água cuja concentração varia de acordo com cadeia produtiva que originou o efluente (FAN et al., 2018). Neste contexto, a escolha adequada de uma matéria-prima na FE deve ser aquela que apresenta uma fonte de compostos orgânicos que sirvam como substratos no processo. Diferentes açúcares têm sido utilizados como substratos, por exemplo, monossacarídeos, como glicose, e dissacarídeos, como lactose ou sacarose, são as fontes de carbono mais preferidas para conversões metabólicas de microrganismos em processos fermentativos (LUKAJTIS et al., 2018). Além disso, materiais como esgoto doméstico, vinhaça, restos de alimentos, milho, arroz, papel e outras fontes de matéria orgânica podem ser utilizados como substratos (MCCARTY, 2001). De uma forma geral, todos os tipos de biomassa podem ser usados como matéria-prima para a produção de biogás se contiverem carboidratos, proteínas e gorduras como componentes principais.

Vários estudos relatam sobre diferentes efluentes orgânicos (substratos líquidos) aplicados a sistemas anaeróbios para produção de bioenergia como o BioH₂. Por exemplo, estudos utilizando soluções de efluentes sintéticos à base de sacarose e glicose (ANZOLA-ROJAS et al., 2015; FERNANDES et al., 2013; GOMES et al., 2015b; LEITE et al., 2008; LIMA et al., 2013; SANTOS et al., 2014; TREVISAN et al., 2019) e água residuária de soro de queijo sintético (BLANCO et al., 2019) Estudos utilizando águas residuárias industriais, como soro de queijo (AZBAR et al., 2009; DAMASCENO et al., 2008; LIMA et al., 2015; PERNA et al., 2013), águas residuárias de mandioca (GOMES et al., 2016), soro de leite (DAVILA-VAZQUEZ et al., 2011; LIMA et al., 2016), efluentes de processamento de laticínios e alimentos (AHMAD et al., 2019; SCOMA et al., 2013; TIKARIHA & SAHU, 2014; VAN GINKEL et al., 2005), cervejarias (DE ARAUJO et al., 2016), vinícolas

(PENTEADO et al., 2013), refrigerantes (PEIXOTO et al., 2011). Ainda, alguns autores relataram o uso de águas residuárias à base de glicerina (BRAVO et al., 2015; LOVATO et al., 2015) e águas residuárias ricas em sulfato (SARTI et al., 2009). Além disso, estudos tem focado na utilização de vinhaças produzidas a partir de diferentes matérias-primas, como tequila (BUITRÓN et al., 2014; BUITRÓN & CARVAJAL, 2010), mandioca (WANG et al., 2013), cana-de-açúcar (FERRAZ JÚNIOR et al., 2015; FUESS et al., 2019), milho (FERNANDES et al., 2013) e outros.

3.7.4.1. Vinhaça de cana-de-açúcar

A produção e utilização do BioH₂ como fonte de energia ainda está em estágio de desenvolvimento e consolidação no Brasil, isto é, ainda é um estudo recente que demanda muita investigação (FUESS et al., 2016; FUESS et al., 2021; IEA, 2020; JAIN, 2019; MERCOSUR, 2017) Para entender o interesse de utilização da vinhaça de cana-de-açúcar como substrato na FE, primeiramente é necessário entender de onde vem a vinhaça e o que esta água residuária apresenta que a diferencia de outras águas residuárias na produção de BioH₂. Neste cenário, é importante citar que o interesse de utilizar a vinhaça de cana-de-açúcar para produção de H₂ é devido esta água residuária apresentar residual de carboidratos, ácido lático e glicerol os quais podem ser utilizados durante a FE como substratos (alimento) para os microrganismos (FUESS et al., 2018).

Para entender sobre a origem da vinhaça de cana-de-açúcar, o contexto sobre o mercado brasileiro de açúcar e álcool é importante. O Brasil se tornou altamente competitivo a partir do Proálcool, programa em que foi implementado a obrigatoriedade de misturar álcool com gasolina, juntamente com o surgimento de legislações ambientais mais rigorosas quanto à utilização de biocombustíveis, fazendo com que a produção brasileira de álcool se expandisse.

No território brasileiro, as regiões tradicionais de plantio da cana-de-açúcar são o Triângulo Mineiro, os estados de São Paulo, Goiás, Mato Grosso do Sul, Paraná e algumas regiões do Nordeste, sendo São Paulo o maior produtor atualmente (CONAB, 2022). Um resumo sobre os últimos anos de safra da cana mostra que a produção de cana-de-açúcar na safra 2020/21 foi estimada em 665 milhões de toneladas, com um acréscimo de 3,5% da produção referente à safra anterior de 2019/20, representando uma redução de 7,9% da produção de etanol em relação à safra do

ano anterior, equivalente à redução de 35,7 bilhões para 32,9 bilhões de litros de etanol, anidro e hidratado (CONAB, 2020). Por outro lado, a safra 2021/22 ainda em andamento, apresenta resultados parciais de produção até o mês de abril igual a 585,2 milhões de toneladas, representando um volume de matéria-prima 10,6% menor em relação ao da safra 2020/21. Essa redução é justificada pela diminuição de 3,5% na área cultivada e, também, aos efeitos climáticos adversos da estiagem durante o ciclo produtivo das lavouras. Na safra 2021/22 houve maior destinação percentual da cana-de-açúcar para a produção de etanol, principalmente, etanol anidro utilizado na composição da gasolina, esta produção teve aumento de 13,8% alcançando 10,6 bilhões de litros, enquanto o total produzido de etanol hidratado ficou em 16,18 bilhões de litros. A estimativa de produção até o final da safra é de 26,78 bilhões de litros, redução de 10% em comparação com a safra do ano anterior.

Neste cenário de produção de cana-de-açúcar, o Brasil é o maior produtor mundial e ocupa o segundo lugar na produção de etanol (FUESS et al., 2017). Isto o destaca na geração de bioenergia em larga escala a partir dos resíduos gerados em todas as etapas da cadeia produtiva do etanol de cana-de-açúcar FUESS et al., 2016, RODRIGUES et al., 2021). Estas informações ratificam que o Brasil lidera o cenário mundial de cana-de-açúcar. Ao avaliar o cenário agroindustrial brasileiro, é importante mencionar que o Estado de São Paulo é o maior produtor de etanol do Brasil, e conseqüentemente, é o maior produtor de vinhaça, apresentando um grande potencial de geração de energia limpa como o biogás da vinhaça através da rota biotecnológica (FUESS et al., 2018, 2019).

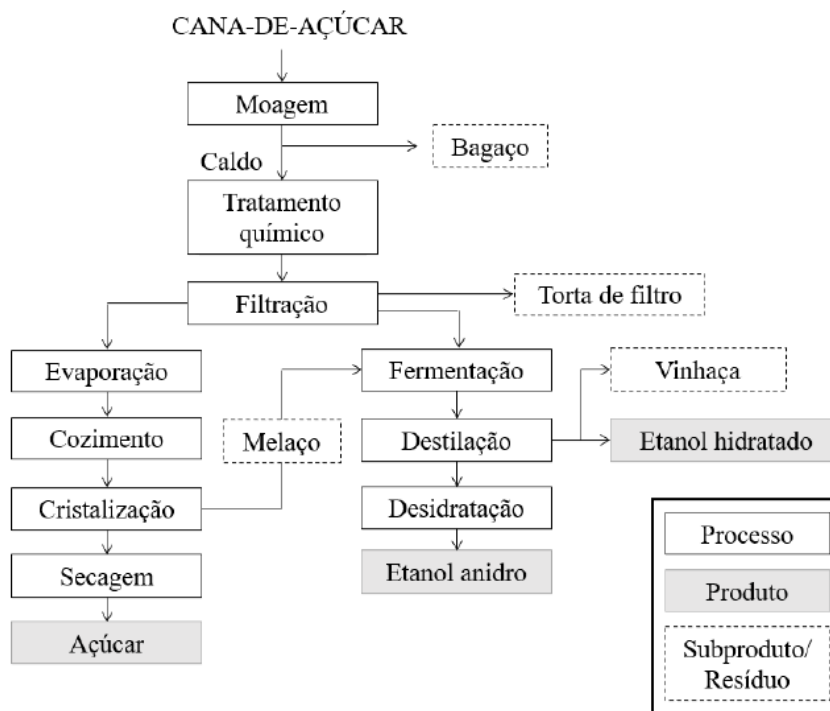
A vinhaça ou vinhoto é uma água residuária gerado na cadeia produtiva do etanol como subproduto obtido na etapa de destilação. Esta água residuária apresenta matéria orgânica a qual pode ser utilizada como substrato na FE, isto justifica o potencial de aplicação em processos biotecnológicos para recuperação de energia ou obtenção de outros produtos de interesse, como ácidos orgânicos (FUESS & GARCIA, 2014; MORAES et al., 2014).

Quando se trata de produção de etanol, no âmbito das questões ambientais, alguns benefícios importantes podem ser destacados como seu caráter renovável e seu potencial para reduzir a emissão de GEEs. Assim, o expressivo o emprego da cana-de-açúcar, a partir da produção de etanol, açúcar, vapor e eletricidade, também compreende outro ponto positivo da indústria sucroalcooleira, a qual pode ser caracterizada como biorrefinaria (TAKEDA, 2021).

A Figura 3 apresenta o processo produtivo de etanol a partir de cana-de-açúcar e consequentemente a produção da vinhaça.

Resumidamente, o processo de produção de etanol inicia com a colheita da matéria-prima (cana-de-açúcar), a qual é lavada para retirada de material particulado, e moída para extração do caldo, desta etapa é obtido o subproduto bagaço. Em sequência, o caldo extraído é submetido a um tratamento físico-químico para retirada de impurezas, gerando a torta de filtro e, depois, é direcionado para os processos de evaporação, cozimento, centrifugação e secagem na produção de açúcar, gerando como subproduto o melaço de cana-de-açúcar (TAKEDA, 2021).

Figura 3. Fluxograma simplificado da produção de açúcar e etanol.



Fonte: Takeda, (2021).

Após a fermentação do melaço, do mosto (caldo + melaço) ou do caldo de cana, a partir de microrganismos fermentadores capazes de romper as moléculas de glicose e produzir etanol e gás carbônico, o líquido resultante (vinho), composto formado pela mistura de leveduras, açúcares não fermentáveis e etanol, é encaminhado para as colunas de destilação para separação do etanol, em que, por sua vez, produz um resíduo denominado vinhaça ou vinhoto. O produto da destilação do vinho

passa por retificação gerando o etanol hidratado, com grau alcoólico de 93,5%, o qual, por desidratação obtém-se o produto final: etanol anidro (SALOMON & LORA, 2009), conforme apresentado na Figura 3.

Em termos de características gerais, a vinhaça apresenta cor escura, elevada concentração de matéria orgânica, assim como de potássio e sulfato, elevada cor e salinidade, características ácidas e corrosivas, e elevada temperatura, aproximadamente 65-107°C, ainda pH na faixa de 3 a 5. Uma das justificativas da característica ácida da vinhaça é a adição de ácido sulfúrico na etapa de fermentação do processo e a presença de compostos orgânicos ácidos, sobretudo, o lactato, também contribuem para isso. A presença de melanoidinas, compostos poliméricos de elevado peso molecular, formadas por reações de Maillard também compõem a vinhaça e são responsáveis pela coloração marrom escura deste subproduto (ESPAÑA-GAMBOA et al., 2012; MORAES et al., 2015; SALOMON & LORA, 2009).

Em termos de composição, a vinhaça apresenta de cerca de 93% de solução aquosa e 7% de sólidos em suspensão, sendo que 5% desses últimos são constituídos de matéria orgânica, enquanto os 2% restantes são identificados como substâncias minerais como, por exemplo, nitratos, fósforo, cálcio, magnésio, potássio e sulfato. A diversificada composição da vinhaça pode proporcionar um ambiente de fermentação favorável a inibição dos microrganismos em reatores anaeróbios (FUESS et al., 2019).

Dados da literatura afirmam que são gerados cerca de 10 a 15 litros de vinhaça por litro de álcool na cadeia produtiva de etanol, conforme visto na

Figura 3. Isto informa que, por exemplo, se são produzidos 20 bilhões de litros de etanol, conseqüentemente são produzidos 200 a 300 bilhões de litros de vinhaça. No entanto, cerca de 97% desse subproduto é utilizado em práticas de fertirrigação em lavouras de cana-de-açúcar devido conter potássio, cálcio e outros micronutrientes (FUESS et al., 2016; PARSAEE et al., 2019).

Estas informações direcionam a discussão de aplicação inadequada desse tipo de vinhaça a longo prazo e os impactos ambientais que podem ser gerados, como a salinização do solo, poluição de aquíferos, lixiviação de metais e sulfatos, emissão de gases de efeito estufa, como o óxido nitroso (N_2O), contaminações das águas subterrâneas, bem como problemas no solo entre outros impactos (FUESS & GARCIA, 2015; FUESS et al., 2016, 2022).

Estudos mostram que no Brasil, é comum a disposição da vinhaça como fertilizante e fonte de potássio em áreas agrícolas. Embora isto aconteça com frequência, essa prática não é recomendada sem a análise das características do solo e da vinhaça de acordo com os órgãos regulamentadores responsáveis, pois o resultado seria impactos ambientais (SALOMON & LORA, 2009).

No Estado de São Paulo, os critérios para disposição da vinhaça em uso agrícola são regulamentados pela Portaria Estadual nº 4.231, estabelecida pela Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB, 2015), entretanto, nessa regulamentação consta apenas dados de potássio, desconsiderando a quantidade de carga orgânica e outros componentes (MORAES et al., 2015). De acordo com Salomon e Lora (2009) despejar a vinhaça diretamente em corpos hídricos pode ocasionar a poluição de mananciais, destruição da fauna e flora aquáticas, prejudicando o abastecimento de água potável. Estudos, ainda, mostram que a disposição sem fiscalização da vinhaça em solos pode causar modificações em suas propriedades químicas e físicas, como por exemplo, aumento da probabilidade de lixiviação de íons, principalmente do nitrato e do potássio. Ainda, pode ocasionar a contaminação de águas superficiais e subterrâneas (FUESS et al., 2016). De fato, ainda existem muitas controvérsias sobre a utilização da vinhaça e sua disposição no meio ambiente, estudos têm sido realizados para o desenvolvimento de métodos e operações de tratamentos, como por exemplo, a reciclagem da vinhaça na fermentação, fertirrigação e a produção de bioenergia (CHRISTOFOLETTI et al., 2013). Como resultado, a FE pode ser uma alternativa para a utilização da vinhaça, gerando valor agregado a um resíduo ao invés de lança-la no meio ambiente. Em contrapartida, é importante ressaltar que durante a FE ocorre a conversão da matéria orgânica em bioenergia, isto significa que não ocorre o tratamento da vinhaça, isto é, não há remoção de nutrientes no processo, isto é, a vinhaça acidificada não pode ser utilizada como fertilizante na prática de fertirrigação. Apenas a vinhaça biodigerida a qual é obtida após a digestão anaeróbia, ou seja, após o processo metanogênico pode ser despejada no solo ou usada em práticas de fertirrigação (FUESS & GARCIA, 2014; MORAES et al., 2015; DEL NERY et al., 2018).

Alguns estudos brasileiros relataram o uso da vinhaça de cana-de-açúcar como substrato na produção de BioH₂ nos últimos anos, mas ainda são poucos os relatos (Albanez et al., 2018; Almeida et al., 2017; Koyama et al., 2016) FERRAZ JÚNIOR et al., 2015b, 2015a; FUESS et al., 2016; MORAES et al., 2015; NIZ et al.,

2019; OLIVEIRA et al., 2020; SÁNCHEZ et al., 2021). Entretanto, a maioria destes trabalhos utilizou a vinhaça diluída, o que do ponto de vista ambiental, pode inviabilizar o escalonamento dos sistemas acidogênicos uma vez que a vinhaça aplicada na prática de fertirrigação não precisa ser diluída, dessa forma, o objetivo é utilizar a vinhaça bruta ou in natura, coletada direto na usina e transportada para o laboratório para ensaios com concentrações reais. A nível de escala industrial, a vinhaça bruta pode ser direcionada para alimentar um reator anaeróbio instalado direto na usina, caso trabalhe com a vinhaça diluída, teria que direcionar mão-de-obra para realizar esta diluição.

Essencialmente, estes estudos demonstram o potencial deste substrato na produção de bioenergia e os principais desafios que este substrato apresenta como um número significativo de partículas sólidas, a presença de compostos químicos como o sulfato e outras características que podem afetar a produção de bioenergia. O que, finalmente, direciona para novas pesquisas para explorar o potencial e obter maior entendimento desta água residuária complexa.

3.7.5. *Inóculo e pré-tratamento*

Existem várias espécies de microrganismos capazes de realizar a fermentação escura. O cultivo de cultura pura para BioH₂ permite a operação do reator em condições ótimas, no entanto, esta abordagem requer um controle rigoroso do processo, por exemplo. esterilização de meios e equipamentos, inviabilizando o reaproveitamento de efluentes e matérias-primas residuais como substrato em um conceito de biorrefinaria (CASTELLÓ et al., 2020). Por outro lado, a diversidade de microrganismos no inóculo de cultura mista garante maior robustez ao reator e menores custos operacionais.

Diversos estudos mostram a influência do pré-tratamento do inóculo, por exemplo, Kumari & Das (2017) avaliaram o pH ácido (pH 3 por 24h), pH alcalino (pH 11 por 24h), choque térmico (100°C por 10min) e liofilização (-24°C por 24h) como pré-tratamentos e obtiveram maior rendimento de H₂ com o calor gerado no pré-tratamento de choque, respectivamente, 114% e 35% maior do que o inóculo não tratado e o pré-tratamento ácido, o segundo maior rendimento de H₂, sem produção de CH₄. O choque térmico levou à predominância de *Clostridium* sp. e a principal via

observada foi a formação do ácido butírico, seguido pelo ácido acético, com baixa produção de etanol.

Outra abordagem para obter um inóculo acidogênico em sistemas contínuos é a fermentação natural do substrato, seguida de sua recirculação no reator para garantir a adesão microbiana (LEITE *et al.*, 2008).

O estudo de Penteado *et al.*, 2013 mostrou que a fermentação natural apresentou resultados semelhantes ao pré-tratamento ácido (pH do lodo em 3,0 por 24 h depois ajustado para pH 7,0) para efluentes sintéticos à base de sacarose em reator de leito empacotado. Apesar de maior instabilidade, esses autores destacaram que a fermentação natural é de fácil aplicação e não agrega custos ao processo. A fermentação natural mostrou-se uma estratégia adequada para a produção de BioH_2 utilizando efluente real de fécula de mandioca sem diferença do lodo anaeróbio submetido ao pré-tratamento térmico (95°C por 15 min) em reator anaeróbio de leito fixo de fluxo ascendente (CORBARI *et al.*, 2019a).

Ainda, outro estudo utilizando o efluente de mandioca contendo concentração de ácido láctico (316 – 4100 mg L⁻¹) como substrato para alimentar um reator anaeróbio de biofilme em batelada sequencial (ASBBR), investigou um inóculo pré-tratado termicamente (95°C por 15min) e concluiu que este foi mais eficiente para a produção de BioH_2 em comparação com o inóculo proveniente da fermentação natural. Segundo os autores do estudo, o crescimento de bactérias lácticas autóctones do substrato foi responsável pela falha no uso da fermentação natural, indicando que a composição do substrato é muito relevante nesta estratégia de inoculação (ANDREANI *et al.*, 2019).

A literatura apresenta trabalhos, como o de Wang & Wan (2009), que argumentam que a utilização de inóculos com culturas mistas apresentam vantagens econômicas e operacionais, quando comparados com a utilização de culturas puras, além de apresentarem a possibilidade de utilizar diferentes tipos de substratos. Entretanto, a desvantagem de utilizar inóculos com culturas mistas está relacionada à presença de arqueias metanogênicas, homoacetogênicas e redutoras de sulfato e nitrato, que consomem o hidrogênio produzido pelas bactérias fermentativas acidogênicas (TREVISAN, 2020).

Neste contexto, a pesquisa de Castelló *et al.* (2020) concluíram que a instabilidade na produção de hidrogênio pode estar associada aos aspectos bióticos do processo, isto é, a alterações na composição da comunidade microbiana, como

a presença de organismos que consomem hidrogênio e competem pelo substrato e acúmulo de produtos de fermentação.

Apesar dos diferentes estudos, este trabalho escolheu o inóculo proveniente da fermentação natural da vinhaça de cana-de-açúcar, como já relatado em outros estudos de FE com vinhaça de cana-de-açúcar (SANCHÉZ et al., 2021). Desta forma, o inóculo é obtido de uma determinada quantidade de vinhaça exposta à atmosfera local durante 3-7 dias para estimular o crescimento de populações microbianas usando a vinhaça como meio de cultura, isto facilita o uso da vinhaça no processo da forma que é coletada na usina, sem necessitar de etapas de pré-tratamento.

3.7.6. Carga orgânica volumétrica - COVa

A COVa refere-se à quantidade de material orgânico por unidade de volume do reator que é submetida ao processo fermentativo em um determinado período de tempo (ARIMI et al., 2015).

Pesquisas de dados relacionam a produção de BioH₂ no FE com a COVa aplicada no reator (ARIMI et al., 2015). No entanto, diferentes modelos de reatores com diferentes fontes de alimentação podem operar melhor em diferentes faixas de COVa. Como o valor de COVa é o resultado da combinação entre TDH e concentração de substrato, o valor ótimo depende da capacidade de operação do sistema (ARIMI et al., 2015). A capacidade operacional entre as diversas configurações de reatores anaeróbios também pode estar ligada ao crescimento da biomassa em cada sistema e também deve ser considerada a biodegradabilidade de cada substrato (FUESS et al., 2016).

A COVa pode ser influenciada pela concentração do substrato e pelo tempo TDH, mas a variação desses parâmetros, afeta o sistema de forma diferente. Estudos mostram que o aumento da concentração do substrato gera um aumento na COVa, e isto pode melhorar a produção de BioH₂, mas altas concentrações de substrato podem gerar inibição no sistema ou mesmo mudanças nas vias microbianas. A COVa, influenciada pela concentração de substrato e tempo TDH, pode afetar negativamente o rendimento de BioH₂ enquanto aumenta a taxa de produção volumétrica

desviando o fluxo de elétrons para produtos finais reduzidos, por exemplo. vias solventogênicas e, nas causas graves, inibição imediata por excesso de substrato (HAFEZ et al., 2010).

A carga orgânica de efluentes reais geralmente varia devido a mudanças no processo industrial, e a COVa pode representar uma ferramenta para controlar a fermentação escura em reator contínuo. Fuess et al. (2019) otimizaram a COVa de um ASTBR para $70 \text{ gDQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ para produção de BioH_2 a partir de vinhaça de cana-de-açúcar a 55°C , e encontraram uma correlação direta entre rendimento de BioH_2 e via de produção de ácido butírico.

De fato, existe uma grande variabilidade de condições testadas para COVa e que são ótimas em diferentes situações considerando o tipo de reator e o efluente ou substrato utilizado. No estudo de Jung et al. (2010), os autores observaram um rendimento máximo de H_2 de $1,29 \text{ molH}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ hexose}$ em COVa de valor igual a $80 \text{ gDQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ em um UASB usando efluente de fabricação de bebida de café, enquanto Martins & Amorim (2016) atingiram o rendimento de hidrogênio igual a $2,45 \text{ molH}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ glicose}$ em COVa semelhante ($84 \text{ gDQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), mas usando outro tipo de substrato. Em contraste, Intanoo et al. (2016) observaram uma COVa igual a $25 \text{ gDQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ como valor limitante ao utilizar água residuária de mandioca como substrato na mesma configuração.

Estudos considerando valores de COVa acima de $90 \text{ gDQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ como Vilela et al. (2019) mostraram que um reator de leito estruturado de fluxo ascendente alimentado com melaço de cana resultou em uma taxa de produção de hidrogênio de $0,73 \text{ LH}_2 \cdot \text{L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ a COVa igual $120 \text{ gDQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, enquanto Anzola -Rojas et al. (2016) encontraram uma taxa de produção de hidrogênio no valor igual a doze vezes maior ($8,9 \text{ LH}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) em COVa igual a $96 \text{ gDQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$.

No entanto, como pode ser observado nos muitos exemplos citados, uma ampla faixa de valores de COVa ($20 - 120 \text{ gDQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) direciona a uma produção variada de BioH_2 em diferentes sistemas de FE. Alguns autores têm alcançado maior eficiência com o aumento da COVa. Em contrapartida, existem algumas limitações que devem ser consideradas, como sobrecargas do sistema (ANZOLA-ROJAS & ZAIAT, 2016; FERRAZ et al. 2014; WANG & WAN, 2009). Sendo assim, utilizar apenas a COVa como parâmetro chave pode não ser adequado em muitos casos, uma vez que a produção de BioH_2 ocorre através do metabolismo das bactérias fermentativas e o valor da COVa mede apenas a quantidade de matéria orgânica

aplicada no reator. Assim, é necessário ter um parâmetro que meça adequadamente a disponibilidade de substrato, ou seja, a relação alimento/microrganismo (F/M) para melhor relacionar a quantidade de substrato fornecida pela quantidade de biomassa retida em qualquer tipo de reator (HAFEZ *et al.*, 2010). Neste contexto, a COVe ganha espaço como um fator que influencia significativamente a produção de BioH₂ em sistemas fermentativos e informações sobre este parâmetro são descritas no item a seguir.

3.7.7. Carga orgânica volumétrica específica – COVe

Não é fácil discutir sobre a produção de BioH₂ por meio de rotas biotecnológicas. Nos últimos anos, vários grupos científicos têm argumentado sobre a produção biológica de BioH₂ e os principais desafios enfrentados no processo para manter os rendimentos de BioH₂ estáveis e contínuos em longos dias de operação como exemplo, o trabalho de Fuess *et al.* (2016). Para superar esses desafios, pesquisadores têm buscado avaliar a influência de diversos fatores no processo, principalmente aqueles relacionados ao desenvolvimento de microrganismos dentro dos reatores.

Estudos apontam a concentração celular como o principal fator na determinação de altas produções de BioH₂ por um longo período. Compreender e conhecer o acúmulo de biomassa fornece informações importantes sobre a influência da relação alimento e microrganismo (A/M) no reator, a qual representa o parâmetro COVe. O controle do parâmetro COVe pode ajudar a melhorar a produção de BioH₂ em diferentes sistemas. Além disso, o controle da COVe em sistemas acidogênicos ainda é pouco discutido na literatura, o que abre um leque de oportunidades de pesquisa sobre o acúmulo de biomassa relacionado com o controle da COVe, e ainda a decomposição anaeróbica de muitos substratos bem como a estabilidade da produção de BioH₂. Assim, este tipo de estudo científico dá uma visão ampla sobre as estratégias de controle COVe em diferentes sistemas.

Considerando o contexto de biomassa, novas propostas científicas têm investigado a COVe como um parâmetro ideal para comparar sistemas similares e diferentes no desempenho da produção de BioH₂, com base em faixas ótimas encontradas na literatura como a faixa igual a 4,0 – 6,0 gDQO g⁻¹SSV⁻¹ (HAFEZ *et al.*, 2010). Além disso, a COVe pode ser vista como a relação entre a COVa e a

concentração de células no reator, ou seja, um parâmetro que descreve a razão alimento/microrganismo. Sendo assim visto como o parâmetro chave que afeta a produção de BioH₂ em reatores acidogênicos.

É necessário entender que a COVa (gDQO L⁻¹d⁻¹) e a COVe (gDQO g⁻¹SSV d⁻¹) são dois fatores que têm um efeito importante no controle da biomassa dentro dos reatores e também no desempenho da produção de BioH₂ (CORBARI *et al.*, 2019a; HAFEZ *et al.*, 2010; ANZOLA-ROJAS & ZAIAT, 2016; ANZOLA-ROJAS *et al.*, 2016). Valores diferentes de COVe podem afetar a dinâmica da comunidade microbiana, interferindo na estabilidade da produção de hidrogênio. Resultados da literatura têm demonstrado que valores relativamente altos e a diminuição constante da COVe podem causar alterações negativas nas rotas metabólicas, contribuindo para a predominância de microrganismos consumidores de hidrogênio (HAFEZ *et al.*, 2010; ANZOLA-ROJAS *et al.*, 2016).

Ainda existe uma certa variação quanto aos valores de COVe relatados na literatura para a produção de hidrogênio. Dependendo do tipo de água residuária, a COVe pode variar entre valores de 10 a 100 g DQO g⁻¹ SSV d⁻¹, esta faixa de variação pode estar associada a condições operacionais estáveis em diferentes sistemas acidogênicos (ANZOLA-ROJAS *et al.*, 2015; FUESS *et al.*, 2016; BLANCO *et al.*, 2017). De fato, vários estudos demonstram que maiores rendimentos de hidrogênio tendem a ocorrer em uma COVe adequada como por exemplo, faixas de valores entre 4,4–6,4 gDQO g⁻¹ VSS d⁻¹ (FUESS *et al.*, 2016; HAFEZ *et al.*, 2010; ANZOLA-ROJAS *et al.*, 2015; BLANCO *et al.*, 2017) ou 2,0-7,0 gDQO g⁻¹SSV d⁻¹. A

Tabela 2 Tabela 2 apresenta diferentes valores COVe associados com diferentes configurações de reatores e alimentados com diferentes substratos.

De uma forma geral, os valores de COVe nas faixas recomendadas representam uma quantidade adequada de alimento para os microrganismos, tanto valores mais altos quanto mais baixos são adversos à estabilidade da produção de hidrogênio. Diferentes configurações de reator ou estratégias operacionais podem levar a diferentes faixas ótimas de COVa, mas a faixa ótima de COVe será a mesma para altos rendimentos de BioH₂ (ANZOLA-ROJAS *et al.*, 2015; FUESS *et al.* 2016).

De acordo com o estudo de Anzola-Rojas *et al.* (2015), valores elevados de COVe e a diminuição constante deste parâmetro podem causar alterações negativas nas vias metabólicas devido ao desenvolvimento de microrganismos consumidores de hidrogênio. Isso ocorre porque o acúmulo de biomassa pode causar uma baixa disponibilidade de substrato para os microrganismos, influenciando aqueles que vivem heterotroficamente e autotroficamente, a priorizar a rota autotrófica, o que resulta no consumo de H₂ e CO₂.

Segundo Anzola-Rojas & Zaiat (2016) valores maiores de COVe podem causar inibição por sobrecarga de substrato, enquanto valores menores de COVe podem indicar alterações na cultura microbiana, ambas desfavoráveis para a produção de hidrogênio. Ainda, estudos mostram que para valores de COVe mais baixos, ou seja, altas concentrações de biomassa, as condições de escassez de substrato tendem a aumentar a homoacetogênese (via Wood-Ljungdahl) (FONTES LIMA *et al.*, 2013), dentro do sistema. Além disso, estudos demonstraram que em reatores contínuos com imobilização de células a tendência da COVe é diminuir ao longo da operação, pois o crescimento natural da biomassa causa acúmulo de lodo no sistema, afetando negativamente a produção de hidrogênio (FUESS *et al.*, 2016; FERRAZ-JÚNIOR *et al.*, 2015).

É importante mencionar que as concentrações excessivas de biomassa podem fornecer limitações adicionais, como o estabelecimento de altas pressões parciais de H₂ em sistemas com suporte de material, o que também leva a alterações nas rotas metabólicas, resultando na produção de compostos intermediários, como ácidos propiônico e butírico (BRAGA *et al.*, 2016). A produção de ácidos na fermentação escura também é notada com a aplicação de cargas orgânicas crescentes como estratégia para superar as perdas de desempenho (HAFEZ *et al.*, 2010; PERNA *et al.*, 2013; FERRAZ JÚNIOR *et al.*, 2014). No entanto, esta

estratégia pode levar a condições de sobrecarga orgânica nos reatores, uma vez que altas concentrações de substrato são aplicadas em TDHs relativamente curtos. Como resultado, o acúmulo de ácidos orgânicos, principalmente os ácidos butírico e propiônico, é frequentemente relatado em sistemas acidogênicos operados com efluentes submetidos a cargas superiores a $100 \text{ kgDQOm}^{-3}\text{d}^{-1}$ (SEARMSIRIMONGKOL et al., 2011).

Tabela 2. Resumo de valores de COVe em que ocorreu produção de H₂.

Substrato	Inóculo	COVa	TDH	Tipo de reator	COVe	Referência
Glicose	Lodo anaeróbio	6,5-206 g DQO L ⁻¹ d ⁻¹	8 h	CSTR	4,4 - 6,4 g DQO g ⁻¹ SSV d ⁻¹	HAFEZ et al. (2010)
Sacarose	Autofermentação	2 g DQO L ⁻¹	2 h	ASTBR	4,8 g Sac g ⁻¹ SSV d ⁻¹	ANZOLA-ROJAS e ZAIAT (2015)
Sacarose	Autofermentação	12-96 g DQO L ⁻¹ d ⁻¹	2-4 h	ASTBR	3,8 – 6,2 g Sac g ⁻¹ SSV d ⁻¹	ANZOLA-ROJAS et al. (2016)
Vinhaça de cana-de-açúcar	Autofermentação	84,2 kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	7,5 h	APBR	6,3 - 6,4 g CH g ⁻¹ SSV d ⁻¹	FUESS et al. (2016)
Sacarose	Autofermentação	24 kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	2 h	ASTBR	4,2 - 6,9 g DQO g ⁻¹ SSV d ⁻¹	BLANCO et al. (2017)
Vinhaça de cana-de-açúcar	Autofermentação	40-120 kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	24-4h	ASTBR	2,0 - 7,0 g DQO g ⁻¹ SSV d ⁻¹	FUESS et al. (2019)
AR de fecularia de mandioca	Lodo anaeróbio e Autofermentação	10-20 g CH L ⁻¹ d ⁻¹	2-4h	AFBR	0,6-5,3 g Sac g ⁻¹ SSV d ⁻¹	CORBARI et al. (2019)
Soro de leite	Lodo anaeróbio	90-160 g lactose L ⁻¹ d ⁻¹	6h	CSTR	12-38 g DQO g ⁻¹ SSV d ⁻¹	MONTROYA-ROSALES et al. (2020)

Vinhaça de cana-de-açúcar	Autofermentação	20-90 kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	6-24h	ASTBR	1,0-5,0 g-DQO g SSV d ⁻¹	PIFFER et al. (2021)
Melaço de cana-de-açúcar	Autofermentação	86 kg DQO m ⁻³ d ⁻¹	6-12h	ASTBR	4,03–7.18 g-DQO g SSV d ⁻¹	FUESS et al. (2021)

Siglas: Reator: AFBR = reator anaeróbio de leito fluidizado (*anaerobic fluidized-bed reactor*), APBR = reator anaeróbio de leito empacotado (*anaerobic packed-bed reactor*), ASTBR = reator anaeróbio de leito estruturado (*anaerobic structured-bed reactor*); CSTR = reator anaeróbio continuamente agitado (*continuously stirred-tank reactor*), COVa = carga orgânica volumétrica aplicada (concentração de substrato), TDH = tempo de detenção hidráulica, COVe = carga volumétrica específica.

Fonte: Autor (2022).

O estudo de Peixoto et al. (2011) sugere que o crescimento excessivo de biomassa causado pela adição de nutrientes afetou o padrão hidrodinâmico do reator, dificultando a transferência de massa líquido-gás de hidrogênio. Além disso, na revisão de Castelló et al. (2020), os autores discutem que o crescimento excessivo de microrganismos em sistemas contínuos pode diminuir a carga orgânica específica devido ao acúmulo no leito que também leva a alterações no fluxo padrão, como curto-circuito e formação de zonas mortas. Desta forma, a COVe pode ser um fator chave de controle de biomassa no processo de digestão anaeróbica, uma vez que uma relação F/M adequada pode resultar em uma maior porcentagem do substrato sendo convertido em hidrogênio (WON & LAU, 2011).

No geral, pesquisas mostram que sistemas acidogênicos contínuos com retenção de biomassa apresentam um perfil de instabilidade da produção de BioH₂. Sistemas acidogênicos tem apresentado altos rendimentos de hidrogênio nos primeiros 10 – 20 dias de operação, mas esses rendimentos diminuem ao longo da operação até atingir rendimentos baixos ou próximos de zero (FONTES LIMA et al., 2013; PENTEADO et al., 2013; ANZOLA-ROJAS et al., 2015; GOMES et al., 2015; GOMES et al., 2016; TREVISAN et al., 2019). Segundo Hafez et al. (2010), Peixoto et al. (2011) e Anzola-Rojas et al. (2015), essa instabilidade pode estar associada a fatores como o acúmulo excessivo de biomassa nos reatores. Por outro lado, pesquisa como Ferraz Jr. et al. (2014) argumentam que essa instabilidade está relacionada à aplicação de sub ou sobrecargas orgânicas em sistemas acidogênicos.

Em resumo, é muito importante considerar o controle COVe em sistemas de FE, pois o crescimento excessivo de biomassa tende a afetar o padrão de fluxo no reator, limitando a transferência de massa líquido-gás. Além disso, pode promover o estabelecimento de microrganismos consumidores de hidrogênio no sistema e também a produção de ácidos ou solventes. Desta forma, o controle de COVe pode ser a principal estratégia para superar as limitações de rendimento na fermentação escura, pois os valores obtidos a partir da razão F/M podem ajudar a entender e conhecer a relação entre a COVa e o acúmulo de biomassa, levando a aumentos no rendimento de biomassa e podem também ser essencial para a produção de BioH₂ em condições de maior tempo de operação.

3.7.8. Configuração de reatores

Os sistemas anaeróbios têm sido desenvolvidos desde o final do século XIX. Esses sistemas foram criados para o tratamento de resíduos e semissólidos biológicos, como esterco animal, resíduos domésticos e estabilização de lodo de efluentes primários e secundários (MCCARTY, 1982; VAN HAANDEL *et al.*, 2006).

Como resultado, esses primeiros sistemas são caracterizados como sistemas de taxa baixa (BAL & DHAGAT, 2001a; VAN HAANDEL *et al.*, 2006). A redução do TDH neste sistema convencional diminui o número de sólidos biológicos dentro do reator induzido pela lavagem de biomassa na corrente efluente (BJÖRNSSON *et al.*, 1997; RAJESHWARI *et al.*, 2000; SCHINK, 2002). No entanto, a manutenção da atividade biológica é necessária para valores elevados de TDH independente da taxa de crescimento dos microrganismos, seja rápido ou lento. Por isso, essas configurações de baixa taxa foram consideradas sistemas limitados quando aplicadas a processos anaeróbios envolvendo resíduos altamente concentrados (BAL & DHAGAT, 2001b).

A partir da década de 1970, reatores anaeróbios de contato foram desenvolvidos para tratar efluentes líquidos, como efluentes industriais. Esses reatores estão associados a maiores níveis de retenção celular e dão origem a uma melhor interação entre a biomassa e o substrato em baixos valores de TDH (CHERNICHARO *et al.*, 2015; LETTINGA, 1995). Os novos processos de alta taxa permitem três mecanismos básicos de imobilização da biomassa: (i) formação de grânulos altamente sedimentáveis (automobilização), combinados com estruturas que permitem a separação do biogás e a sedimentação do lodo granular, (ii) adesão de microrganismos em materiais de suporte que podem ser fluidizados devido à aplicação de velocidades de ascensão apropriadas, e (iii) retenção de agregados de lodo e formação de biofilme em material suporte fixo dentro de um reator (BAL & DHAGAT, 2001b; CHERNICHARO *et al.*, 2015).

Os reatores de alta taxa foram desenvolvidos porque grandes volumes de efluentes devem ser tratados, e biorreatores projetados de forma otimizada podem diminuir o tempo de tratamento enquanto aumentam a eficiência do tratamento, resultando em altos rendimentos de energia. Além disso, essas configurações são consideradas robustas, simples e podem reduzir o custo do bioprocessamento, além de torná-lo mais eficiente e adequado à proteção ambiental (LETTINGA *et al.*, 1999). No entanto, reatores anaeróbios de alta taxa foram usados pela primeira vez na

produção de metano depois que essas configurações foram usadas e modificadas para a produção de BioH₂ a partir de diferentes efluentes industriais (MCCARTY, 2001).

Neste contexto, nas últimas décadas tem aparecido várias tecnologias novas e modificadas visando melhorar o crescimento de biomassa, seja a partir de sistemas com células suspensas, células aderidas, sistemas de filmes fixos, ou ainda as combinações deles (BAL & DHAGAT, 2001). Segundo Oliveira *et al.* (2020), a produção de BioH₂ em processos fermentativos está relacionada a diversos parâmetros e um dos mais importantes é a configuração do reator. Portanto, vários estudos relataram diferentes tipos de configurações de reatores aplicados em sistemas acidogênicos (BANU *et al.*, 2021); FUESS *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2020). Os mesmos tipos de reatores aplicados em sistemas anaeróbios convencionais, isto é, direcionados à produção de metano (CH₄), podem ser aplicados na produção de BioH₂. Ainda, trabalhos sobre a aplicação de diferentes configurações de reatores podem ser encontrados na literatura para obter maiores rendimentos de hidrogênio e melhorar as taxas de produção volumétrica desse biogás (PARSAEE *et al.*, 2019; CASTELLÓ *et al.*, 2020). Alguns exemplos de configurações de reatores utilizadas na produção de BioH₂ por via biológica são: reatores de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB - *upflow anaerobic sludge blanket reactor*), reatores de leito fixo (APBR - *anaerobic packed-bed reactor*) e reatores de leito fluidizado (AFBR - *anaerobic fluidized-bed reactor*), leito de lodo granular expandido (EGSB), biorreatores de membrana (MB), reator de mistura perfeita (CSTR) e reatores contínuos de tubos múltiplos (RCTM) (LEITE *et al.*, 2008; FONTES-LIMA *et al.*, 2013; GOMES *et al.*, 2015 e 2016; FUESS *et al.*, 2017 e 2019; CORBARI *et al.*, 2019; OLIVEIRA *et al.*, 2020).

Não é simples definir o tipo de configuração do reator adequado ao bioprocesso energético. Otimização e estudos são necessários. Na literatura, o reator mais utilizado é o modo de operação em batelada devido à facilidade de operação e controle, mas para operações em larga escala a produção contínua é utilizada por razões práticas de engenharia (WANG & WAN, 2009).

Para obter uma produção contínua e estável de hidrogênio, estratégias operacionais apropriadas precisam ser adotadas para cada tipo de reator. Vários estudos mostraram que o principal desafio dos sistemas acidogênicos é diminuir a instabilidade na produção de hidrogênio que pode estar relacionada a COVa e a

relação alimento-microrganismo (F/M), que pode atingir valores que diminuem ou aumentam a produção de hidrogênio. (HAFEZ *et al.*, 2010; TREVISAN *et al.*, 2019; DAMASCENO *et al.*, 2008; MOCKAITIS *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Estudos argumentam que os reatores de células imobilizadas os quais possuem biomassa que fica aderida à superfície do material de suporte é uma configuração robusta em comparação com sistemas com células suspensas (células em meio líquido) para separar as fases líquida e sólida de forma mais eficiente e suporta a aplicação de altas taxas de carga orgânica (COV) (FUESS *et al.*, 2017; FUESS *et al.*, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2020). Assim, uma variedade de materiais pode ser utilizada como material de suporte. Nos casos em que o reator com células suspensas é semelhante a um reator uniforme, não há material de suporte para a adesão do microrganismo. A literatura apresenta diversos trabalhos sobre os tipos de materiais utilizados como material de suporte em reatores de células imobilizadas. Os mais utilizados são carvão ativado e partículas de rocha, espuma de poliuretano, anéis plásticos e cerâmicos (FERNANDES *et al.*, 2013; RAJESHWARI *et al.*, 2000). Exemplos desse tipo de configuração são os reatores anaeróbios de leito empacotado – APBR (LEITE *et al.*, 2008; PEIXOTO *et al.*, 2011; PENTEADO *et al.*, 2013), e os reatores anaeróbios de leito fluidizado – AFBR (CHAVES *et al.*, 2021; GOMES *et al.*, 2015).

A utilização da configuração de reator anaeróbio de leito fixo na produção de hidrogênio tem sido objeto de vários estudos. Na literatura é possível encontrar estudos deste reator relacionado à: material suporte, porosidade do leito, TDH (FERNANDES, 2008; ANDREANI *et al.*, 2015), condição de mistura (FONTES LIMA & ZAIAT, 2012), origem e formas de pré-tratamento do inóculo (PENTEADO *et al.*, 2013), concentração de cálcio (BLANCO *et al.*, 2017), relação carbono/nitrogênio e controle da carga orgânica volumétrica específica (COVe) (ANZOLA-ROJAS *et al.*, 2015). Anzola-Rojas *et al.* (2015) apresentam que na operação do reator anaeróbio de leito fixo, em diferentes condições, foram identificadas anomalias hidrodinâmicas (curtos circuitos e zonas mortas), devido ao acúmulo de biomassa que pode ter dificultado a liberação do biogás produzido e provocado a diminuição constante da COVe (ANZOLA-ROJAS, 2014).

A Tabela 3 apresenta trabalhos dos últimos 20 anos que mostram configurações de reatores utilizados na produção de hidrogênio. Após um estudo de coleta de dados, verificou-se que os dois tipos de configuração de reatores mais

utilizados na produção de hidrogênio foram o reator contínuo de mistura perfeita (CSTR) e o reator anaeróbio de leito empacotado (APBR). Observa-se o uso de reator anaeróbio de manta de lodo (UASB) e as configurações menos utilizadas foram digestor anaeróbio tipo termostato (CTAD) e reator anaeróbio (ABR). Desde 2015, a configuração RCTM tem sido aplicada na fermentação escura como um novo tipo de reator para melhorar o rendimento de hidrogênio e o controle da biomassa dentro do reator.

Na configuração CSTR, a taxa de crescimento microbiano é controlada pelo tempo de detenção hidráulica (TDH), igual ao tempo de retenção celular (TRC). Para que este sistema funcione melhor, o parâmetro TDH deve ser maior que a velocidade máxima de crescimento da bactéria, pois valores menores causariam uma diluição e, conseqüentemente, a lavagem do sistema (HALLENBECK, 2009). De acordo com Castelló et al. (2020) os reatores CSTR operam com o TDH igual à TRC. Outros reatores com retenção de biomassa, como UASB, EGSB, AFBR e RCTM, o TDH também afeta a comunidade microbiana; logo o TDH ideal dependerá principalmente de operação de sistemas com substratos utilizados em valores de TDH na faixa de 4-24h.

O UASB é uma configuração muito utilizada para efluentes de diferentes águas residuais. Altas cargas orgânicas podem danificar o sistema causando lavagem de biomassa suspensa. O maior desafio no reator UASB é a ocorrência de grânulos, ou seja, após a inoculação do reator, é necessário ter a formação de grânulos para que ocorra a retenção de bactérias (JHUNG & CHOI, 1995). Embora esses reatores não possuam material de suporte, sua estrutura é simples, fácil de operar e possuem pouca perda de biomassa (JHUNG & CHOI, 1995; SEGHEZZO et al., 1998).

A grande vantagem dessa configuração de reator, quando comparada um sistema de leito fluidizado, é que necessita de menos investimentos. Uma desvantagem deste sistema é que tem um longo tempo de partida e precisa de uma quantidade suficiente de lodo de semente granular para partidas mais rápidas (RAJESHWARI et al., 2000) afirmam que no reator UASB são necessários longos períodos de 10-12 horas para que ocorra a produção de hidrogênio quando o reator é inoculado com lodo granular. No entanto, a produção de hidrogênio leva 70 horas quando o reator é inicializado com grãos desagregados.

Tabela 3. Apresentação de trabalhos dos últimos 20 anos sobre as principais configurações dos reatores utilizados na produção de hidrogênio.

Tipo de reator	Substrato	Condições operacionais	Rendimento de H ₂	Referência
CSTR (170 L)	Melaço de cana-de-açúcar DQO = 128 g L ⁻¹	T = 30 – 37 °C TDH = 7 d	8,4 LH ₂ L ⁻¹ vinhaça	VATSALA (1992)
CTAD (4 L)	Água sintética DQO = 20 g L ⁻¹	T = 35 °C COV = 52 – 416 mmol glicose m ⁻³ d ⁻¹ TDH = 0,25 – 2 d	33,3 – 711 mmolH ₂ mol ⁻¹ glicose	LIN & CHANG (1999)
CSTR (1.2 L)	Leite de soja	T = 35 °C COV = 52 – 416 mmol glicose m ⁻³ d ⁻¹ TDH = 10 h	2,54 molH ₂ mol ⁻¹ hexose	MIZUNO et al. (2000)
UASB (3 L)	Água residuária de arroz DQO = 14 – 36 g L ⁻¹	T = 20 – 55 °C TDH = 2 – 24 h	1,37 – 2,14 molH ₂ mol ⁻¹ hexose	YU et al. (2002)
ANSBR (5 L)	Água sintética DQO = 20 g L ⁻¹	T = 35 °C COV = 40 – 120 kg DQO m ⁻³ d ⁻¹ TDH = 4 – 12 h	0,6 – 2,6 molH ₂ mol ⁻¹ sacarose	LIN & JO (2003)
UASB (3 L)	Água sintética DQO = 20 g L ⁻¹	T = 35 °C TDH = 4 – 24 h	53,5 mmol H ₂ d ⁻¹	CHANG & LIN, (2004)

UASB (8 L)	Água residuária cítrica DQO = 15 – 21 g L ⁻¹	T = 35 – 38 °C COV = 10 – 75 kg DQO m ⁻³ d ⁻¹ TDH = 8 – 48 h	0,84 molH ₂ mol ⁻¹ hexose	YANG et al. (2006)
CSTR (3 L)	Soro de queijo DQO = 86,3 g L ⁻¹	T = 55 °C COV = 21, 35 e 47 kg DQO m ⁻³ d ⁻¹ TDH = 1, 2 e 3,5 d	5 – 22 mmolH ₂ g ⁻¹ DQO	BLANCO et al., (2019)
ASBR (7 L)	Tequila DQO = 29,9 – 30,5 g L ⁻¹	T = 35 °C COV = 18 – 30 kg DQO m ⁻³ d ⁻¹ TDH = 24 h	44,4 – 57,6 mLH ₂ g ⁻¹ DQO	BUITRÓN; CARVAJAL (2010)
CSTR (2 L)	Manipueira DQO = 61,9 g L ⁻¹	T = 55 °C COV = 3 kg SV m ⁻³ d ⁻¹ TDH = 3 d	69 mLH ₂ g ⁻¹ SV	LUO et al. (2011)
ABR (24 L)	Tapioca DQO = 16,3 g L ⁻¹	T = 32.3 °C COV = 16,15 g DQO L ⁻¹ d ⁻¹ TDH = 3 – 24 h	5,7 – 18,7 mLH ₂ g ⁻¹ DQO	THANWISED et al. (2012)
APBR (3,75 L)	Soro de queijo DQO = 25 g L ⁻¹	T = 30 °C COV = 22 – 37 kg DQO m ⁻³ d ⁻¹ TDH = 24h	1,1 molH ₂ mol ⁻¹ lactose	PERNA et al. (2013)
APBR (2,3 L)	Vinhaça de cana-de- açúcar DQO = 35,2 g L ⁻¹	T = 55 °C COV = 54,3 – 108 kg DQO m ⁻³ d ⁻¹ TDH = 24-8 h	0,3 – 1,4 molH ₂ mol ⁻¹ CH	FERRAZ JÚNIOR et al. (2014)

APBR (2,3 L)	Vinhaça de cana-de-açúcar DQO = 35,2 g L ⁻¹	T = 55 °C COV = 84,2 kg DQO m ⁻³ d ⁻¹ TDH = 10,2 h	1,6 molH ₂ mol ⁻¹ CH	FERRAZ JÚNIOR et al. (2015a)
APBR (2,3 L)	Vinhaça de cana-de-açúcar DQO = 35,2 g L ⁻¹	T = 25 °C COV = 36,4 kg DQO m ⁻³ d ⁻¹ TDH = 24 h	0,6 molH ₂ mol ⁻¹ CH	FERRAZ JÚNIOR et al. (2015b)
RCTM (1 L)	Água sintética DQO = 2 – 4 g L ⁻¹	T = 25 °C COV = 24 g DQO L ⁻¹ d ⁻¹ TDH = 2 – 4 h	0,4 – 0,5 molH ₂ mol ⁻¹ CH	GOMES et al. (2015)
RCTM (1 L)	Manipueira DQO = 55 g L ⁻¹	T = 25 °C COV = 24 g DQO L ⁻¹ d ⁻¹ TDH = 4 h	0,73 molH ₂ mol ⁻¹ CH	GOMES et al. (2016)
CSTR (2 L)	Água sintética	TDH = 6 – 24 h	0,86 molH ₂ mol ⁻¹ lactose	PALOMO- BRIONES et al. (2017)
APBR (2,3 L)	Vinhaça de cana-de-açúcar DQO = 20 – 30 g L ⁻¹	T = 55 °C COV = 82,4 kg DQO m ⁻³ d ⁻¹ TDH = 7,5 h	1,6 – 3,0 molH ₂ molCH ⁻¹	FUESS <i>et al.</i> (2018b)
CSTR (2L)	Água sintética DQO = 3 – 10 g L ⁻¹	T = 37 °C TDH = 169 h	0,3 – 1,4 molH ₂ mol ⁻¹ CH	PACHIEGA <i>et al.</i> (2019)
ANSTBR (1,9 L)	Vinhaça de cana-de-açúcar DQO = 19,5 – 49 g L ⁻¹	T = 55 °C COV = 40 – 120 kg DQO m ⁻³ d ⁻¹ TDH = 6 – 24 h	0,2 – 15,6 mmolH ₂ g ⁻¹ CH	FUESS et al. (2019)

RCTM (1 L)	Água sintética DQO = 2 – 4 g L ⁻¹	T = 25 °C COV = 24 – 48 g DQO L ⁻¹ d ⁻¹ TDH = 2 h	0,48 – 0,51mmolH ₂ g ⁻¹ CH	TREVISAN et al. (2019)
ANSTBR	Melaço de cana-de- açúcar DQO = 7308 gO ₂ kg ⁻¹ moles	T = 55 °C COV = 60 g DQO L ⁻¹ d ⁻¹ TDH = 4 h	1,18 molH ₂ molCH ⁻¹	OLIVEIRA et al. (2020)

Legenda: CSTR = reator contínuo de mistura perfeita, CTAD = digestor anaeróbio tipo termostato, UASB = reator anaeróbio de manta de lodo, ASBR= reator anaeróbio de batelada sequencial, ABR = reator anaeróbio, ASBR = reator anaeróbio de batelada sequencial, APBR = reator anaeróbio de eleito empacotado, RCTM= reator continuo de tubos múltiplos, ANSTBR = reator anaeróbio de leito estruturado. Condições operacionais: DQO = demanda química de oxigênio, T = temperatura, COV = carga orgânica volumétrica, TDH = tempo de detenção hidráulico. Fonte: Autor (2022).

Em estudo realizado por FERRAZ JÚNIOR et al. (2015b), o melhor material utilizado em uma APBR alimentada com vinhaça de cana-de-açúcar é o polietileno de baixa densidade em relação à argila expandida por ser um material com baixa suscetibilidade ao desgaste. No entanto, a principal limitação desse tipo de configuração é o entupimento do leito em operações de longa duração que pode ser causado pelo acúmulo de sólidos em suspensão, resultando em falhas operacionais como a formação de caminhos preferenciais e zonas mortas (van LIER et al., 2015).

O ASTBR é utilizado em sistemas acidogênicos para produzir hidrogênio a partir da vinhaça para evitar problemas operacionais como entupimento do leito e lavagem de biomassa durante a aplicação de altas cargas hidráulicas e orgânicas (FUESS et al., 2017). Os ASTBR são reatores com suporte de material e funcionam da seguinte forma: o fluxo de efluente é alimentado no reator por um caminho ascendente, passa por uma região de suporte de material quando o biofilme é formado por células imobilizadas. A fração líquida do reator contendo microrganismos pode ser coletada por uma saída de efluente, por fim, o biogás produzido é coletado na saída de gás (BLANCO et al., 2019; NIZ et al., 2019). As principais diferenças entre APBR e ASTBR é o tipo de material utilizado como suporte e a forma de organização desse material.

De uma forma geral, é possível verificar na literatura que a maioria dos estudos de fermentação escura vem sendo realizados em configurações de reatores de modo batelada, por outro lado também são relatadas, operações com reatores contínuos usando diferentes substratos e consórcios microbianos (GRANGEIRO et al., 2019). Vale ressaltar que a maioria dos estudos de produção de hidrogênio tem focado em batelada devido a facilidade e flexibilidade destes sistemas (WANG & WAN, 2009). Entretanto, quando o objetivo é desenvolver uma operação em grande escala, processos de produção contínua são os mais indicados por razões práticas de engenharia.

Portanto, a escolha do projeto de reator e a sua construção é um fator que influencia o rendimento do processo fermentativo de produção de hidrogênio, uma vez que este a estrutura do reator afetará a retenção da biomassa, o comportamento hidrodinâmico, a população microbiana e a efetividade do contato substrato/biomassa (GRANGEIRO et al., 2019; TREVISAN, 2020).

3.8. Reatores contínuos de tubos múltiplos

Pesquisas conduzidas para superar limitações na produção de BioH₂ em vários aspectos mostram que o controle da concentração de biomassa é uma das características mais importantes (TREVISAN, 2020).

Neste contexto, é relevante investigar configurações de reatores que auxiliem no controle da COVe, promovendo uma lavagem de biomassa de forma controlada e ininterrupta, assim, oferecendo condições de maior autossuficiência operacional. Essa condição representa uma vantagem operacional em relação aos processos que dependem de interrupções para descarte do excesso de biomassa, como é apresentado em alguns reatores com crescimento de biomassa aderido em material suporte (FUESS et al., 2016).

Considerando os desafios da produção biológica de hidrogênio associado ao controle de concentração celular dentro dos reatores para alcançar a produção de bioenergia estável a longo prazo, configuração de reator contínuo de tubos múltiplos (RCTM) surge como uma configuração de reator com potencial para controlar a COVe em sistemas de FE, e superar as dificuldades de manutenção e problemas de instabilidade na produção de H₂, associados à falta de biomassa.

O RCTM é uma configuração que se destaca como uma unidade de trabalho proposta para produzir BioH₂ sem suporte material uma vez que sua estrutura apresenta uma região de tubos. Por sua vez, esta região de tubos é composta por vários tubos paralelos de pequeno diâmetro com ranhuras nas paredes internas para facilitar a adesão de microrganismos à superfície, proporcionar uma alta relação comprimento/diâmetro e consequentemente melhorar o controle sobre a velocidade superficial do fluxo no “leito” proporcionando, assim, o melhor controle sobre a COVe (GOMES *et al.*, 2015, 2016; TREVISAN *et al.*, 2019).

De forma simples, a proposta é utilizar o interior dos tubos como material de suporte e área para o desenvolvimento do biofilme (biomassa), caracterizando a nova configuração como um reator híbrido de células imobilizadas simples e de baixo custo quando comparado aos reatores de leito fixo (APBR, ASTBR). Quando se refere a este reator como híbrido é devido ser visto como uma configuração intermediária entre um reator de tubo único sem leito e um reator de leito fixo empacotado, uma vez que a região de tubos funciona como o material suporte para desenvolvimento de biofilme e nas câmaras de entrada e saídas apresenta área livre para crescimento de células

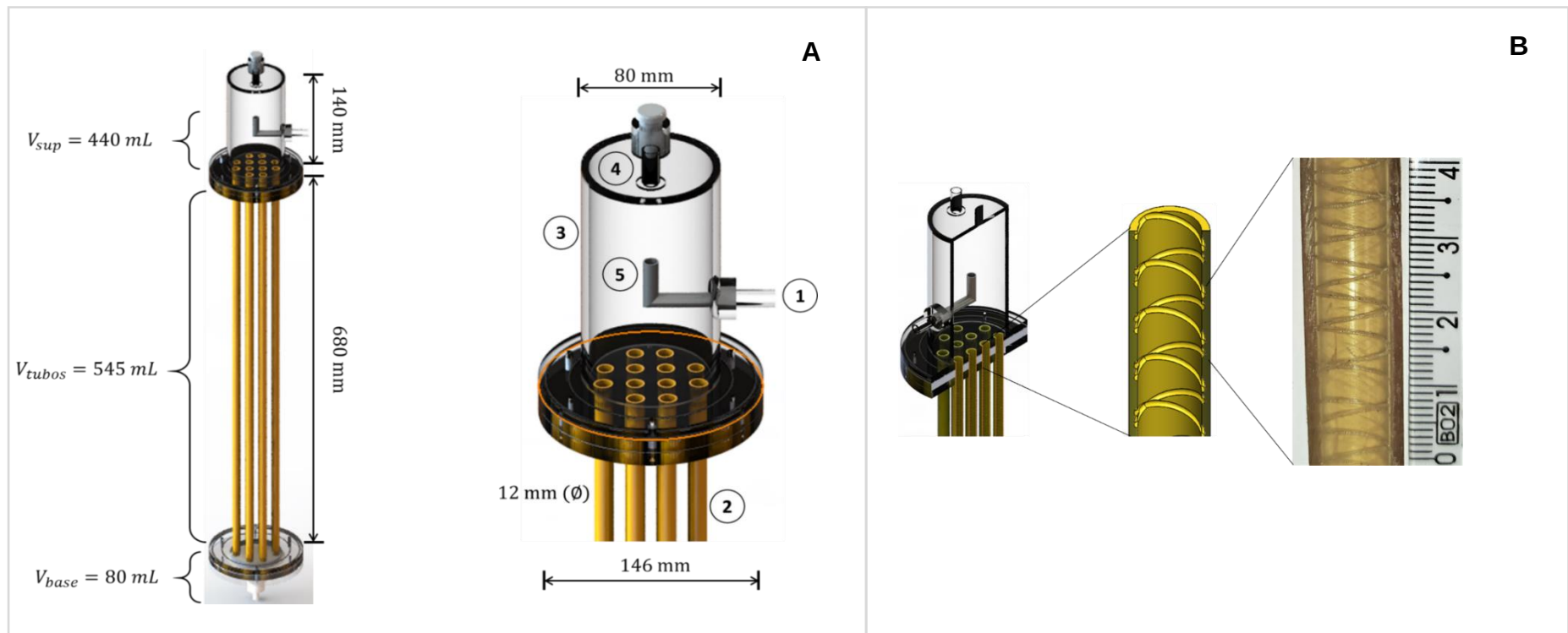
suspensas. Além disso, o RCTM é análogo aos reatores multitubulares comumente usados em processos químicos, nos quais o controle adequado da temperatura é fornecido pela maior área de superfície (comparado aos reatores de tubo único). Outro ponto relevante a ser citado é que a estrutura desta configuração de reator pode proporcionar uma maior área de superfície para fixação de biomassa em relação aos reatores tubulares convencionais sem material de suporte (GOMES et al., 2015).

Alguns pesquisadores, como Anzola-Rojas et al. (2015), relatam que COVe é um fator significativo na produção contínua e estável de BioH₂, pois observa-se que altos valores de COVe podem afetar a conversão de substratos e causar alterações nas rotas metabólicas de microrganismos durante a FE. Portanto, o RCTM é proposto como uma nova abordagem para controlar a FE em função da COVe.

Este reator foi investigado pela primeira vez por Gomes et al. (2015) e posteriormente por Trevisan et al. (2019) e Trevisan (2020) e outros trabalhos ainda não publicados, porém, não há estudo da configuração RCTM na produção de BioH₂ a partir de vinhaça de cana-de-açúcar.

Antes de citar a performance do RCTM nos poucos estudos já realizados, é necessário entender as suas características construtivas. Assim, O RCTM é dividido em três partes: câmaras de entrada e saída, confeccionadas em acrílico, e região intermediária de tubos de policloreto de vinila (PVC). A superfície interna dos tubos apresenta ranhuras no formato de rosca sem fim, com o objetivo de melhorar a adesão da biomassa. Estas ranhuras apresentam espaçamento de aproximadamente 0,5 cm e 0,1mm de profundidade. As características construtivas do reator e a indicação das ranhuras confeccionadas são apresentadas na Figura 4 (GOMES et al. 2015).

Figura 4. Características construtivas do RCTM: A) dimensões do reator e B) ranhuras confeccionadas nas paredes internas dos tubos no formato rosca sem fim. Legenda: 1) saída de efluente, 2) tubos de PVC, 3) câmara de saída do efluente, 4) saída do biogás, 5) dreno do efluente.



Fonte: Adaptado de Trevisan (2020).

A configuração RCTM já foi investigada em relação ao TDH, material de suporte na câmara de saída, diferentes concentrações do meio sintético e água residuária de mandioca em termos de DQO (demanda química de oxigênio), estratégias de alimentação (GOMES et al., 2015) e acúmulo e fixação de biomassa dentro desses reatores (GOMES et al., 2015, 2016; TREVISAN et al., 2019).. Esses estudos abordaram testes de RCTM com doze tubos (RCTM12) em fermentação escura de efluente sintético à base de sacarose e efluente de mandioca, e dados de acúmulo de biomassa relacionados dentro do reator através do controle de COV, COVe e baixos rendimentos de hidrogênio.

Devido à dificuldade de manter a produção de BioH₂ no RCTM por longos períodos, (GOMES et al., 2015) sugeriram aumentar a rugosidade interna dos tubos, como estratégia para promover maior retenção de biomassa no reator, e assim atingir valores de COVe mais próximos da faixa recomendada na literatura por (ANZOLA-ROJAS et al., 2015).

O estudo de Gomes et al. (2015) mostrou que os altos valores de COVe caracterizados pelo excesso de substrato podem ter influenciado o comportamento da biomassa produtora de BioH₂ diante do estabelecimento de condições de sobrecarga orgânica. Estudos anteriores em sistemas acidogênicos relataram o estabelecimento de homoacetogênese em condições de excesso de substrato, tendo em vista a inibição da via heterotrófica para obtenção de energia. Ainda, os autores consideraram que a produção contínua de BioH₂ por longos períodos não foi alcançada devido à menor fixação da biomassa nas paredes internas dos tubos e consequentemente uma grande lavagem dos microrganismos do reator.

Gomes et al. (2016) operaram o mesmo reator RCTM com 12 tubos com efluente de farinha de mandioca (manipueira) e observaram um comportamento semelhante ao descrito por Gomes et al. (2015) com produção de BioH₂ apenas nos primeiros dias de operação do reator. No entanto, as limitações associadas ao tipo de efluente utilizado, ou seja, uma inibição por nisinias produzidas por bactérias lácticas nativas do resíduo, limitaram a avaliação tecnológica da configuração nesse caso.

Neste cenário, Trevisan et al. (2019) aumentaram a rugosidade da parte interna dos tubos para melhorar a capacidade de controle da biomassa no RCTM. Ainda, estudaram a influência do TDH e da concentração de substrato na produção contínua de BioH₂ a partir de efluentes sintéticos à base de sacarose. A hipótese levantada sobre o potencial do RCTM foi comprovada, pois a produção contínua de BioH₂ foi

registrada por períodos de aproximadamente 100 dias, superiores aos períodos máximos relatados em muitos estudos: 25 dias (GOMES *et al.*, 2016), 30 dias (CASTELLÓ *et al.*, 2018), 30 dias (ANDREANI *et al.*, 2019) e 38 dias (CORBARI *et al.*, 2019).

Em estudo posterior, Trevisan (2020) mostrou que o RCTM com 12 tubos com ranhuras no interior dos tubos no formato rosca sem fim, atingiu a produção contínua de BioH₂ por longos períodos, sem a necessidade de utilização de estratégias operacionais para o descarte da biomassa. A produção ocorreu durante longos períodos de operação (~ 90 dias), em condições de faixa de valores médios de COVe, entre 4,39 e 19,8g sacarose g⁻¹ SSV d⁻¹. Ainda, a produção de BioH₂ se mostrou dependente da concentração do substrato, indicando inibição do processo, a partir de DQO afluyente de 12g L⁻¹ (COVa=72 g DQO L⁻¹ d⁻¹; TDH=4h). Em que, o melhor desempenho do RCTM, na produção de BioH₂ (PVH=1593,6 mL H₂ L⁻¹ d⁻¹; HY=0,50 mol H₂ mol⁻¹ sac), foi obtido na condição em que a COVa foi igual a 48g DQO L⁻¹ d⁻¹ (DQO 4000mg DQO L⁻¹; TDH 2h). Em termos de metabólitos secundários produzidos durante a operação dos ensaios, obteve-se: ácido acético, ácido láctico, etanol e ácido butírico.

Ainda sobre o estudo de Trevisan (2020) em termos de informações sobre o controle de COVe, é importante citar que a autora identificou que a lavagem contínua de biomassa resultante desta configuração de reator, o que permitiu a manutenção de valores de COVe adequados para a produção de BioH₂ na faixa de valores igual a 4,3 – 6,9 g DQO g⁻¹SSV d⁻¹ durante o período total do experimento, tais resultados foram confirmados por Hafez *et al.* (2010), Anzola-Rojas *et al.* (2015) e Trevisan (2020). De uma forma geral, estudos sugerem que na faixa de valores indicados para COVe, a taxa de crescimento dos microrganismos é favorecida pela relação F/M, que interfere na estabilidade da produção e no rendimento de BioH₂. Valores relativamente altos ou muito baixos de COVe podem causar alterações na comunidade microbiana, como a presença de organismos que consomem hidrogênio e competem pelo substrato (ANZOLA-ROJAS *et al.*, 2015, GOMES *et al.*, 2015, FUESS *et al.*, 2016, TREVISAN *et al.*, 2019, TREVISAN 2020).

Embora Trevisan *et al.* (2019) e Trevisan (2020) tenham estudado obtido a produção contínua de BioH₂ por longos períodos, os perfis de produção ainda são instáveis, com grande variação ao longo do tempo até atingir regime permanente. Esta

instabilidade tem sido observada com frequência em estudos com produção biológica de BioH₂ (GOMES et al., 2015; ANZOLA-ROJAS et al., 2016).

Os resultados de rendimento de BioH₂ observados nos trabalhos de Gomes et al. (2015) e Trevisan (2020), apresentaram valores semelhantes, porém, o aumento da DQO (2000 para 4000 g DQO L⁻¹) afetou negativamente o valor de rendimento de BioH₂. Comparando os resultados de rendimentos obtidos com dados da literatura, Anzola-Rojas et al. (2015) obteve para um reator de leito fixo e fluxo ascendente, também alimentado com efluente sintético à base de sacarose como fonte de carbono e COVa de 24 g DQO L⁻¹ d⁻¹, valor igual a 3,5 mol H₂ mol⁻¹ sac, superior aos obtidos nos ensaios estudados. Lima e Zaiat (2012) também observaram melhor desempenho que o RCTM a partir da operação de um APBR com diferentes taxas de recirculação (0,25; 0,5; 1,0 e 2,0). Neste caso, os valores de rendimento de H₂ variaram de 0,9 a 1,4 mol H₂ mol⁻¹ sac.

Ainda sobre os trabalhos de Gomes et al. (2015) e Trevisan (2020), os autores obtiveram o valor médio do pH de operação inferior a 5, quando comparado ao pH inicial de 6,5. Estudos mostram que o pH ótimo, em termos de produção de hidrogênio, está na faixa de 5 a 7, com um pH em torno de 5,5 relacionado aos melhores rendimentos de produção de hidrogênio (KHANAL et al., 2004; VAN GINKEL et al., 2001). O comportamento apresentado pela literatura aponta a produção de BioH₂ em pH mais elevado. Essas alterações nos valores de pH podem estar relacionadas principalmente à acidificação do meio pela ação de metabólitos produzidos durante a fermentação.

Com base em todos os resultados citados, o RCTM ainda precisa ser investigado a nível não apenas de controle de parâmetros ao longo da FE, mas também a nível de estrutura de reator para tentar melhorar seu desempenho em termos de controle de COVe e produção de BioH₂.

Considerando o cenário de oportunidades de estudo para o RCTM, este projeto de doutorado estudou dois RCTMs modificados. Os novos RCTM, sendo um com 10 tubos (RCTM10) e outro com 18 tubos (RCTM18) possuem características construtivas semelhantes as citadas em Gomes et al. (2015), (2026), Trevisan et al. (2019) e Trevisan (2020).

Desta forma, é importante mencionar que as primeiras operações com RCTM12 foram caracterizadas por instabilidade durante a produção de BioH₂, em que ao mesmo tempo que ocorre uma produção de gás contínua em períodos de 90-100

dias, ainda são obtidos rendimentos pouco maiores que $0,6 \text{ molH}_2 \text{ molCH}^{-1}$. E ao considerar estas limitações, é válido desenvolver mais pesquisas científicas em nível de bancada para testar essa configuração e verificar, por exemplo, se o aumento do número de tubos pode influenciar na produção de biohidrogênio, pois permite o aumento da área superficial do reator e pode oferecer mais espaço para aderência da biomassa, entre outros fatores.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo são apresentados os materiais e procedimentos metodológicos utilizados para alcançar os objetivos principal e específicos deste projeto de doutorado. Os principais tópicos incluem:

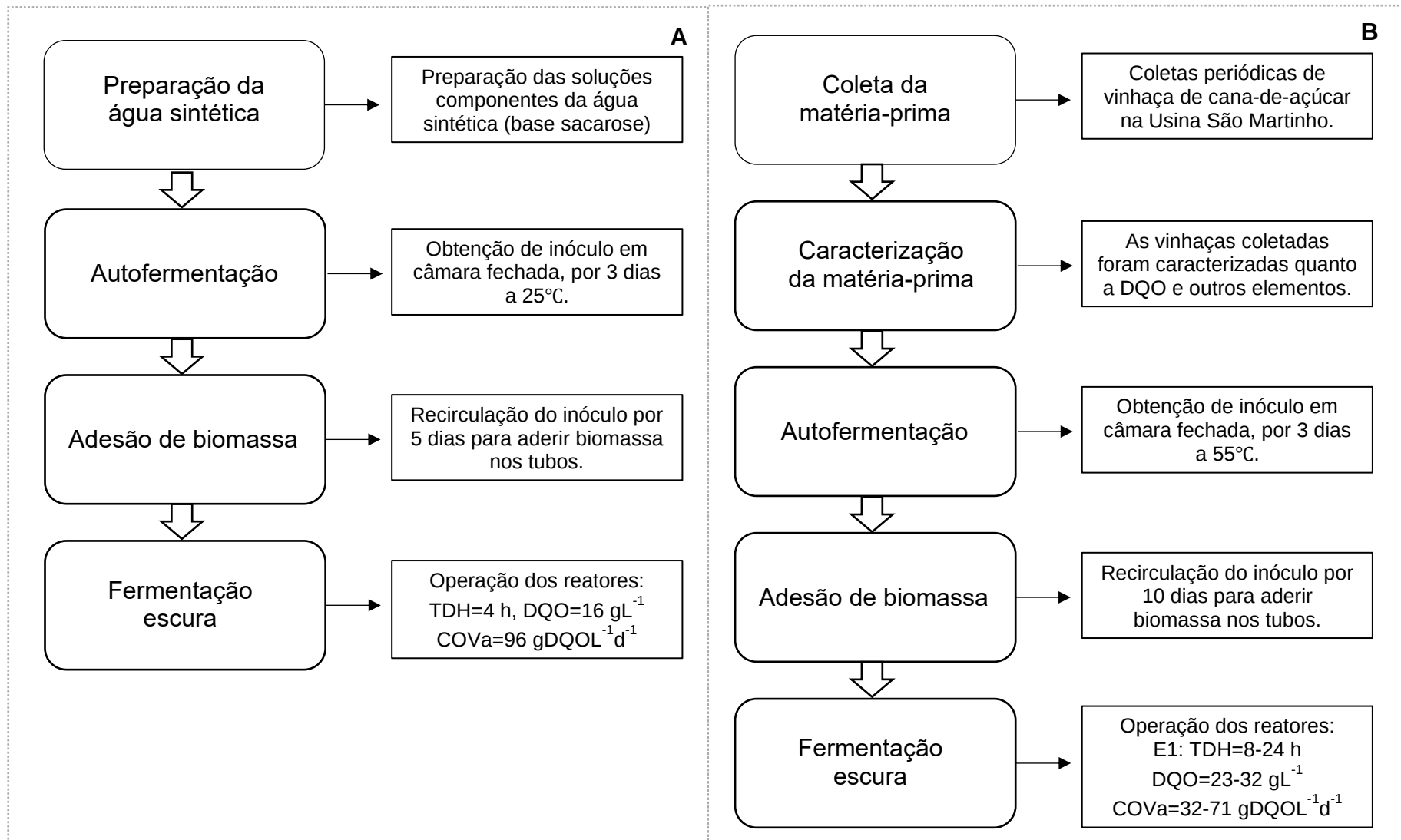
- i. Preparação de soluções e seus respectivos protocolos de referência;
- ii. Caracterização e obtenção dos inóculos por meio do processo de autofermentação;
- iii. Montagem dos aparatos experimentais para a operação dos reatores acidogênicos;
- iv. Apresentação das condições experimentais e operacionais dos reatores acidogênicos, bem como da periodicidade de análises dos experimentos;
- v. Descrição dos procedimentos de cálculo dos parâmetros analisados durante os experimentos

4.1. Instalação e organização dos experimentos

A parte experimental deste projeto de pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Processos Biológicos (LPB), localizado no Centro de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação em Engenharia Ambiental da Escola de Engenharia de São Carlos – EESC, Universidade de São Paulo – USP, campus São Carlos.

A Figura 5 (A-B) apresenta os fluxogramas das etapas envolvidas no processo de obtenção de hidrogênio a partir de água sintética e vinhaça de cana-de-açúcar. O projeto e a montagem dos reatores para a água residuária sintética e para a vinhaça foram baseados na literatura de Gomes et al. (2016), Gomes et al. (2015), Anzola-Rojas et al. (2015), Fuess et al. (2016) e Trevisan et al., 2019.

Figura 5. Fluxograma das etapas do processo de obtenção de hidrogênio: A) Operação com água sintética e B) Operação com vinhaça de cana-de-açúcar.



Fonte: Autor (2022).

4.2. Metodologia aplicada para a operação com água sintética

4.2.1. Substrato sintético

O substrato utilizado como fonte de carbono na operação dos reatores acidogênicos foi a água residuária sintética à base de sacarose com concentração igual a 14263,4 mg L⁻¹. Esta água é composta por uma solução de nutrientes proposta por Del Nery (1987) e adaptado por Penteado et al. (2013), conforme descrito na Tabela 5. Para o preparo da solução de micronutrientes foram preparadas quatro soluções concentradas (A, B, C e D) e armazenadas em câmara fria (4 °C) para conservação, conforme é apresentado na Tabela 4.

Desta forma, a água sintética foi preparada a partir de alíquotas retiradas das soluções concentradas, isto é, de cada solução concentrada foi retirado um volume de 0,25 mL para 1 L de meio sintético. Em sequência, o pH da solução foi ajustado para 6,50 com adição de 500 mg L⁻¹ de bicarbonato de sódio (NaHCO₃) e adição de 0,25 mL L⁻¹ de solução de ácido clorídrico (HCl) 12 M.

Tabela 4. Solução de micronutrientes (água residuária sintética).

Solução	Reagente	Concentração (mg L ⁻¹)
A	Dióxido de selênio (SeO ₂)	0,036
B	Cloreto de cálcio (CaCl ₂ .6H ₂ O)	2,06
C	Fosfato de potássio monobásico (KH ₂ PO ₄)	5,36
	Fosfato de potássio dibásico (K ₂ HPO ₄)	1,30
	Fosfato de sódio dibásico (Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O)	2,70
D	Sulfato de níquel (NiSO ₄ .6H ₂ O)	0,50
	Sulfato ferroso (FeSO ₄ .7H ₂ O)	2,50
	Cloreto férrico (FeCl ₃ .6H ₂ O)	0,25
	Cloreto de cobalto (CoCl ₂ .2H ₂ O)	0,04

Fonte: Adaptado de Del Nery (1987).

É importante citar que o substrato foi composto de 16000 mg DQO L⁻¹, COVa igual a 96 g DQO L⁻¹ d⁻¹, considerando a relação carbono/nitrogênio (C/N) de 140 e como fonte de nitrogênio utilizou-se a ureia (11,51 mg L⁻¹), seguindo o protocolo descrito por Anzola-Rojas et al. (2015). Em resumo, primeiro foi calculado a DQO a partir do valor de COVa estabelecido, em seguida calculou-se a quantidade de sacarose equivalente a DQO de 16000 mg DQO L⁻¹. Esta condição de sobrecarga orgânica foi definida a partir do estudo comparativo com o trabalho de Trevisan, 2020. A ideia foi comparar o estudo de sobrecarga no RCTM18 com o estudo no RCTM12 realizado por Trevisan (2020).

4.2.2. *Inóculo*

O inóculo utilizado nos reatores acidogênicos foi obtido a partir da fermentação natural da água residuária sintética, de acordo com o protocolo descrito por Leite et al. (2008). Desta forma, um volume inicial de 15 L de substrato sintético, com pH corrigido em 6,50, foi mantido em repouso e à temperatura ambiente (25°C - 30°C) por três dias. Em seguida, o substrato sintético fermentado foi bombeado para os reatores e recirculado por um período de cinco dias em câmara fechada climatizada à 25°C. A recirculação ocorreu para promover a adesão da biomassa acidogênica no interior das paredes dos tubos dos reatores. Ao término da recirculação, iniciou-se a alimentação contínua dos reatores com o meio sintético.

O inóculo sintético continha DQO igual a 16000 mg L⁻¹ e relação C/N de 140 (ANZOLA-ROJAS et al., 2015).

4.2.3. *Montagem e operação dos reatores acidogênicos*

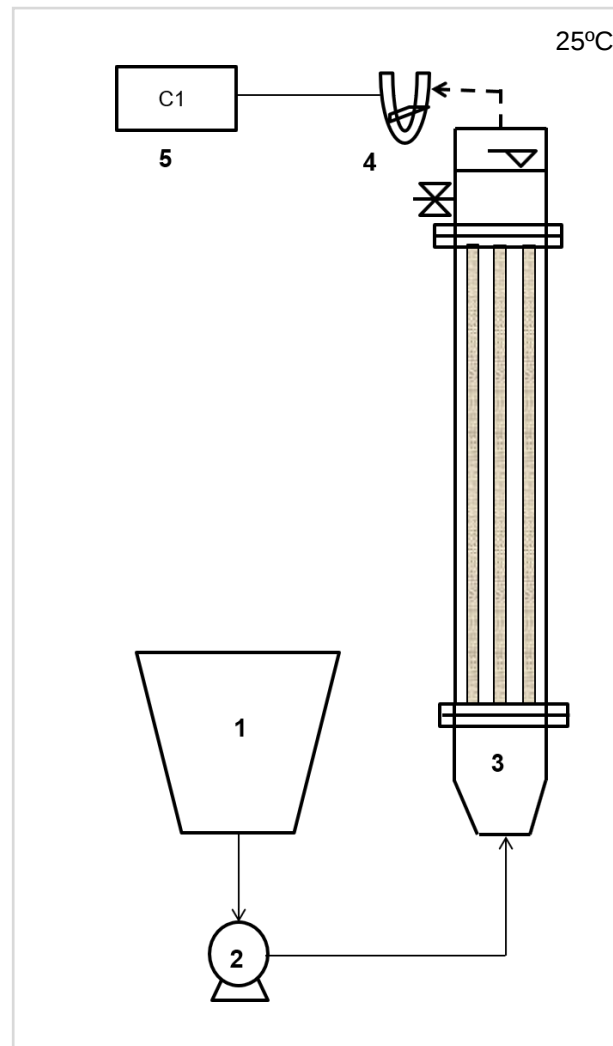
O sistema experimental foi composto pelo RCTM18 confeccionado em três segmentos: câmaras de entrada (altura de 100 mm) e saída (altura 250 mm), confeccionadas em acrílico, e região intermediária, composta por 18 tubos de poliamida (PA) com diâmetro externo e altura de 12 e 710 mm, respectivamente. A superfície interna dos tubos foi adaptada no formato de rosca sem fim com o intuito de melhorar a adesão da biomassa. O volume de operação inicial do RCTM18 foi de 1800 mL.

O aparato experimental foi montado da seguinte forma: (1) reservatório de afluente sintético (água sintética), (2) bombas dosadoras (Grundfos® modelo DDA 30-4 AR), para alimentar os reatores acidogênicos com a água sintética afluente, (3) reator contínuo de tubos múltiplos (RCTM18), (4) medidores de gás e (5) sistema arduíno. A representação esquemática do aparato experimental utilizado e detalhes deste sistema são apresentados nas Figuras 6 e 7.

De acordo com os objetivos apresentados no item 2, o ensaio em escala de bancada foi por 70 dias em condições anaeróbias, escoamento ascendente, alimentação contínua por bomba dosadora e mantidos em câmara fechada e com temperatura controlada à 25 °C. A carga orgânica volumétrica aplicada (COVa) foi mantida em aproximadamente 96 kg DQO m⁻³ d⁻¹, atingindo um TDH de aproximadamente 4 h. Os valores para os parâmetros TDH e concentração do substrato de alimentação em termos de DQO foram selecionados com base nos estudos já realizados com essa configuração de reator (GOMES et al., 2015; GOMES et al., 2016, TREVISAN et al., 2019).

A medição do volume de biogás produzido foi realizada por meio de um medidor em formato U, grafites HB, retirados de lápis preto (9000 HB Faber-Castell), como material condutor, acoplado a um sistema arduíno de medição de pulsos obtidos por deslocamento de uma solução salina (NaCl) – 37 mL, 270 g L⁻¹ em pH 2,0, desenvolvido no Laboratório de Processos Biológicos – LPB. O sistema de medição de gás (medidor/arduíno) foi previamente calibrado, em que cada pulso contabilizado no canal 1 - C1 do arduíno equivale à uma produção de biogás equivalente a 9,17 NmL (RCTM18).

Figura 6. Representação esquemática do aparato experimental utilizado. Legenda: 1 reservatório de afluente sintético; 2- bombas peristálticas, 3- RCTM, 4- medidores de gás, 5- sistema Arduino, (□) correntes líquidas, (--) correntes de biogás.



Fonte: Autor (2022).

Figura 7. Detalhes do aparato experimental utilizado: A) Montagem dos reatores na câmara climatizada, B) Reservatório para alimentação dos reatores acidogênicos, C) Medidor tubo em U e sistema Arduíno.



Fonte: Autor (2022).

4.3. Metodologia aplicada para a operação com a vinhaça de cana-de-açúcar

4.3.1. Origem, coleta e caracterização da vinhaça

O substrato utilizado como fonte de carbono foi a vinhaça bruta disponibilizada pela Usina São Martinho, localizada no Município de Pradópolis, Estado de São Paulo. Os principais produtos desta usina compreendem o açúcar e o etanol, desta forma, a unidade faz uso de melaço e caldo de cana no processo fermentativo.

O período de coleta ocorreu na safra 2019 de cana-de-açúcar, e foram realizadas cinco coletas de vinhaça durante o período experimental. Após a coleta, as amostras de vinhaça bruta foram armazenadas em reservatórios plásticos (volumes de 10 e 20 L) e congeladas (-20°C), buscando-se manter as suas características físico-químicas preservadas, especialmente quanto à concentração de carboidratos.

A Tabela 5 apresenta as características físico-químicas da vinhaça, as quais foram realizadas de acordo com os procedimentos e metodologias descritos no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2012), Stickland (1951), Dubois et al. (1956), Taylor (1996), Buchanan e Nicell (1997), Greenhill (2004) e (Adorno et al., 2014).

Tabela 5. Caracterização físico-química das amostras de vinhaça de cana-de-açúcar coletadas na safra de 2019 para alimentar os reatores.

Parâmetro	Período de coleta (2019)					Referência
	1 29/jun	2 29/ago	3 18/set	4 07/out	5 15/out	
DQOt (g L ⁻¹)	28,0	29,2	29,0	27,4	28,6	APHA (2012)
DQOs (g L ⁻¹)	21,0	22,6	20,3	20,0	25,3	
pH (g L ⁻¹)	4,55	4,58	4,54	4,69	4,42	
SST (mg L ⁻¹)	1740	2085	2675	2610	2360	
SSF (mg L ⁻¹)	225	245	212	308	137	
SSV (mg L ⁻¹)	1576	1840	2463	2302	2223	
Fenóis totais (mg L ⁻¹)	1610,0	1750,0	1820,0	1680,0	1936,6	BUCHANAN & NICELL (1997)
CH (mg L ⁻¹)	5880,0	5856,7	4853,3	4573,3	6556,7	DUBOIS et al. (1956)
Glicerol (mg L ⁻¹)	3476,0	3422,0	2868,0	2484,0	2485,0	GREENHILL (2004)
Acetona (mg L ⁻¹)	4,1	4,3	5,4	97,7	5,1	ADORNO et al. (2014)
Metanol (mg L ⁻¹)	11,8	12,4	51,2	9,1	80,2	
Etanol (mg L ⁻¹)	277,4	280,2	225,6	183,7	494,3	
Ácido acético (mg L ⁻¹)	859,6	863,4	855,5	935,6	1311,0	
Ácido propiônico (mg L ⁻¹)	70,7	73,1	42,4	145,9	66,2	
Ácido butírico (mg L ⁻¹)	3,7	4,0	0	7,3	1,6	
Ácido Isobutírico (mg L ⁻¹)	0	0	0	7,3	0	
Ácido valérico (mg L ⁻¹)	0	0	0	0	0,5	
Ácido isovalérico (mg L ⁻¹)	0	0	0	4,9	0	
Ácido capróico (mg L ⁻¹)	5,3	5,8	0	1,3	0	

Ácido láctico (mg L ⁻¹)	747,0	1936,7	1920,0	2053,3	2723,3	TAYLOR (1996)
--	-------	--------	--------	--------	--------	---------------

Legenda: pH: potencial; DQOt: Demanda química de oxigênio total; DQOs: Demanda química de oxigênio solúvel; SST: Sólidos suspensos totais; SSF: Sólidos suspensos fixos; SSV: Sólidos suspensos voláteis; NTK: Nitrogênio total Kjeldahl; CH: Carboidratos totais. **Fonte:** Autor (2022).

4.3.2. Inóculo

O inóculo utilizado nos reatores acidogênicos foi obtido a partir da fermentação natural da vinhaça coletada na usina, de acordo com o protocolo descrito por Fuess et al., (2016). Desta forma, um volume inicial de 20 L de substrato real (vinhaça bruta) com pH corrigido em 6,5 com solução de ácido clorídrico (HCl) 12mol L⁻¹ e solução de bicarbonato de sódio (NaHCO₃) 500 mg L⁻¹, foi mantido em repouso e em câmara fechada climatizada à 55°C durante três dias. Em seguida, a vinhaça fermentada foi bombeada para os reatores tubulares e recirculada por um período de 10 dias a um TDH igual a 12h para promover a adesão da biomassa acidogênica no interior das paredes dos tubos dos reatores. No início da recirculação o volume inicial da vinhaça fermentada foi 15 L e ao término da recirculação o volume foi igual a 10L. Em sequência, iniciou-se a alimentação contínua dos reatores com a vinhaça bruta.

4.3.3. Montagem e operação dos reatores acidogênicos

O sistema experimental foi composto de dois reatores contínuos: (i) um reator contínuo de tubos múltiplos (RCTM) confeccionado em três segmentos: câmaras de entrada (altura de 100 mm) e saída (altura 250 mm), confeccionadas em acrílico, e região intermediária, composta por 18 tubos de poliamida (PA) com diâmetro externo e altura de 12 e 710 mm, respectivamente; (ii) um reator contínuo de tubos múltiplos (RCTM) confeccionado em três segmentos: câmaras de entrada (altura de 100 mm) e saída (altura 250 mm), confeccionadas em acrílico, e região intermediária, composta por 10 tubos de poliamida (PA) com diâmetro externo e altura de 15 e 710 mm, respectivamente. A superfície interna dos tubos foi adaptada no formato de rosca sem fim com o intuito de melhorar a adesão da biomassa. O volume de operação inicial do RCTM10 e do RCTM18 foi igual a 2000 mL. A Tabela 6 apresentam as características dos RCTMs.

Tabela 6. Resumo das dimensões dos reatores RCTM10 e RCTM18.

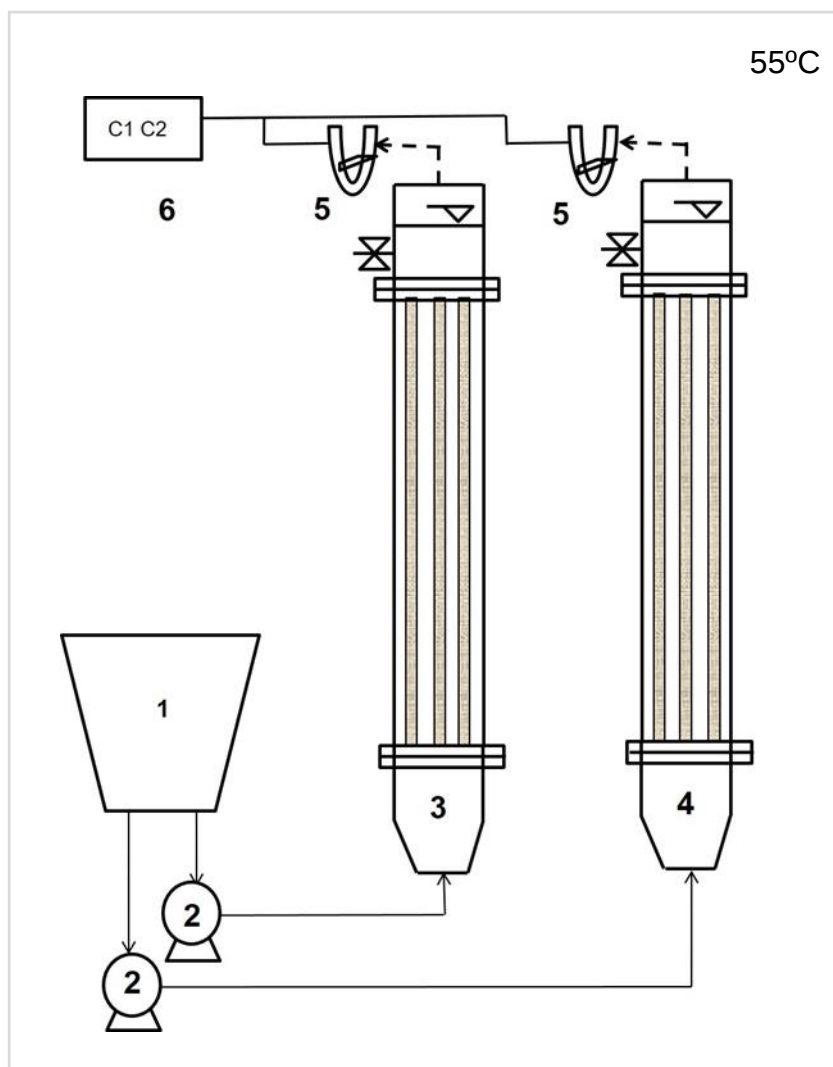
Dimensões	RCTM10	RCTM18
Altura zona tubos (mm)	710	710
Raio interno (mm)	6	4,5
Diâmetro interno (mm)	12	9
Diâmetro externo (mm)	15	12
Área superficial (mm ²)	263893,6	356256,3
Volume Total (mL)	2598	2829

Fonte: Autor (2022).

O aparato experimental foi montado da seguinte forma: (1) reservatório de vinhaça de cana-de-açúcar (2) bombas dosadoras (Grundfos® modelo DDA 30-4 AR), para alimentar os reatores acidogênicos com a vinhaça, (3) reator de tubos múltiplos (RCTM10), (4) reator contínuo de tubos múltiplos (RCTM18), (5) medidores de gás e (6) sistema arduíno. A representação esquemática do aparato experimental utilizado e detalhes deste sistema são apresentados nas Figuras 8, 9 e 10.

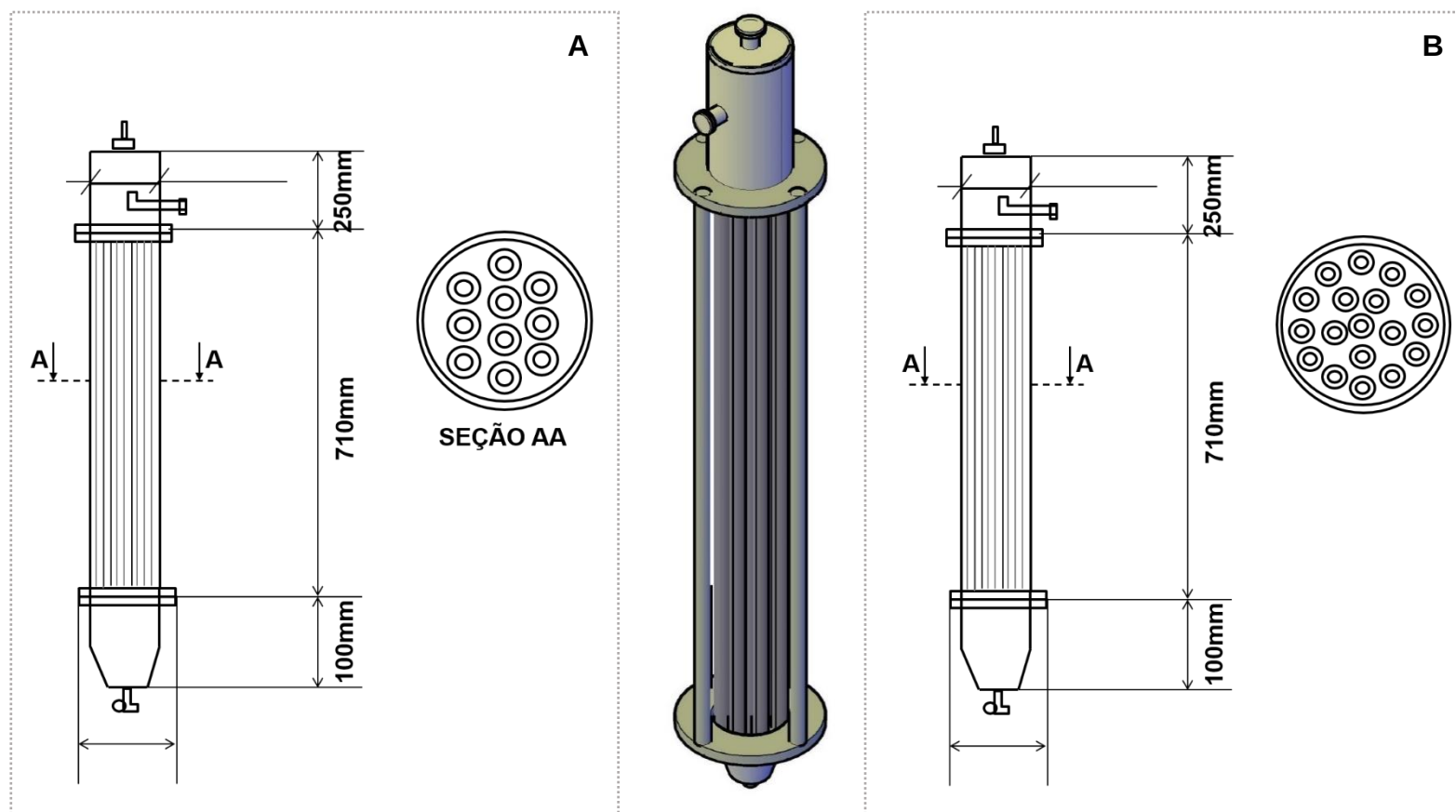
A medição do volume de biogás produzido foi realizada da mesma maneira descrita na operação com água sintética (item 4.3.2). Para o RCTM10 e RCTM18 cada pulso contabilizado equivale à uma produção de biogás equivalente a 9,39 NmL e 9,17 NmL, respectivamente.

Figura 8. Representação esquemática do aparato experimental utilizado. Legenda: 1 reservatório de vinhaça de cana-de-açúcar; 2- bombas dosadoras, 3- RCTM10, 4- RCTM 18, 5- medidores de gás, 6- sistema Arduino, (□) correntes líquidas, (--) correntes de biogás.



Fonte: Autor (2022).

Figura 9. Características construtivas A) RCTM10 e B) RCTM18.



Fonte: Autor (2022).

Figura 10. Detalhes do aparato experimental utilizado: A) Montagem dos reatores na câmara climatizada, B) Reatores acidogênicos, C) Medidor tubo em U e sistema arduino.



Fonte: Autor (2022).

De acordo com os objetivos apresentados no item 2, o ensaio em escala de bancada foi desenvolvido por 99 dias em condições anaeróbias, fluxo ascendente contínuo e mantidos em câmara climatizada à 55 °C.

Com base em estudos realizados com a configuração do RCTM por Gomes et al. (2015), Trevisan et al. (2019), Trevisan (2020) e ainda considerando as indicações propostas por Anzola-Rojas et al. (2015), a operação consistiu em uma varredura de dados para determinar os valores ótimos para a COVa e o TDH para os RCTMs modificados. Isto porque os RCTMs modificados ainda não tinham sido testados para produzir H_2 a partir de vinhaça de cana-de-açúcar. Desta forma, os valores escolhidos para a investigação da varredura (TDH e COVa) podem ser vistos na Tabela 7. É importante ressaltar que esses dados foram escolhidos com o intuito de verificar o controle da COVe à medida que os reatores eram submetidos ao aumento da COVa, isto é, situações de sobrecarga de matéria orgânica, consequentemente diminuição

de TDH. Ao final, isto permitiria verificar a resposta do reator quanto a robustez estrutural e também hidrodinâmica.

Assim, a operação foi dividida em três etapas diferenciadas por meio da variação do TDH, concentração de vinhaça de cana-de-açúcar e COVa, conforme descrito na Tabela 8. Os valores de COVa (32, 57 e 71 g DQO L⁻¹ d⁻¹) foram calculados em função da concentração da vinhaça afluyente (vinhaça bruta com a concentração da usina em mg DQO L⁻¹) e do TDH (24, 12 e 8 h). A duração de cada etapa operacional foi determinada conforme a resposta do reator quanto à sua estabilização.

Em termos de concentração do substrato de alimentação (DQO), utilizou-se a vinhaça concentrada, isto é, a vinhaça bruta coletada na usina, sem considerar diluição.

Tabela 7. Resumo das condições operacionais da operação com os RCTMs.

Etapa da operação	Parâmetro		
	TDH (h)	DQO (mg L ⁻¹)	COVa (g DQO L ⁻¹ d ⁻¹)
E1	24	32000	32
E2	12	28500	57
E3	8	23667	71

Fonte: Autor (2022).

4.4. Metodologia aplicada para a operação com reatores em modo batelada

Ao término das operações dos RCTMs, as biomassas acidogênicas produzidas foram testadas como inóculos em experimentos de reatores em modo batelada para verificar a produção de hidrogênio destas biomassas na presença de vinhaça bruta diluída. A vinhaça utilizada é a mesma descrita no item 4.3.1. Desta forma, o experimento dos reatores em bateladas foi realizado segundo a metodologia descritas em Fuess et al. (2020) e Sánchez et al. (2021).

De acordo com os objetivos apresentados no item 2, a fermentação da vinhaça de cana-de-açúcar em modo batelada foi realizada em frascos Duran® de 500 mL preenchidos com um volume de meio de cultura (inóculo + substrato) na faixa 190-193 mL e volume de inóculo líquido considerando a relação alimento/microrganismo (A/M) igual a 3,7. Os meios de cultura foram preparados utilizando a vinhaça diluída

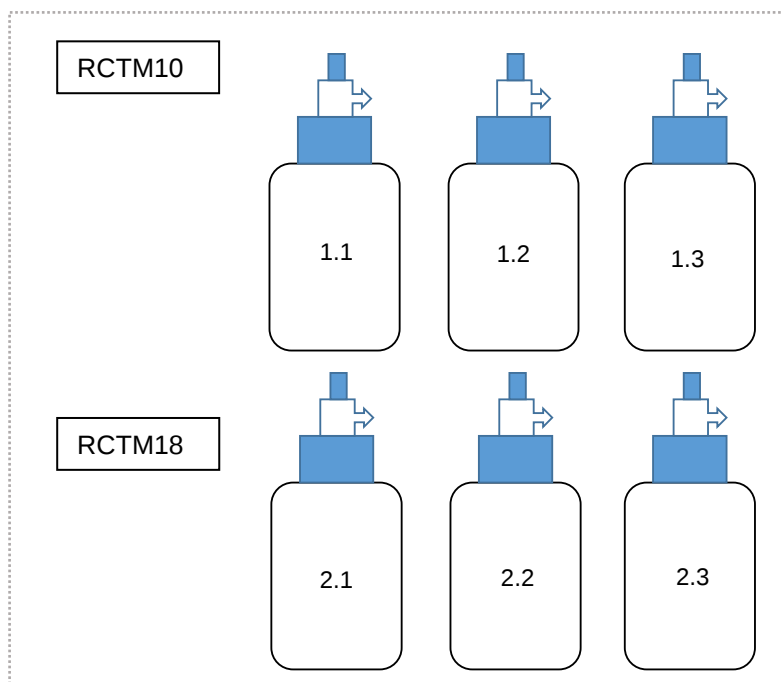
para uma DQO igual a $9,1 \text{ g L}^{-1}$. Não foi realizado procedimento de esterilização na preparação da vinhaça, uma vez que o experimento visou a exploração de populações microbianas presentes na vinhaça. Desta forma, após o processo de inoculação, os frascos submetidos a fluxionamento com nitrogênio durante 5 min para garantir um ambiente anaeróbio (anaerobiose) e, em seguida, foram selados com rolhas de borracha de butila e tampas de plástico. Em sequência foram incubados em agitador orbital (*Digital Orbital Shaker*) a 100 rpm, 55°C e monitorados durante 10 dias. A representação esquemática do sistema experimental é apresentada na Figura 11.

Em relação a estrutura de reatores, estes tinham uma válvula de três vias acopladas na tampa de butila. Uma via foi usada coletar amostra líquida, a qual era coletada com uma seringa que se encaixará na entrada da válvula., enquanto, a coleta do gás e medida de pressão eram realizados direto na borracha de butila com auxílio de uma seringa e agulha.

Em relação ao monitoramento dos reatores, a amostragem na fase líquida foi realizada considerando a retirada do volume máximo de 10% do volume do final do reator em operação durante a fase exponencial (produção de gás), enquanto as análises na fase gasosa foram realizadas a cada quatro horas até atingir o regime permanente em relação a produção de gás, após este tempo, as análises foram realizadas apenas uma vez ao dia. A Figura 12 apresenta detalhes do sistema experimental. Ainda, o resumo das condições experimentais é apresentado nas Tabelas 8 e 9, para os RCTMs em estudo.

As amostras da fase líquida coletadas foram congeladas para realização de análises de ácidos orgânicos e solventes por cromatografia líquida, ocorridas no Laboratório de Bioprocessos – UNESP/IQ. Ainda, como foi observado a produção de hidrogênio, no final do experimento, foram retiradas amostras de cada reator para caracterização de microbiota presente no experimento.

Figura 11. Representação esquemática do sistema experimental em batelada.



Fonte: Autor (2022).

Figura 12. Detalhes do sistema experimental dos reatores em batelada: A) Montagem dos reatores no shaker com agitação e temperatura, B) Inoculação dos reatores e C) Fluxionamento de nitrogênio para anaerobiose.



Fonte: Autor (2022).

Tabela 8. Condições operacionais do reator em batelada com biomassa obtida do RCTM10.

Condições iniciais	RCTM10		
	1.1	1.2	1.3
Volume final (mL)	193	190	193
Inóculo (mL)	43,23	44,53	45,23
Volume de vinhaça (mL)	147,77	145,47	147,77
Tempo de operação (d)	10 dias		
Temperatura (°C)	55		
Agitação (rpm)	100		
pH	6,5		

Fonte: Autor (2022).

Tabela 9. Condições operacionais para o reator em batelada com biomassa obtida do RCTM18.

Condições iniciais	RCTM18		
	2.1	2.2	2.3
Volume final (mL)	190	190	190
Inóculo (mL)	13,45	13,45	13,45
Volume de vinhaça (mL)	176,55	176,55	176,55
Tempo de operação (d)	10 dias		
Temperatura (°C)	55		
Agitação (rpm)	100		
pH	6,5		

Fonte: Autor (2022).

4.5. Avaliação e monitoramento dos reatores acidogênicos

A avaliação e monitoramento do desempenho dos reatores nas operações realizadas (água sintética e vinhaça de cana-de-açúcar) foram baseados na coleta e análises de amostras: na fase líquida e na fase gasosa.

Para a operação com água sintética, as amostras na fase líquida foram coletadas na entrada (afluente) para análises demanda química de oxigênio total (DQOt) e solúvel (DQOs), concentração de carboidratos totais (CH) e concentração de ácido

lático. Na saída foram coletadas amostras para monitorar os mesmos parâmetros na entrada juntamente com pH, teor de sólidos suspensos voláteis (SSV) e concentração de ácidos orgânicos voláteis e de solventes. As amostras na fase gasosa foram coletadas através de um septo acoplado no *headspace* dos reatores para determinar a composição do biogás produzido.

Para a operação com vinhaça de cana-de-açúcar foram realizadas as mesmas análises descritas para a operação com meio sintético com a adição da análise de glicerol.

Em resumo, o desempenho dos reatores em estudo baseou-se no monitoramento analítico de amostras do afluente, efluente e biogás. Os parâmetros físico-químicos, as metodologias de referência e a frequência das análises empregados são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Análises e metodologias utilizadas para o monitoramento dos reatores acidogênicos

Parâmetro	Frequência na semana	Metodologia	Referência
pH	3x	Potenciométrico	APHA (2012)
DQO _t e DQO _s	3x	Espectrofotométrico	APHA (2012)
CH	3x	Espectrofotométrico	DUBOIS et al. (1956)
Glicerol	3x	Enzimático	GREENHILL (2004)
Fenóis totais	3x	Espectrofotométrico	BUCHANAN & NICELL (1997)
SSV	2x	Gravimétrico/Calcinação	APHA (2005)
Ácidos orgânicos e solventes	3x	Cromatografia Líquida	GOMES et al. (2015)
Ácidos orgânicos e solventes	3x	Cromatografia Gasosa	ADORNO et al. (2014)
Vazão de biogás	Diária	Sistema arduíno	GYALAI-KORPOS et al., (2014)
Composição do biogás	3x	Cromatografia Gasosa	PERNA et al. (2013)

Legenda: DQO_t: demanda química de oxigênio total; DQO_s: demanda química de oxigênio solúvel; SSV: sólidos suspensos voláteis; CH: carboidratos totais. **Fonte:** Autor (2022).

As análises de DQO_t, DQO_s e SSV foram realizadas de acordo com os protocolos descritos no *Standard Methods of Water and Wastewater* (APHA, 2012). Para as análises de DQO_s, as amostras foram previamente filtradas em membranas de 0,45 µm. E para as análises de SSV, as amostras foram filtradas em membranas de 1,2 µm.

As análises de carboidrato total foram realizadas de acordo com a metodologia fenol-sulfúrico proposta por Dubois et al. (1956), por espectrofotometria. O método possibilita a leitura da absorbância (490nm) da concentração de carboidrato total em uma amostra após desidratação dos açúcares na presença de ácido sulfúrico, seguido da complexação dos produtos com adição de fenol.

O glicerol, por sua vez, foi determinado pelo método enzimático proposto por Greenhill (2004), enquanto as análises de fenóis totais foram realizadas de acordo com a metodologia proposta por Buchanan e Nicell (1997). As amostras para as análises citadas foram filtradas em membranas de 0,45 μm .

A vazão de biogás foi monitorada continuamente por medidores de gás acoplados ao *headspace* do sistema e conectados a um sistema arduíno. O código de programação do sistema Arduíno foi desenvolvido pelo Engenheiro Guilherme Oliveira, pós-doutorando lotado no Instituto Mauá de Tecnologia e atuante no LPB, baseado. Os tubos de vidro de borosilicato em formato de U foram confeccionados na vidraria do Instituto de Química – UNESP. Vários testes de calibração foram realizados para chegar a um sistema otimizado e eficiente.

A análise da composição das correntes de hidrogênio (H_2), gás carbônico (CO_2) e metano (CH_4) foi realizada em cromatógrafo gasoso modelo GC 2010 (Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, MD, EUA), com coluna Supelco Carboxen® 1010 Plot (30 mx0,53 mm de diâmetro externo, 0,30 μm de espessura), e argônio como gás de arraste (5,66 mL min^{-1}). A rampa de aquecimento da coluna foi de 130 a 135°C, a 46 min^{-1} (PERNA et al., 2013), com tempo de corrida aproximado de 6 min. A partir da área encontrada obteve-se o número de mols e a concentração de hidrogênio (H_2).

As análises de ácidos orgânicos voláteis e solventes para determinação das concentrações de metanol, etanol, ácido acético, propiônico, isobutírico, butírico, iso-valérico, valérico e caprótico, foram realizadas utilizando metodologias diferentes para o ensaio com água sintética e para o ensaio com vinhaça. Para o ensaio com água sintética foram realizadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em sistema Shimadzu® RID – 10A. O sistema foi equipado com uma coluna Aminex® HPX – 87H (300 mm comprimento e 7,8 mm de diâmetro interno, BioRad) e dois detectores por índice de refração (RID). As condições cromatográficas foram: volume de amostra de 20 μL , eluente ácido sulfúrico 0,01 N, fluxo de 0,6 mL/min . A temperatura de aquecimento da coluna foi de 60°C min^{-1} , com tempo de corrida aproximado de 40 min. Para o ensaio com vinhaça de cana-de-açúcar, os ácidos orgânicos e solventes foram

analisados por cromatografia gasosa, previamente filtradas (0,45 μm), em cromatógrafo modelo GC 2010 em sistema Shimadzu® equipado com detector de ionização em chama e coluna HP-INNOWAX (30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura do filme), segundo a metodologia descrita por Adorno, Hirasawa e Varesche (2014).

Após todas as análises realizadas, as variáveis resposta para a verificação do desempenho dos reatores com as águas residuárias foram: pH, eficiência de conversão de DQO_t e DQO_s (EC_{DQO} , em %); eficiência de conversão de CH (EC_{CH} , em %); eficiência de conversão de glicerol (EC_{GLI} , em %); eficiência de conversão de ácido láctico (EC_{AL} , em %); vazão de biogás (VBG, em mL d^{-1}); produção volumétrica de hidrogênio (PVH, em $\text{mL H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$); vazão molar de hidrogênio (VMH, em $\text{mmol H}_2 \text{ h}^{-1}$); rendimento de hidrogênio (HY, em $\text{mmol H}_2 \text{ g}^{-1} \text{DQO}^{-1}$); conteúdo de hidrogênio no biogás ($\%\text{H}_2$, em %) e o perfil de variação temporal da carga orgânica volumétrica específica (COVe , em $\text{gDQO g}^{-1} \text{SSV d}^{-1}$).

É importante citar que os valores para as variáveis resposta referentes à produção de biogás correspondem às condições normais de temperatura e pressão (CNTP) de 1 atm e 0°C (273,15K).

4.6. Principais equações utilizadas para verificação do desempenho dos reatores

Este projeto baseou-se em cálculos descritos em trabalhos de Anzola - Rojas et al., (2015), Fuess et al., (2016) e (2017), Trevisan (2020) e Takeda (2021). Desta forma, as principais equações aplicadas nos procedimentos de quantificação dos parâmetros usados para avaliar o desempenho dos RCTMs são apresentadas a seguir.

A vazão do afluentes alimentado nos RCTMs (Q), em L h^{-1} , foi calculada conforme a Equação (11), na qual, V_r corresponde ao volume útil do RCTM em estudo e TDH ao tempo de detenção hidráulica teórico aplicado em horas (h).

$$Q_{af} = \frac{V_r}{\text{TDH}} \quad \text{Eq.(11)}$$

A determinação da eficiência de conversão de carboidrato (EC_{CH}), em %, é dada pela Equação (12), em que os termos CH_{af} e CH_{ef} correspondem,

respectivamente, à concentração de carboidratos totais afluyente ao RCTM (g L^{-1}) e à concentração de carboidratos totais efluente ao RCTM (g L^{-1}).

$$\text{ER}_{\text{CH}} = \left(\frac{\text{CH}_{\text{af}} - \text{CH}_{\text{ef}}}{\text{CH}_{\text{af}}} \right) 100 \quad \text{Eq.(12)}$$

O cálculo da eficiência de conversão de DQO (EC_{DQO}), em % foi realizado pela Equação (13). Em que, DQO_{af} corresponde a DQO afluyente ao RCTM (g L^{-1}), e DQO_{ef} , é a DQO efluente do RCTM (g L^{-1}).

$$\text{ER}_{\text{DQO}} = \left(\frac{\text{DQO}_{\text{af}} - \text{DQO}_{\text{ef}}}{\text{DQO}_{\text{af}}} \right) 100 \quad \text{Eq.(13)}$$

O cálculo da eficiência de conversão de glicerol (EC_{GLI}), em %, foi realizado considerando a Equação (14). Em que, GLI_{af} corresponde a concentração de glicerol afluyente ao RCTM (g L^{-1}), e GLI_{ef} corresponde a concentração de glicerol efluente do RCTM (g L^{-1}).

$$\text{ER}_{\text{GLI}} = \left(\frac{\text{GLI}_{\text{af}} - \text{GLI}_{\text{ef}}}{\text{GLI}_{\text{af}}} \right) 100 \quad \text{Eq.(14)}$$

A vazão de biogás (VBG), em mL d^{-1} , foi calculada por meio da Equação (15), em que $V_{\text{gasômetro}}$ e t correspondem, respectivamente, ao volume de gás medido no gasômetro (mL) e ao tempo de medição (d).

$$\text{VBG} = \frac{V_{\text{gasômetro}}}{t_{\text{medição}}} \quad \text{Eq.(15)}$$

Os cálculos do conteúdo de hidrogênio ($\%\text{H}_2$) e dióxido de carbono ($\%\text{CO}_2$) no biogás são apresentados nas Equações (16), (17) e (18), em que os termos n_{H_2} representa o número de mols de H_2 (mol), n_{CO_2} representa o número de mols de CO_2 (mol) e n o número de mols totais na amostra de gás injetado (mol).

$$\%\text{H}_2 = \frac{n_{\text{H}_2}}{n_{\text{total}}} \times 100 \quad \text{Eq.(16)}$$

$$\%\text{CO}_2 = \frac{n_{\text{CO}_2}}{n_{\text{total}}} \times 100 \quad \text{Eq.(17)}$$

$$n_{\text{total}} = n_{\text{H}_2} + n_{\text{CO}_2} \quad \text{Eq.(18)}$$

O cálculo da vazão molar de hidrogênio (VMH), em mmol H₂ h⁻¹, foi determinado de acordo com a Equação (19), em que, VBG corresponde à vazão de biogás (mL h⁻¹), fH₂ é a fração de H₂ no biogás e V_i é o volume de gás (mL) injetado no cromatógrafo.

$$VMH = \left(\frac{VBG \cdot fH_2}{V_i} \right) \quad \text{Eq.(19)}$$

O cálculo da produção volumétrica de hidrogênio (PVH) em mL H₂ L⁻¹ d⁻¹ foi baseada na Equação (20), em que os termos VBG, %H₂ e V_u representam a vazão de biogás (mL d⁻¹), o conteúdo de hidrogênio no biogás (%) e o volume útil do RCTM estudado (L), respectivamente.

$$PVH = \frac{VBG \cdot \%H_2}{V_r} \quad \text{Eq.(20)}$$

Por fim, o cálculo do rendimento de hidrogênio (HY), em mol H₂ g⁻¹ DQO, foi definido pela razão entre VMH (mol H₂ d⁻¹) que representa a vazão molar de hidrogênio, Q_{af} (L d⁻¹) que representa a vazão afluyente, DQO_{aflu} (g L⁻¹) que representa DQO afluyente de todos os compostos utilizados como substratos, no caso deste trabalho: carboidrato total, glicerol e ácido láctico, conforme apresentado na Equação (21).

$$HY = \frac{VMH}{Q_{af} \cdot (DQO_{af})} \quad \text{Eq.(21)}$$

4.7. Cálculo da Carga Orgânica Volumétrica Específica (COVe)

Como já foi mencionado, o foco principal deste trabalho foi investigar o crescimento de microrganismos nos RCTMs à medida que estes reatores eram alimentados continuamente com água residuária (real ou sintética). No entanto, não existem muitos artigos publicados que apresentem uma padronização para o cálculo deste parâmetro. Desta forma, com base na metodologia previamente descrita por Anzola Rojas et al. (2015) e discussões de grupo de pesquisa para adaptações e

correções nos cálculos, seguem as etapas de determinação de biomassa aderida, suspensa e da COVe.

O estudo iniciou com o cálculo do coeficiente de rendimento celular da biomassa acidogênica ($Y_{X/S}$, gSSV g⁻¹DQO), conforme Equação 22. Vale ressaltar que a aplicação de diferentes substratos influencia em tal coeficiente. Este trabalho, por exemplo, considerou que além do carboidrato total da vinhaça de cana-de-açúcar como substrato, os microrganismos também utilizaram como substratos o glicerol e o ácido láctico presentes na vinhaça. Na Equação 22, os termos X_a , X_s , X_e e X_d referem-se a quantidade de biomassa aderida à parede do RCTM, ao final da operação (gSSV); a quantidade de biomassa suspensa do líquido drenado do RCTM, ao final da operação (g); e a quantidade total de biomassa lavada do RCTM, na corrente efluente, ao longo do período de operação (g). O termo S_c representa a massa total de substrato consumida durante o período operacional em termos de DQO.

$$Y_{X/S} = \frac{X_a + X_s + X_e + X_d}{S_c} \quad \text{Eq.(22)}$$

Para o cálculo de X_a , ao final da operação do RCTM e após a sua drenagem completa, suas paredes foram lavadas com um volume conhecido de água destilada (4L) para a remoção da biomassa aderida nos tubos dos RCTMs. Desta solução de solução final de lavagem foram retiradas amostras para determinação de sólidos. Resumidamente, as amostras foram filtradas, secas em estufa por 24h a 105°C e, posteriormente, calcinadas em mufla por 20 min a 550°C, para determinação da concentração de SSV, em que, considera-se o valor final de X_a obtido pela multiplicação da concentração pelo volume da lavagem. Para a determinação de X_s seguiu-se o mesmo protocolo, em que amostras do volume drenado ao final da operação foram retiradas e submetidas à etapa de determinação de sólidos (filtração, secagem e calcinação).

A determinação de X_e foi baseada no cálculo da integral da vazão mássica de sólidos eliminados na corrente efluente ao RCTM durante o período da operacional (Equação 23). Na Equação 23, os termos SSV_e , Q e t representam, respectivamente, a concentração de sólidos suspensos voláteis no efluente (gSSV L⁻¹), a vazão afluenta ao RCTM (L d⁻¹) e o tempo de operação do sistema. Para a resolução das equações integrais, utilizou-se o *software OriginPro 8 (OriginLab Corporation)*.

$$X_e = \int_0^t (SSV_e \cdot Q) dt \quad \text{Eq.(23)}$$

O termo X_d foi considerado nulo uma vez que durante a operação não foram realizados descartes de biomassa contida no reator.

O termo S_c foi calculado a partir da equação integral da vazão mássica de substrato consumido ao longo da operação, isto é, a massa total de carboidrato total, glicerol e ácido láctico consumidos ao longo da operação. A Equação 24 apresenta o cálculo da referida equação integral, em que os termos Q , DQO_{af} , DQO_{ef} e t representam a vazão afluenta ao RCTM ($L \cdot d^{-1}$), a concentração da matéria orgânica afluenta e efluente ($gDQO \cdot L^{-1}$) e o tempo total de operação do sistema, respectivamente.

$$S_c = \int_0^t Q \cdot (DQO_{af} - DQO_{ef}) dt \quad \text{Eq.(24)}$$

A partir do cálculo de $Y_{x/s}$ foi possível determinar a produção de biomassa pelo consumo de substrato em um determinado intervalo de tempo (P_x) conforme indicado na Equação (25).

$$P_x = Q \cdot (C_{s_{af}} - C_{s_{ef}}) \cdot Y_{x/s} \quad \text{Eq.(25)}$$

Considerando a Equação 26, calculou-se a quantidade de biomassa acumulada no interior do RCTM, em um determinado tempo (X_n). Na Equação 27 tem-se que V_r corresponde ao volume útil do reator (L), X_t é a quantidade de biomassa total produzida ao longo da operação do RCTM ($X_a + X_s + X_e$, em $gSSV$), X_n é a quantidade total de biomassa no interior do RCTM no tempo n ($gSSV \cdot L^{-1}_{\text{reator}}$), X_{n-1} é a quantidade total de biomassa no interior do RCTM no tempo $n-1$ ($gSSV \cdot L^{-1}_{\text{reator}}$) e D é a massa de sólidos descartados.

$$X_n = \left[\frac{\int_{n-1}^n P_x dt}{V_r} \cdot \left(\frac{X_a + X_s + X_d}{X_t} \right) \right] + X_{n-1} - \frac{D}{V_r} \quad \text{Eq.(26)}$$

No tempo $t = 0$, a quantidade de biomassa, no interior do RCTM (X_0), foi estimada a partir da Equação 27, em que V_{in} corresponde ao volume de substrato utilizado para a inoculação (autofermentação); no caso deste trabalho, utilizou-se o volume igual a 15 L para a operação com o meio sintético e o volume igual a 20 L para a operação com a vinhaça.

$$X_0 = \frac{C_{S0} \cdot Y_{x/s} \cdot V_{in}}{V_r} \quad \text{Eq.(27)}$$

Antes de apresentar o cálculo da COVe, é necessário relembrar o cálculo da COVa apresentado na Equação 28, em que os termos C_{af} e Q correspondem à concentração de afluente ao reator (g L^{-1}) e à vazão afluente, respectivamente, ao reator no tempo n (L d^{-1}), e V_r representa o volume útil de operação do reator (L).

$$COV_a = \frac{C_{af} \cdot Q_{af}}{V_r} \quad \text{Eq.(28)}$$

Finalmente, a COVe ($\text{gDQO g}^{-1}\text{SSV d}^{-1}$), em um determinado tempo n de operação foi obtida pelo quociente entre a carga orgânica volumétrica aplicada (COVa) ao RCTM e a quantidade de biomassa retida neste (X_n , $\text{gSSV L}^{-1}_{\text{reator}}$), conforme apresentado na Equação (29).

$$COV_e = \frac{COV_a}{X_n} \quad \text{Eq.(29)}$$

4.8. Balanço de massa

Sabe-se que a Lei de Conservação de Massa de Antonie Lavoisier afirma que a massa não pode ser criada e nem destruída. Assim, em todos os processos a massa inicial em algum equipamento é igual a massa final, caso não ocorra acúmulo no interior do equipamento. Por isso, o balanço de massa é importante no estudo de um processo.

Desta forma, para entender os processos de remoção de matéria orgânica bem como a produção de metabólitos secundários ao longo da fermentação escura realizada neste trabalho, foram obtidos dois balanços de massa distintos, seguindo metodologia descrita em Fuess et al. (2016). Primeiro foi realizado o balanço de massa da

fração solúvel (BMFS) nas correntes de afluentes (vinhaça e água sintética) e efluentes dos RCTMs (água sintética e vinhaças acidificadas). Em segundo, o balanço de massa global (BMG) do sistema foi obtido a partir do monitoramento das correntes dos efluentes envolvendo os compostos solúveis, a produção de H₂ e os sólidos ao longo da operação.

O desenvolvimento do cálculo do BMFS envolveu os ácidos orgânicos e solventes analisados por cromatografia gasosa (operação com a vinhaça) e cromatografia líquida (operação com água sintética) os quais foram convertidos em equivalentes de matéria orgânica, dado em forma de DQO, de acordo com suas respectivas reações de oxidação apresentadas na Tabela 11.

Assim, a determinação do BMFS foi baseada na Equação 30, em que a DQO referente aos ácidos orgânicos, ou metabólitos secundários, é a concentração de cada ácido ou solvente multiplicado por seu respectivo fator de equivalência. Os termos DQO_{CH} e DQO_{GLI} representam a concentração de matéria orgânica em DQO equivalente aos carboidratos totais e glicerol, respectivamente. E o termo DQO_{sef} corresponde à DQO solúvel na corrente efluente.

$$\text{BMFS} = \left(\frac{\text{DQO}_{\text{metabólitos}} + \text{DQO}_{\text{CH}} + \text{DQO}_{\text{GLI}}}{\text{DQO}_{\text{sef}}} \right) 100 \quad \text{Eq.(30)}$$

O BMG considerou, além dos compostos solúveis, a produção de hidrogênio e sólidos ao longo da operação dos RCTMs, apresentado na Equação 31. Este balanço expressa a relação entre a DQOt equivalente efluente aos reatores e a DQOt afluente a estes. O termo DQO_{H2} corresponde à vazão de hidrogênio convertida para carga equivalente em DQO (g d⁻¹), dada segundo fator de equivalência apresentado na Tabela 11. O termo DQO_{SSV} corresponde à concentração de matéria orgânica em DQO equivalente à produção de SSV (g d⁻¹), considerando fator de equivalência igual a 1,42 gDQO g⁻¹SSV (FERRAZ JR. et al., 2014). E o termo DQOt_{af} representa a concentração de matéria orgânica em DQO total na corrente afluente.

$$\text{BMS} = \left(\frac{\text{DQOs}_{\text{medida efluente}} + \text{DQO}_{\text{H2}} + \text{DQO}_{\text{SSV}}}{\text{DQOt}_{\text{medida afluente}}} \right) 100 \quad \text{Eq.(31)}$$

Tabela 11. Fatores de equivalência aplicados no balanço de massa.

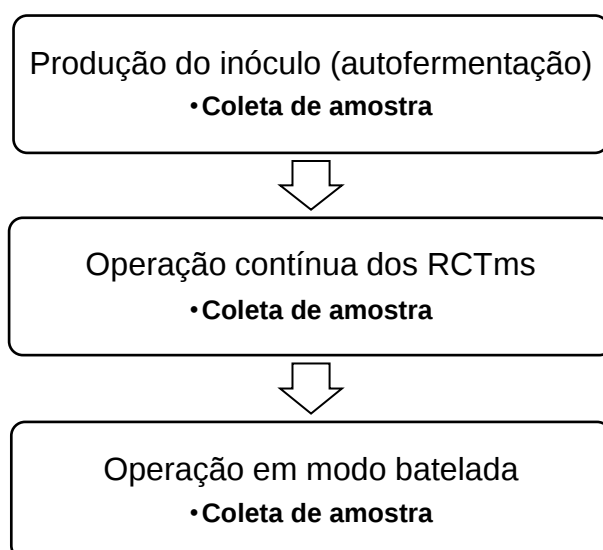
Composto	Símbolo	Fórmula	Massa molar (g mol ⁻¹)	Reação de oxidação	Fator de equivalência
Carboidratos	CH	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342,29	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ + 12O ₂ → 12CO ₂ + 11H ₂ O	1,12 gDQO g ⁻¹ CH
Glicerol	GLI	C ₃ H ₈ O ₃	92,09	C ₃ H ₈ O ₃ + 7/2O ₂ → 3CO ₂ + 4H ₂ O	1,22 gDQO g ⁻¹ GLI
Ácido Lático	HLa	C ₃ H ₆ O ₃	90,08	C ₃ H ₆ O ₃ + 3O ₂ → 3CO ₂ + 3H ₂ O	1,07 gDQO g ⁻¹ HLa
Ácido acético	HAc	C ₂ H ₄ O ₂	60,05	C ₂ H ₄ O ₂ + 2O ₂ → 2CO ₂ + 2H ₂ O	1,07 gDQO g ⁻¹ HAc
Ácido propiônico	HPr	C ₃ H ₆ O ₂	74,08	C ₃ H ₆ O ₂ + 7/2O ₂ → 3CO ₂ + 3H ₂ O	1,51 gDQO g ⁻¹ HPr
Ácido butírico	HBu	C ₄ H ₈ O ₂	88,11	C ₄ H ₈ O ₂ + 5O ₂ → 4CO ₂ + 4H ₂ O	1,82 gDQO g ⁻¹ HBu
Etanol	EtOH	C ₂ H ₆ O	46,07	C ₂ H ₆ O + 3O ₂ → 2CO ₂ + 3H ₂ O	2,09 gDQO g ⁻¹ EtOH
Hidrogênio	H ₂	H ₂	2,02	H ₂ + 1/2O ₂ → H ₂ O	8,00 gDQO g ⁻¹ H ₂

Fonte: Autor (2022).

4.9. Análises moleculares

A microbiota desenvolvida ao longo da operação de fermentação escura com vinhaça de cana de cana-de-açúcar foi caracterizada a partir de análises de biologia molecular em amostras de biomassa coletadas: (i) no inóculo (processo de autofermentação), (ii) nas biomassas acidificadas obtidas no final da operação contínua dos RCTMs e (iii) nas biomassas obtidas após o ensaio de reatores em batelada, conforme é apresentado no esquema da Figura 13.

Figura 13. Fluxograma informativo de quantidades de amostras coletadas para realização de análise de biologia molecular.



Fonte: Autor (2022).

Após a coleta das amostras, estas foram preparadas a partir da separação e lavagem de células suspensas por meio de centrifugação (5min a 4000rpm) e solução de PBS, com o objetivo de obter pellets de 1,0g de biomassa. Posteriormente, estes pellets foram submetidos ao processo de extração de DNA utilizando-se o kit *FastDNA SPIN* para solos (*MP Biomedicals, Irvine, CA, USA*), e ainda seguindo todas as instruções fornecidas pelo fabricante para adição e tempo de reação. Os principais componentes do kit são: Lysing Matrix E 50x tubos de 2.0 mL, tampão de fosfato de sódio 60 mL, tampão de MT 8 mL, solução de PPS 25 mL, matriz de ligação 66 mL, módulos de SPIN, tubos de captura, concentrado SEWS-M 12 mL, DES 20mL, BBS Gel Carga 200 µl.

Em sequência, o DNA extraído foi enviado para o Laboratório NGS Soluções Genômicas para a análise de amplificação do DNA com primers para região de interesse 16S v3-v4 (341F-785R), inclusão dos barcodes, pool das amostras, quantificação do pool e sequenciamento (2x150 ou 2x250, média de cobertura de 50.000 paired-end reads por amostra), e também para análise de bioinformática básica para identificação taxonômica.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo, são apresentados os resultados e discussão referentes aos objetivos propostos no presente trabalho. O estudo do controle em função da COVe da produção de hidrogênio, a partir de água sintética à base de sacarose e a partir de vinhaça de cana-de-açúcar, em reatores contínuos de tubos múltiplos (RCTMs). Inicialmente, foram analisados os resultados do ensaio dos reatores no período de 70 dias com água sintética em condições de operação iguais a $COV = 96 \text{ g DQO L}^{-1} \text{ d}^{-1} \text{ a}$ e $TDH = 4 \text{ h}$, na segunda etapa foram analisados os resultados do ensaio dos reatores no período de 93 dias com vinhaça de cana-de-açúcar nas seguintes condições de operação: E1 ($TDH = 24 \text{ h}$, $COVa = 33,6 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$); E2 ($TDH = 12 \text{ h}$, $COVa = 57,6 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) e E3 ($TDH = 8 \text{ h}$, $COVa = 72,0 \text{ gDQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$).

Nesses ensaios foram avaliados o crescimento de biomassa e o controle da COVe, além da influência da carga orgânica volumétrica aplicada, do TDH e da concentração de matéria orgânica, em termos de DQO afluente. O desempenho dos ensaios foi comparado a diferentes estudos, com sistemas biológicos anaeróbios de produção de hidrogênio, a fim de discutir as potencialidades e futuras perspectivas da configuração estudada.

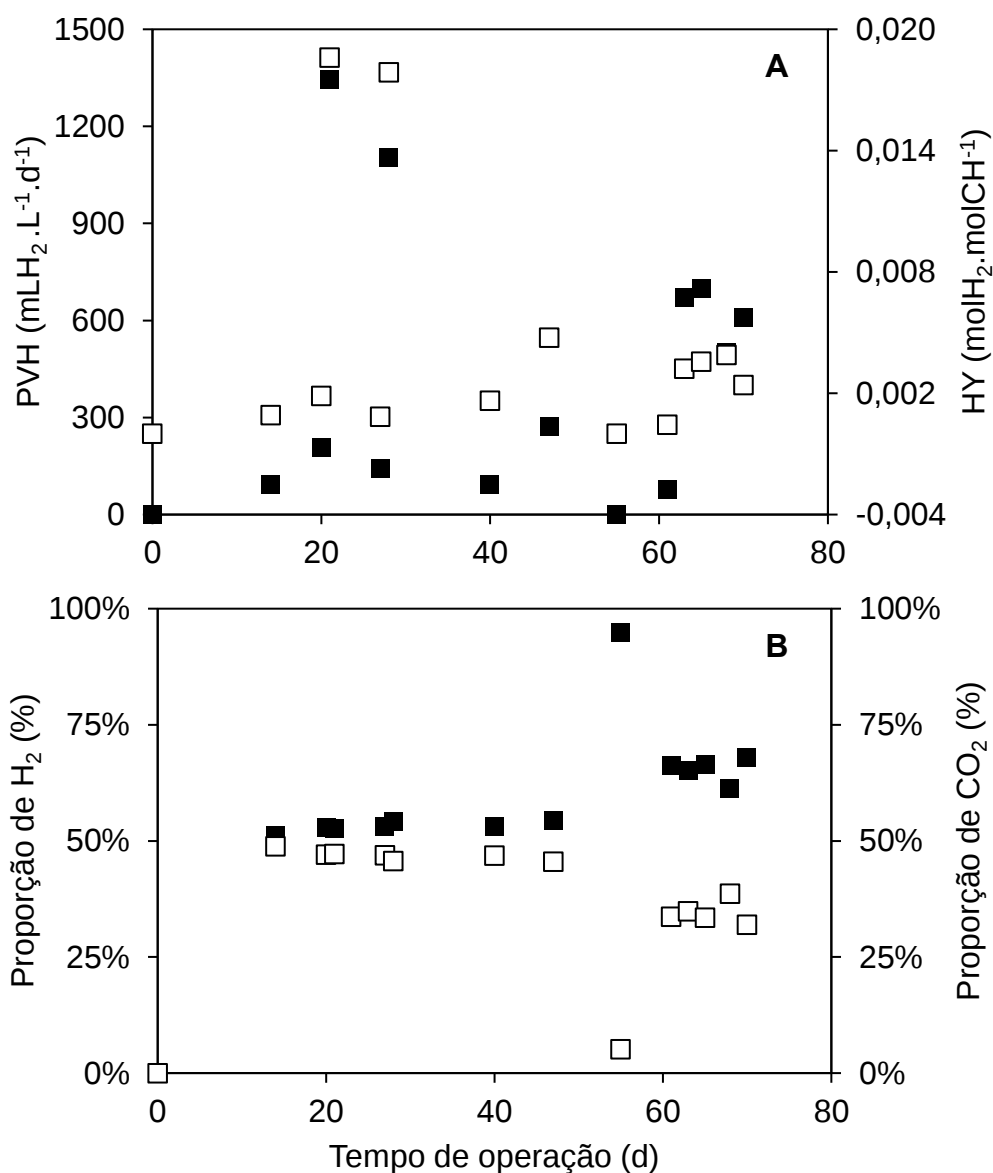
5.1. Desempenho do RCTM18: água sintética

5.1.1. Produção e Rendimento de hidrogênio

Destaca-se no perfil temporal de produção volumétrica (PVH) e rendimento de hidrogênio (HY) na Figura 14 A-B, que embora as curvas apresentem períodos de instabilidade na produção de hidrogênio com sacarose, é possível notar um pico crescente de produção de gás nos primeiros 20 dias de operação. Este

comportamento é comum em reatores anaeróbios acidogênicos e está associado a fase de aclimação a biomassa, como é discutido e estudado em trabalhos como Gomes et al. (2015), Anzola-Rojas et al. (2015), Gomes et al. (2016), Fuess et al. (2016), Fuess et al. (2017), Fuess et al. (2019), Trevisan et al. (2019).

Figura 14. Produção de BioH₂: A) produção volumétrica de hidrogênio (PVH), B) rendimento de hidrogênio (HY), C) proporção de H₂ e CO₂ na composição de biogás. **Legenda:** A) PVH (-■-); HY (-□-), B) CO₂ (-■-); H₂ (-□-)



Fonte: Autor (2022).

A produção volumétrica de hidrogênio (PVH) apresentou oscilação após o 25º dia até o final da operação (Figura 14). Assume-se, então, que neste período a biomassa já estava estabelecida e aclimatada para a produção de H₂. Uma vez que, de acordo com Anzola-Rojas et al. (2016), a fase de aclimação pode ser dividida em: fase transiente e fase de estabilidade. Entretanto, não se observou produção volumétrica significativa de hidrogênio no RCTM18.

Na comparação do valor médio de PVH do RCTM18 ($415,3 \text{ mLH}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1} \pm 4$) conclui-se que a esta baixa produção de hidrogênio pode estar associada a estabilização de bactérias consumidoras de hidrogênio, ou a microbiota voltada para rotas de produção de metabólitos secundários como ácido acético via homoacetogênese e etanol. Ainda, os valores baixos de PVH podem estar associados ao fenômeno de lavagem de biomassa onde uma parte da biomassa produzida é carregada para saída do reator e liberada juntamente com o efluente, isto é visto também em condições de sobrecarga orgânica ($\text{COVa} \sim 100 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$) (ANZOLA-ROJAS et al., 2015), caso deste trabalho que verificou o rendimento de hidrogênio a partir de água sintética (base sacarose) com aparente valor de sobrecarga orgânica de $96 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$.

De acordo com os estudos de Gavala et al. (2006) e Lo et al. (2008) relatados no trabalho de Trevisan (2020), maiores produções de H₂ podem ocorrer com o aumento de concentração de carboidratos, porém existe um limite em que acontece a alteração do metabolismo bacteriano, e inicia-se a produção de metabólitos secundários como álcoois que podem direcionar a rotas consumidoras de hidrogênio. Como resultado, tem-se a diminuição da produção de H₂.

O aumento de produção de hidrogênio no início da operação, principalmente a produção máxima obtida ($1315,45 \text{ mLH}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1} \pm 424$), pode indicar a presença de bactérias produtoras de hidrogênio (BPH), o que permite um aproveitamento mais eficiente do substrato em termos de manutenção celular nos primeiros dias de operação (ANZOLA-ROJAS et al, 2015; FUESS et al, 2018).

A PVH média observada no RCTM18 ($415,3 \text{ mLH}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1} \pm 424$) é menor que o valor da PVH reportado em Gomes et al. (2015) igual a $1470 \text{ mLH}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, e foi investigado a mesma configuração RCTM, porém com menor número de tubos (12 tubos). Pode-se inferir que a proposta de aumentar a área superficial com o aumento da quantidade de tubos não favoreceu a produção de hidrogênio ou o rendimento do

processo nas condições operacionais desta pesquisa, porém não se pode associar a produção de hidrogênio apenas com a estrutura do reator em estudo.

Trevisan (2020) operou o RCTM12 nas mesmas condições testadas neste estudo com RCTM18 (TDH = 4h e COVa = 96 g DQO L⁻¹ d⁻¹) em sistema contínuo e o mesmo meio sintético a base de sacarose. A autora também relatou valores reduzidos de PVH ao longo de uma operação de 80 dias. No estudo, a pesquisadora obteve o valor médio de PVH (209,3 mLH₂ L⁻¹ d⁻¹ ± 130,6) menor que o encontrado no RCTM18 (415,3 mLH₂ L⁻¹ d⁻¹ ± 424,1), indicando que a quantidade de substrato em situações de sobrecarga pode ter causado inibição aos microrganismos presentes no meio. Em comparação com a PVH máxima, o RCTM18 apresentou melhor performance menor (1315,45 mLH₂ L⁻¹d⁻¹ ± 424) que a encontrada pelo RCTM12 (453,8 mLH₂ L⁻¹d⁻¹ ± 130,6). Estes resultados demonstram que a condição de sobrecarga afeta a produção de H₂ na configuração RCTM em meio sintético a TDH igual a 4h, e que a diferença de número de tubos (área superficial) pode minimizar os efeitos de sobrecarga na produção de H₂, e melhorar a produção de H₂. É relevante citar que a produção de H₂ pode ser vista como resultado da ação de um conjunto de parâmetros como pH, configuração de reator, temperatura, controle em função da COVe. Por isso, é importante otimizar o processo a partir da investigação da interferência do conjunto de parâmetros e não apenas de um deles, de forma isolada.

Em termos de HY, a configuração RCTM18 apresentou o valor HY médio igual a 0,0023 molH₂ molCH⁻¹ ± 0,0006 enquanto o RCTM12 de Gomes et al. (2015) apresentou valores de HY entre 0,4 – 0,6 molH₂.molCH⁻¹ nas três condições estudadas E1 (TDH = 2 h e DQO = 2g L⁻¹), E2 (TDH = 2 h e DQO = 4g L⁻¹) e E3 (TDH = 4 h e DQO = 2 g.L⁻¹) para sistema alimentado com água sintética com base sacarose. De uma forma geral, observa-se que a configuração RCTM12 apresentou rendimentos baixos em relação a produção de BioH₂ assim como o RCTM18, os autores associam estes rendimentos de hidrogênio devido a controle da COVe acima de 10 gDQOg⁻¹ SSVd⁻¹.

Os valores nulos de PVH e HY nos dias 47º e 55º dias de operação podem ser justificados, por exemplo pelo pH, os quais comprovam que valores abaixo de 5 resultam em baixa produção de hidrogênio e na faixa de 5 a 7, relacionado aos melhores rendimentos de produção de hidrogênio (TREVISAN, 2020) (Figura 14). O pH ao longo da operação neste estudo se manteve em média a 4,4 ± 0,9, pH menor que 5 e não propício para produção de hidrogênio, entretanto, o valor de pH de

operação médio estudado por Trevisan (2020) igual a $4,2 \pm 0,5$ para a mesma condição de sobrecarga, aponta um rendimento médio de hidrogênio igual $0,10 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ Sac} \pm 0,1$, o qual é maior que rendimento apresentado por RCTM18 ($0,043 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol CH}^{-1} \pm 0,006$). Isto nos direciona a discussão da presença de bactérias ativas dentro do reator ao longo a operação para a manutenção celular, isto é, ativas na produção de substâncias poliméricas extracelulares (exopolímeros) para a microbiota se fixar na superfície interior dos tubos (BRAGA et al., 2016). Ao relacionar a taxa de produção de H_2 com a dinâmica da COVe, é possível observar na Figura 14, que o valor de COVe médio determinado no RCTM18 ($4 \text{ gDQOg}^{-1} \text{ SSVd}^{-1} \pm 0,5$) está relacionado com rendimentos baixos de hidrogênio verificados na

Figura 14 A-B. A literatura reporta que para valores de COVe na faixa $4,0\text{-}6,0 \text{ gDQOg}^{-1} \text{ SSVd}^{-1}$, encontram-se rendimentos significativos de BioH_2 , como $4,9 \text{ mol H}_2 \text{ mol sacarose}^{-1}$ (Van GINKEL et al., 2001) e $2,2 \text{ mol H}_2 \text{ mol sacarose}^{-1}$ (ANZOLA-ROJAS & ZAIAT, 2016). Embora o RCTM18 tenha apresentado um ótimo controle de COVe, os valores de rendimento de BioH_2 ao longo da operação foram baixos atingindo valor médio igual a $0,043 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol CH}^{-1} \pm 0,006$, isto pode indicar que as bactérias presentes no RCTM18 estavam ativas para a manutenção celular. Esta hipótese para as taxas reduzidas de H_2 podem ser justificadas pelos estudos de Hafez et al. (2010) e Anzola-Rojas et al. (2016), que avaliaram a resposta da biomassa em sistemas acidogênicos, em condições de excesso de substrato ou elevados valores de COVe, e verificaram que a perda de desempenho, quanto à produção de hidrogênio, tende a ocorrer em razão da inibição da biomassa pelo substrato (condições de sobrecarga), o que também foi discutido e verificado em Trevisan (2020).

De uma forma geral, os valores baixos de PVH e HY no RCTM18 podem ser associados com a instabilidade na produção ao longo da operação e rendimentos nulos no período entre 55º a 61º dias de operação, tais valores nulos para PVH e HY nestes dias podem estar associados ao acúmulo de biomassa ocorrido na câmara de entrada de ambos os reatores em estudo, resultando em entupimento dos tubos do reator. Isto pode ter ocasionado à diminuição do fluxo do fluido ao longo do reator e consequentemente a perda na eficiência de produção de hidrogênio. Ainda, está baixa produção pode estar associada a baixa remoção de sacarose nestes dias em torno de 25%.

Ainda na Figura 14B, é possível verificar a composição de biogás produzido, atingindo porcentagem máxima de 48,9%. No dia 47º e 55º dias, a composição do biogás foi, predominantemente, formada por gás carbônico, o que é confirmado com valores de HY nulos (Figura 14) e os baixos valores de COVe (Figura 16) nestes dias de operação, isto pode estar associado também com erros de operação. Em nenhum reator foi detectada a presença de metano.

A Tabela 12 apresenta um resumo do desempenho do reator estudado neste trabalho.

Tabela 12. Desempenho do RCTM18 no ensaio realizado com água sintética.

Variáveis	COVa = 96 g DQO L ⁻¹ d ⁻¹
	Resultados
pH	4,4±0,9
	5,7 (20)
ER _{DQOt} (%)	15±8,2
	23,9 (20)
	51,4 (20)
ER _{CH} (%)	23,54±14,1
	42,7 (20)
SSVe (g L ⁻¹)	0,2±1,3
	6,88 (20)
H ₂ (biogás) (%)	42,1±6,5
	48,9 (20)
PVH (mL H ₂ L ⁻¹ d ⁻¹)	415,1±422,1
	1345 (20)
HY (mol H ₂ mol ⁻¹ Sac)	0,042±0,006
	0,01 (20)

Notas: Valores entre parênteses correspondem ao número de amostras, considerado no cálculo da média. Valores em *itálico* correspondem aos máximos observados no referido período operacional. Variáveis-resposta: pH = pH de saída; ER_{DQOt} = eficiência de remoção de DQO total; EC_{SAC} = eficiência de conversão de sacarose; SSVe = concentração de sólidos suspensos voláteis no efluente do reator; H₂ (biogás) = proporção de hidrogênio no biogás; VBG = vazão de biogás; PVH = produção volumétrica de hidrogênio; HY = rendimento de hidrogênio. **Fonte:** Autor (2022).

5.1.2. Conversão de substratos e pH

O perfil temporal para o pH ao longo da operação com água sintética é apresentado na Figura 15A. Diversos estudos têm destacado a influência do pH em sistemas anaeróbios para produzir biogás, seja rico em metano ou rico em hidrogênio, seja para água residuária sintética ou água residuária real. Com os dados obtidos neste trabalho, verificou-se um comportamento semelhante de variação de pH na configuração estudada ao longo da operação com água sintética e vinhaça.

Na Figura 15A observa-se que o pH permaneceu entre a faixa de 4,0-4,5 no RCTM18 faixa próxima de pH (3,9 – 4,7) reportada por Gomes et al. (2015), para a mesma configuração RCTM. Estes valores estão abaixo da faixa ótima (5,0-7,0) para produção de hidrogênio termofílica indicada na literatura para reatores que apresentam material suporte (leito fixo) (FUESS et al., 2016).

O pH médio ao longo da operação do RCTM18 ($4,4 \pm 0,9$) foi próximo ao valor médio de pH obtido por Trevisan (2020) ($4,2 \pm 0,5$). Estes resultados encontram-se abaixo do pH adequado de sistemas fermentativos aplicados à produção de H_2 (pH=5,5) (OLIVEIRA et al., 2020). Ainda, estes resultados mostram que, apesar da diferença de tubos dos reatores, os valores médios do pH efluente foram similares na condição de operação ($DQO = 16 \text{ g L}^{-1}$ e $COVa = 96 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) testada em ambos os RCTMs.

Evidencia-se que a PVH no RCTM18 aumentou nos primeiros 20 dias de operação e depois permaneceu em torno de $600 \text{ mL } H_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ entre o período de 50º e 60º dias, este perfil de produção pode estar associado a valor de pH igual a 4, e atingindo a produção nula de hidrogênio no 57º dia. O valor de pH ao longo da operação em torno de 4,4 está abaixo do valor ótimo para o processo fermentativo (5,5), e revela a importância de controlar e manter o pH na faixa ideal para obter uma produção estável e otimizada de hidrogênio. Não se pode afirmar que a produção de hidrogênio baixa neste dia é exclusivamente ligada ao pH, já que a produção depende de um conjunto de parâmetros monitorados ao longo da operação, por isso, está baixa produção pode estar associada a estrutura do reator, a variação da carga orgânica neste dia.

Considerando que o controle adequado do pH permite verificar alterações nas vias metabólicas ou nos fenômenos de produção e adesão de biomassa (ANTONOPOULOU et al., 2010; DAREIOTI et al., 2014; FUESS et al., 2019), a partir

do 47º dia de operação, optou-se por não corrigir o pH com ácido clorídrico, apenas adicionou-se o bicarbonato de sódio, porém não se verificou aumento significativo no pH dos reatores em estudo.

A conversão de matéria orgânica é expressa em DQO e carboidratos totais. Desta forma, o perfil temporal da conversão de carboidratos (ER_{CH}) ao longo da operação de 70 dias com água sintética pode ser vista na Figura 15 B.

Na Figura 15B observa-se o valor mínimo de conversão obtidos o RCTM18 igual a $12,16\% \pm 14,1$ no 21º dia. A conversão máxima de carboidratos obtida $48,54\% \pm 14,6$, respectivamente no último dia de operação. Ao validar esses resultados com os resultados encontrados na literatura, verifica-se que a conversão média de carboidratos do RCTM18 ($23,45\% \pm 14,1$) ficaram abaixo do valor da conversão média de carboidratos ($64,4\%$) reportada no trabalho de Gomes et al., (2015), no qual investigou a produção de hidrogênio em meio sintético em um RCTM com 12 tubos, TDH de 4h, COVa $24 \text{ gDQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ e temperatura de 25°C .

Estes resultados também diferem do valor reportado no estudo de Gomes et al. (2016), o qual obteve uma conversão de carboidratos igual a $98,4\%$ para produção de hidrogênio em RCTM com 12 tubos nas condições de sistema contínuo, meio sintético, material suporte na saída, TDH = 4 h, COVa = $24 \text{ gDQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. A configuração RCTM também foi estudada no trabalho de Trevisan et al. (2019) em sistema contínuo nas condições de TDH = 2 h e COVa = $24 \text{ gDQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, meio sintético igual ao reportado neste estudo, os autores reportam um consumo de carboidratos igual a $77,7\%$ o qual é semelhante ao valor reportado por Anzola-Rojas et al. (2016), ambos maiores que as conversões obtidas neste estudo para RCTM-18. O trabalho de Anzola-Rojas et al. (2015) obteve eficiência média de conversão de sacarose na faixa de $48\% - 71\%$ em reator de leito fixo, operado com e sem descartes de biomassa. No entanto, o valor conversão de carboidratos obtido no RCTM18 ($23,45\% \pm 14,1$) é semelhante ao valor determinado ($21,9 \pm 12,1$) no trabalho de Trevisan (2020), a qual operou o RCTM12 nas mesmas condições do estudo realizado nesta tese.

É interessante citar que Trevisan (2020) também estudou a condição de sobrecarga (COVa = 96) em TDH igual a 2h. Nesta condição, o percentual médio de conversão da sacarose obtido foi igual a $69,7 \pm 10,4$, valor maior em relação ao valor médio encontrado pela própria autora em TDH igual a 4 ($21,9 \pm 12,1$) e maior que o valor encontrado no RCTM ($23,45\% \pm 14,1$). Estes resultados podem sugerir o aumento do TDH tenha influenciado negativamente a conversão de sacarose, porém,

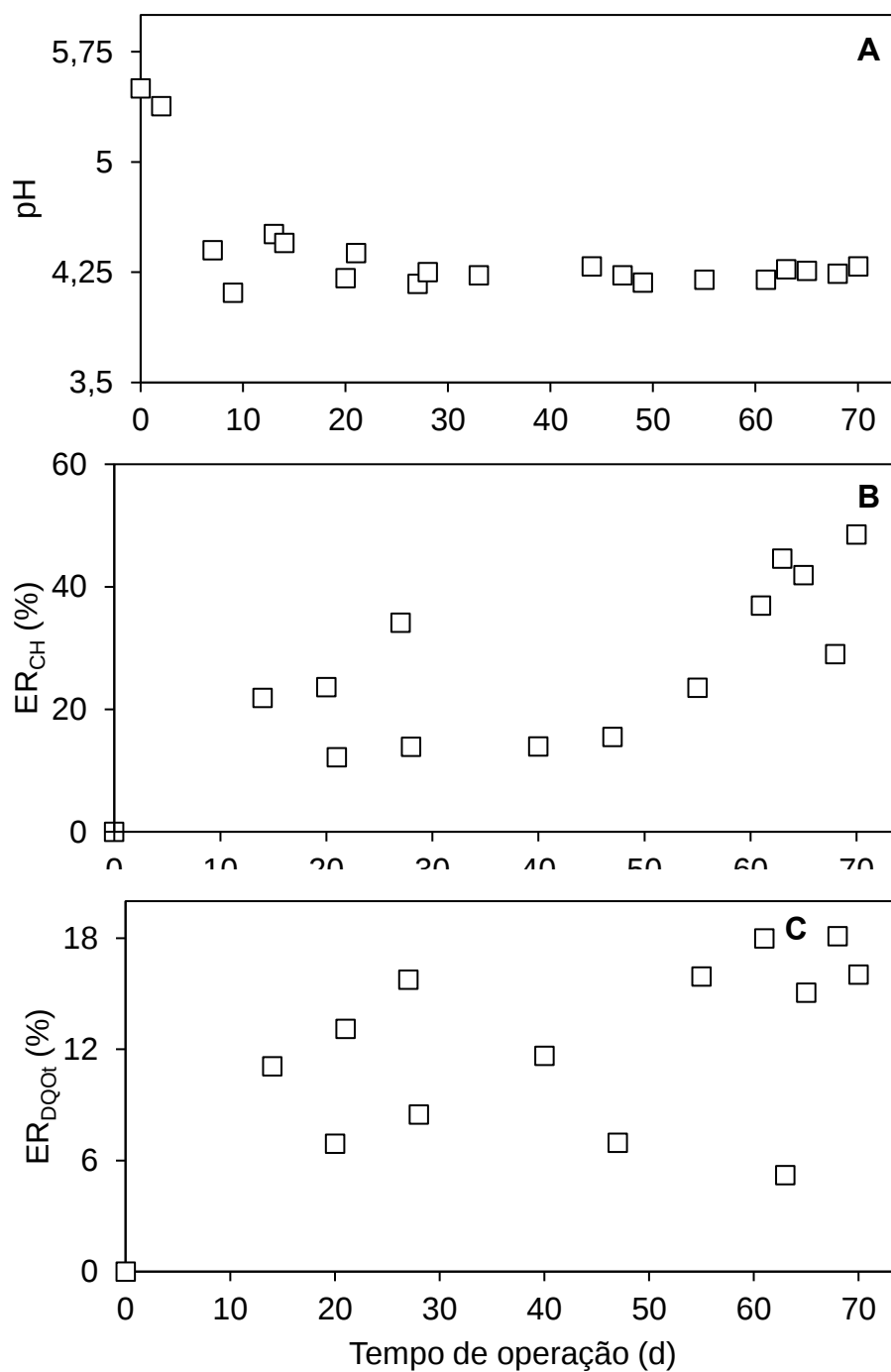
de acordo com os estudos de Manssouri et al. (2013), Inoue et al. (2014) e Anzola-Rojas et al. (2016), estes resultados não indicam que o TDH pode reduzir a conversão de sacarose. Por outro lado, pode-se inferir que as menores conversões de carboidratos obtidas nos ensaios de TDH igual a 4h, podem estar relacionadas ao aumento da concentração de substrato (sobrecarga orgânica), em termos de DQO.

É importante entender que escolha do substrato na operação de um reator considera critérios como a disponibilidade, custo e conversão (biodegradabilidade) (HAWKES et al., 2002). Neste contexto, carboidratos simples, como sacarose, é utilizada como substrato modelo para a produção do biohidrogênio uma vez que permite o maior controle a nível de biodegradabilidade ao longo do processo (VAN GINKEL et al., 2005; TREVISAN et al., 2020). Por outro lado, fontes puras de carboidratos representam matérias-primas caras para a produção de hidrogênio em grande escala, sendo viáveis apenas quando baseadas em fontes renováveis e de baixo custo (Das, 2002).

Ainda na Figura 15C é possível verificar o perfil temporal para a remoção de DQO (total) ao longo da operação com água sintética. O valor de remoção de DQOt máximo obtido foi igual a $17,92\% \pm 5,4$ para RCTM18. A eficiência de remoção de DQOt média observada na operação com a água sintética resultou em $11,59\% \pm 5,4$, este valor foi inferior ao reportado em Gomes et al. (2015) e Trevisan et al. (2019), igual a 12 - 19,2% e 19,1%, respectivamente. Logo, em termos de redução de DQOt, o RCTM na presença de água sintética apresentou valor abaixo da faixa de valores esperados quando comparados com outros sistemas que utilizaram água sintética. É importante destacar que a eficiência de remoção de DQOt obtida neste projeto está relacionada com a COVa de $96 \text{ kgDQO.L}^{-1}\text{d}^{-1}$, uma COVa considerada alta comparada com os trabalhos citados.

Em comparação com o trabalho de Trevisan (2020) para o RCTM12 a COVa de $96 \text{ kgDQO.L}^{-1}\text{d}^{-1}$, o valor médio obtido para remoção de DQOt igual a $21,9\% \pm 12,1$ é maior quando com o valor obtido para RCTM18 neste estudo ($11,59\% \pm 5,4$). Ainda, estudos como o de Lovato et al. (2015) também relata valores de remoção de DQO máxima de 38% e mínima de 17%, valores maiores que os encontrados no RCTM18 e. Pode-se concluir que o RCTM18 não apresentou boa performance na redução de DQOt ao longo da operação, o que pode ser investigado em trabalhos futuros.

Figura 15. Monitoramento do RCTM18: A) pH, B) conversão de carboidrato total, C) redução DQOt.



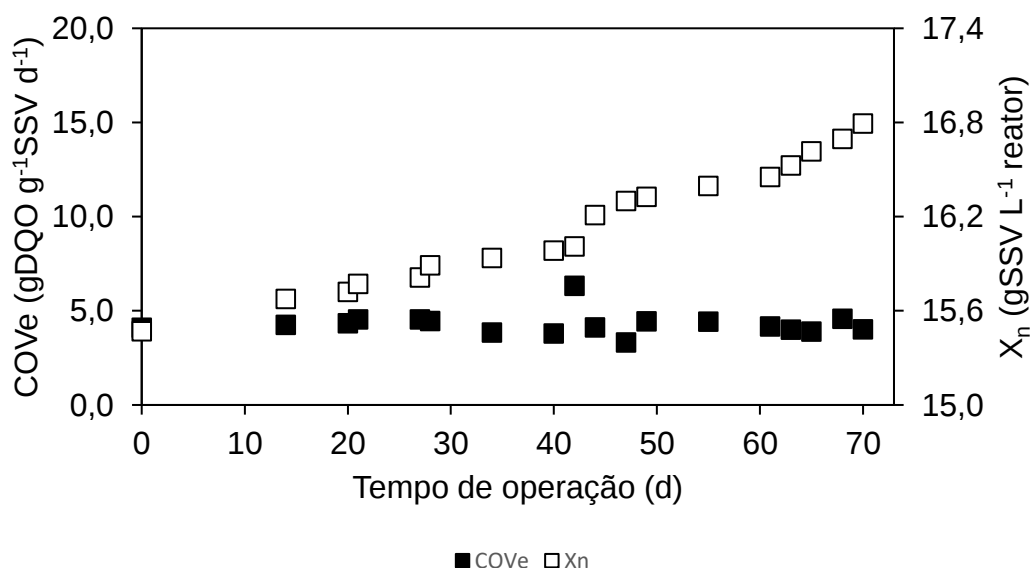
Fonte: Autor (2022).

5.1.3. Produção de biomassa e dinâmica da COVe

Para acompanhamento do desenvolvimento de biomassa no reator, análises de SSV dos efluentes acidificados foram realizadas semanalmente. As determinações de COVe foram realizadas ao final de cada ensaio. Os resultados da Figura 16 retratam a dinâmica do acúmulo de biomassa no RCTM e apresenta a variação da COVe ao longo do tempo de operação.

Observa-se que embora o reator tenha acumulado biomassa ao longo do tempo, a produção H_2 (Figura 14) e consumo do substrato (Figura 15B) acabaram sendo afetadas negativamente na COVa igual $96 \text{ gDQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, a qual é considerada uma sobrecarga para reatores acidogênicos e afeta a produção de H_2 , de acordo com Manssouri et al. (2013). Esses autores discutem que a geração de H_2 pode ser afetada pela maior retenção de biomassa, devido o consumo de substrato seguir o perfil de rotas metabólicas desfavoráveis à produção de H_2 . Ainda, os autores observaram por meio de monitoramento dos metabólitos, que, nos ensaios de maior concentração de substrato, a formação de etanol se mostrou significativa desde o início do ciclo, o que fez com que reduzisse a produção. Portanto é importante analisar a concentração de biomassa pois afeta a estabilidade do sistema e o rendimento de hidrogênio.

Figura 16. Dinâmica da retenção e acúmulo de biomassa no RCTM18.



Fonte: Autor (2022).

Os dados da produção e retenção de biomassa para cada ensaio estão resumidos na Tabela 13.

O valor médio de COVe para o ensaio com RCTM18 obtido foi igual a $4,264 \text{ g DQOg}^{-1} \text{ SSV d}^{-1} \pm 0,561$. Este resultado de COVe média é semelhante aos valores recomendados pela literatura para a produção de hidrogênio em reatores acidogênicos. Hafez et al. (2010) associaram os maiores valores de HY para valores de COVe entre 4,4 a 6,4 $\text{g DQOg}^{-1} \text{ SSV d}^{-1}$. Semelhantemente a esses valores, Anzola-Rojas et al. (2016) relataram que as melhores produções de hidrogênio coincidiram com valores de COVe na faixa de 4,3 a 6,9 $\text{g DQOg}^{-1} \text{ SSV d}^{-1}$. Da mesma maneira, Anzola-Rojas e Zaiat (2015) justificaram o valor de 4,8 $\text{g Sac g}^{-1} \text{ SSV d}^{-1}$ como condição ideal para estabilidade na produção de H_2 . Por sua vez, os resultados de Anzola-Rojas et al. (2015) mostraram que os maiores valores de HY foram observados para uma COVe média de 6,0 $\text{g Sac g}^{-1} \text{ SSV d}^{-1}$.

O trabalho de Trevisan (2020), o qual foi o trabalho base para definir as condições operacionais no estudo do RCTM18, logo o principal modelo comparativo, obteve a COVe média igual a $19,26 \text{ g Sacarose g}^{-1} \text{ SSV d}^{-1} \pm 12,3$, valor maior que a COVe média para o RCTM18 ($4,264 \text{ g DQO g}^{-1} \text{ SSV d}^{-1} \pm 0,561$). Os autores afirmam que COVe média igual a $19,26 \pm 12,3$ é superior aos valores recomendados pela literatura (HAFEZ et al., 2010; ANZOLA-ROJAS et al., 2015; GOMES et al., 2015), como resultado a produção contínua e constante de H_2 não é alcançada eficientemente, uma vez que valores de COVe fora das faixas adequadas podem ocasionar prejuízos na produção de H_2 pelo excesso de biomassa arrastada (lavagem celular) do reator, ou seja, pelo desequilíbrio na relação alimento/microrganismo.

O valor de COVe médio obtido no RCTM18 ($4,0 \text{ gDQOg}^{-1} \text{ SSVd}^{-1}$) foi menor que o valor de COVe médio estimado por Anzola-Rojas et al. (2015) no estudo de um reator de leito fixo mesofílico alimentado com água sintética. Os autores mostram que a COVe apresentou uma diminuição ao longo da operação de 60 dias, e os melhores rendimentos de hidrogênio foram obtidos quando a COVe atingiu o valor igual a 6,0 $\text{gDQOg}^{-1} \text{ SSVd}^{-1}$. Ainda, eles verificaram que para valores de COVe abaixo do ótimo encontrado ($6,0 \text{ gDQOg}^{-1} \text{ SSVd}^{-1}$), ocorreram mudanças nas rotas metabólicas direcionadas para a predominância de bactérias homoacetogênicas. Ressalta-se que o reator RCTM18 é uma configuração que não precisa realizar descartes periódicos e não apresentou problemas de entupimento ao ponto de parar a operação.

Tabela 13. Balanço de biomassa no RCTM18 com TDH de 4h.

Biomassa/Substrato	Ensaio
	96 g DQO L ⁻¹ d ⁻¹
Biomassa dentro do reator (g)	15,47
Biomassa aderida (g)	2,5
Biomassa suspensa (g)	1,2
Biomassa arrastada naturalmente (g)	654,0
Total biomassa gerada (g)	673,17
Total sacarose consumida (g)	39596,34
Coeficiente de rendimento celular da biomassa $Y_{X/S}$ (g SSV g ⁻¹ sac)	0,185
Biomassa arrastada (%)	97%
Biomassa dentro do reator (%)	2,2%
COVe (g Sac g ⁻¹ SSV d ⁻¹)	4,264 ±0,561 (24)

Nota: Valor entre parênteses corresponde ao número de amostras considerado no cálculo da média.

Fonte: Autor (2022).

É válido citar que o valor da COVe apresenta influência sobre a produção de hidrogênio e o desempenho dos reatores, principalmente em sistemas de culturas mistas, porém atingir o valor adequado deste parâmetro no processo depende de vários fatores como a distribuição da estrutura microbiana dentro do reator, e isto envolve condições de temperatura, tipo de substrato, ação de interferentes, entre outros (ANZOLA-ROJAS et al., 2015).

O RCTM18 apresentou valores adequados de COVe controlados na faixa de 4,2-6,3 gDQO g⁻¹SSV d⁻¹. Estes valores de COVe foram diferentes dos valores de COVe reportados no trabalho de Gomes et al. (2015), o primeiro trabalho com a configuração RCTM. Os autores testaram o RCTM com 12 tubos no controle de COVe na produção de hidrogênio a partir de água sintética com composição similar utilizada neste estudo. Gomes et al. (2015) afirmam que não foi possível controlar a COVe devido a grandes variações deste parâmetro ao longo da operação. Eles discutem

valores na faixa de 29,29-5,77 gDQO g⁻¹SSV d⁻¹, 39,74-4,54 gDQO g⁻¹SSV d⁻¹ e 16,68-3,15 gDQO g⁻¹SSV d⁻¹, para as condições COVa = 2 g L⁻¹ e TDH = 2 h, e COVa = 4g L⁻¹ e TDH = 4 h, em que nas condições testadas a câmara de saída do reator foi preenchida com material de suporte poroso. Esta abordagem de utilizar material suporte não foi verificada no RCTM18. Isto evidencia que a proposta de aumento de área superficial na configuração RCTM18 permite a melhor adesão de biomassa sem necessitar de preenchimento de material suporte em partes específicas do reator, como por exemplo, câmara de entrada ou saída. Com os resultados obtidos foi possível verificar que a configuração RCTM18 apresenta melhor performance de controle da COVe em relação ao RCTM12 para sistema acidogênico alimentado com água sintética a base de sacarose, sem necessidade de adição de material suporte.

Os valores de COVe na faixa de 4,2-6,3 gDQOg⁻¹ SSVd⁻¹ mostraram que a configuração RCTM18 apresentou um controle adequado de COVe com valores semelhantes a faixa ótima encontrada na literatura de 2,0-7,0 gDQOg⁻¹ SSVd⁻¹ para reatores de leito fixo que apresentam crescimento de biomassa aderida (ANZOLA-ROJAS et al., 2015; FUESS et al., 2016, FUESS et al., 2019). Isto ratifica que o RCTM18 é uma tecnologia eficiente e de baixo custo a qual pode ser utilizada no controle em função da COVe assim como os reatores de leito fixo.

Ao comparar a faixa de valores de COVe obtidos com o RCTM18 (4,2-6,3 gDQOg⁻¹ SSVd⁻¹) com a faixa de valores encontrados no trabalho de Anzola-Rojas et al. (2016) igual a 3,8-6,2 gDQOg⁻¹ SSVd⁻¹, no qual foi utilizado um sistema acidogênico de leito estruturado com material suporte (polietileno de baixa densidade) em vários estágios e alimentado com água sintética (base sacarose), observa-se que os valores são semelhantes e se encontram dentro da faixa ótima citada na literatura. Desta forma, a tecnologia robusta RCTM, por dispensar a utilização de material suporte apenas usando tubos com ranhuras de rosca sem fim, para a fixação de células, pode ser considerada uma tecnologia economicamente mais viável que os reatores de leito fixo estruturado com polietileno de baixa densidade.

Ainda, no trabalho Anzola-Rojas & Zaiat (2016) foram testados três tipos de material suporte (polietileno de baixa densidade, espuma de poliuretano e cerâmica), considerando períodos de descarte de biomassa e períodos sem descarte de biomassa. O valor de COVe médio igual a 4,8 gDQOg⁻¹ SSVd⁻¹ foi obtido sem realizar descarte de biomassa ao longo do experimento, enquanto, o valor de COVe médio igual a 4,0 gDQOg⁻¹ SSVd⁻¹ foi obtido com descartes periódicos de biomassa,

considerando que os melhores desempenhos de retenção de biomassa foram encontrados para o polietileno de baixa densidade e a espuma de poliuretano. Comparando valores, observa-se que o valor de COVe ($4,0 \text{ gDQOg}^{-1} \text{ SSVd}^{-1}$) obtido com descarte periódico de biomassa no estudo de Anzola- Rojas & Zaiat (2016) foi igual ao valor de COVe médio obtido para o RCTM18 ($4,0 \text{ gDQOg}^{-1} \text{ SSVd}^{-1}$), isto ratifica que a região de tubos do RCTM18 apresenta potencial para adesão de biomassa como o material suporte utilizado em reatores de leito fixo.

O estudo de Blanco et al. (2017) em reator mesofílico de leito fixo alimentado com água sintética (base sacarose) investigou que o acúmulo de biomassa pode afetar diretamente a COVe do sistema, estimulando mudanças metabólicas que podem interromper a produção de BioH_2 após alguns dias de operação. Ainda, eles afirmam que, para baixos valores de COVe (altas concentrações de biomassa), as condições de escassez de substrato tendem a facilitar a rota de homoacetogênese que utiliza H_2 como doador de elétrons assim como Anzola-Rojas et al. (2015), o que explicaria os baixos níveis de produção de biogás observados em diferentes reatores de leitos fixos. Além disso, este estudo mostrou que os maiores rendimentos de BioH_2 foram associados à faixa de COVe entre $4,3\text{--}6,6 \text{ gDQOg}^{-1} \text{ SSVd}^{-1}$, como resultado do estabelecimento de condições equilibradas em termos de disponibilidade de substrato e retenção de biomassa dentro do reator estudado. Os resultados de COVe do RCTM18 ($4,2\text{--}6,3 \text{ gDQOg}^{-1} \text{ SSVd}^{-1}$) são semelhantes aos valores de COVe obtidos em Blanco et al. (2017), entretanto foram observados baixos rendimentos de hidrogênio no RCTM mesmo com este controle adequado de biomassa.

Quando se compara a faixa de COVe do RCTM18 ($4,2\text{--}6,3 \text{ gDQO g}^{-1} \text{ SSV d}^{-1}$) com a faixa obtida ($11,9\text{--}61,0 \text{ g sacarose g}^{-1} \text{ SSV d}^{-1}$) pelo estudo de Trevisan (2020), é possível observar que o controle da COVe é melhor em RCTM18, o que confirma a hipótese de que quanto maior a área superficial da região de tubos, melhor o controle em função da COVe, como resultado melhor retenção de biomassa.

De uma forma geral, a utilização da energia proveniente do substrato pode ser redirecionada para o crescimento e manutenção celular, ao invés da produção de BioH_2 (TREVISAN et al., 2020) e isto foi verificado no teste de RCTM18 alimentado com meio sintético, esta configuração apresentou perfil estável de controle em função da COVe, porém nenhuma produção de hidrogênio significativa foi observada durante a operação ($0,043 \text{ molH}_2.\text{mol}^{-1}\text{CH}$) quando comparado com outros rendimentos de hidrogênio encontrados na literatura, por exemplo, $0,4\text{--}0,6 \text{ molH}_2.\text{mol}^{-1}\text{CH}$ (GOMES

et al., 2015), 3,5 molH₂.mol⁻¹sacarose (ANZOLA – ROJAS et al., 2015), 0,48 – 0,51 molH₂.mol⁻¹sacarose (TREVISAN et al., 2019) e 0,1 molH₂.mol⁻¹sacarose (TREVISAN, 2020).

Considerando alguns trabalhos na literatura, a produção e o controle de biomassa também podem ser avaliados pela determinação do coeficiente de rendimento celular ($Y_{x/s}$), o qual representa o quanto de substrato foi convertido em células (biomassa). Neste trabalho, o valor obtido para o RCTM18 (0,18 gSSV g⁻¹CH) foi próximo dos valores de $Y_{x/s}$ iguais a 0,2 e 0,3 gSSV g⁻¹CH os quais estão associados a menores rendimentos de hidrogênio (HAFEZ et al., 2010). Aumentos nos valores de $Y_{x/s}$ em reatores acidogênicos indicam alteração na microbiota, com aumento da população de microrganismos não produtores de hidrogênio ou mesmo de seus consumidores.

O resultado de $Y_{x/s}$ igual 0,18 g.SSVg⁻¹.CH é maior que o valor obtido por Trevisan (2020) igual a 0,054 g SSV g⁻¹ sacarose e ainda maior quando comparado aos resultados relatados por Anzola-Rojas et al. (2015) e Anzola-Rojas & Zaiat (2016), estes autores encontraram valores de $Y_{x/s}$ próximos de 0,06 g.SSVg⁻¹.CH, o que caracteriza sistemas associados a bons rendimentos de hidrogênio. Além disso, o valor obtido neste trabalho de doutorado (0,18 gSSV g⁻¹CH) foi maior do que o valor encontrado por Gomes et al. (2015) de ~0,07g SSV g⁻¹ sac, no qual a produção de hidrogênio diminuiu continuamente até o 22º dia e praticamente cessou.

De acordo com Blanco et al. (2017), quando a biomassa é submetida a condições de arraste, o metabolismo das células é direcionado para o crescimento, a fim de manter uma alta densidade celular dentro do reator. Por outro lado, quando a biomassa é submetida a condições de adesão, a energia metabólica é utilizada principalmente em diferentes vias, ao invés da síntese celular. Considerando este contexto, o valor de $Y_{x/s}$ igual 0,18 gSSV g⁻¹CH pode estar associado ao maior arraste de biomassa.

5.1.4. Produção de metabólitos secundários para RCTM18 com água sintética

É comum a produção de metabólitos secundários no processo fermentativo anaeróbio de produção de BioH₂, uma vez que a este processo pode ocorrer por via piruvato, ou seja, por uma rota metabólica da glicose, onde o açúcar é quebrado a piruvato gerando ATP e NADH, por ação de microrganismos (ANZOLA-ROJAS et al.,

2015). Dependendo das condições de operação (TDH, substrato, temperatura, COVe), os microrganismos podem seguir rotas metabólicas diversas (ANZOLA-ROJAS et al., 2015).

Além de ser observada a produção de BioH₂ nos reatores acidogênicos na fermentação da água sintética, outros metabólitos solúveis (ácido láctico, ácido fórmico, ácido acético, ácido propiônico, ácido butírico, etanol) foram produzidos e suas concentrações podem ser observados na Figura 17 A-B. Os principais metabólitos quantificados no RCTM18 foram o ácido acético ($0,6 \text{ g L}^{-1} \pm 0,2$) e etanol ($0,42 \text{ g L}^{-1} \pm 0,2$), exceto entre o período compreendido entre o 0° e o 14° dias de operação. Neste caso, verificou-se um aumento na proporção de ácido butírico (HBu) na corrente efluente ao reator (~24%).

A produção de etanol é associada a baixos valores de pH, o processo de fermentação do tipo etanol é caracterizado por ocorrer na faixa de pH 4,0-5,0, (FUESS et al., 2017; FUESS et al., 2019), o que pode justificar os resultados obtidos para a produção de etanol, uma vez que o pH observado durante todo o período experimental foi em torno de 4,5 (Figura 17A). Este resultado de pH é validado com o estudo de Ren et al. (2007) o qual informa que a faixa adequada para a fermentação do etanol está entre 4,0-5,0. Vale ressaltar que a produção de EtOH em sistemas fermentativos tem sido associada com a preferência dos microrganismos produtores de H₂ para produzir solventes em condições de baixos valores de pH, corroborando o comportamento observado neste trabalho. Ainda, algumas espécies de *Clostridium* geralmente produzem etanol após a produção de hidrogênio a baixos valores de pH, em sistemas contínuos (ANZOLA-ROJAS & ZAIAT, 2016; TREVISAN, 2020).

Não foram observados acúmulos significativos dos ácidos láctico, fórmico propiônico e butírico, o que pode ser justificado pelos valores de concentração média iguais a $0,19 \text{ g.L}^{-1} \pm 0,1$, $0,08 \text{ g.L}^{-1} \pm 0,1$, $0,07 \text{ g.L}^{-1} \pm 0,1$, $0,08 \text{ g.L}^{-1} \pm 0,1$ respectivamente, ratificando que a produção de metabólitos secundários foi predominantemente composta por ácido acético e etanol. Os valores médios dos ácidos produzidos no reator são apresentados na Tabela 14.

Trabalhos tidos como referência em estudos de sistemas acidogênicos como Anzola-Rojas et al. (2015), Gomes et al. (2015), Ferraz-Jr et al. (2014b), Fuess et al. (2016), Gomes et al. (2016), Fuess et al. (2019) confirmam que o desempenho da fase acidogênica quanto à produção de hidrogênio pode ser melhor compreendida ao estudar o cálculo da razão entre as concentrações de ácido butírico e ácido acético

(HBu/HAc). De fato, observa-se valores da razão HBu/HAc menores que 1 para o RCTM-18 (0,3), porém valores baixos de HY foram verificados neste trabalho. Para o RCTU, o valor observado foi igual a 5,3 sugerindo que a principal rota fermentativa associada à produção de hidrogênio no reator RCTU pode ter sido tipo butírica.

Tabela 14. Resultados principais de metabólitos produzidos.

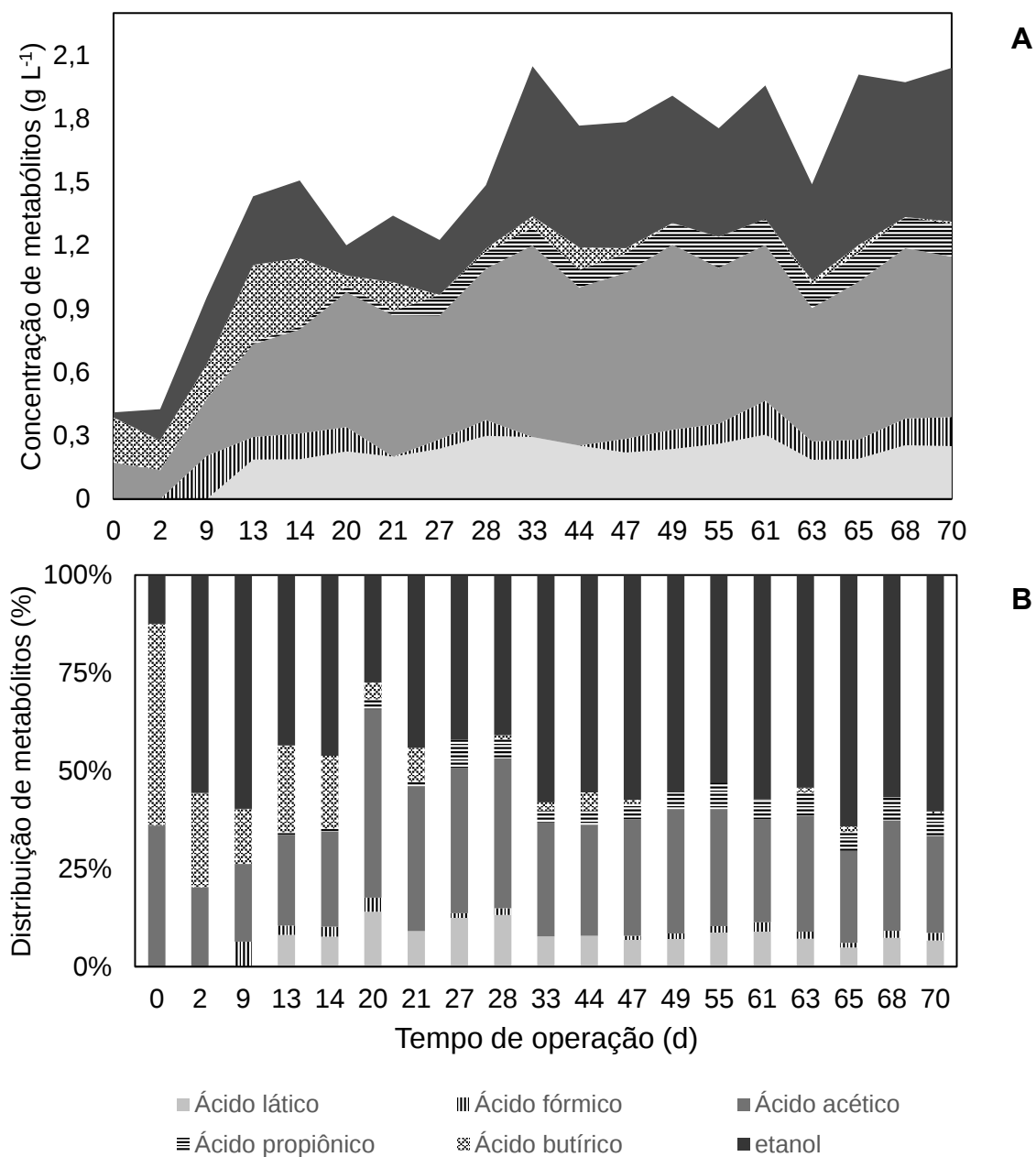
Ensaio	Metabólitos secundários					
	Ácido	Ácido	Ácido	Ácido	Ácido	Etanol
	Lático	Fórmico	Acético	Propiônico	Butírico	(EtOH)
	(HLA)	(HFO)	(HAc)	(HPr)	(HBu)	(g L ⁻¹)
	(g L ⁻¹)	(g L ⁻¹)	(g L ⁻¹)	(g L ⁻¹)	(g L ⁻¹)	
96 g DQO L ⁻¹	0,19±0,	0,08±0,0	0,59±0,2	0,07±0,06	0,08±0,1	0,42±0,2
¹ d ⁻¹	1	60,2	6	0,16	1	4
	0,3	(20)	0,9	(20)	0,36	0,81
	(20)		(20)		(20)	(20)

Notas: Valores entre parênteses correspondem ao número de amostras considerado no cálculo da média. Valores em *itálico* correspondem aos máximos observados no referido período operacional.

Fonte: Autor (2022).

A Figura 17 A-B apresenta a produção de metabólitos secundários no RCTM em estudo.

Figura 17. Metabólitos solúveis quantificados no RCTM18 ao longo da operação da fase acidogênica: A) perfil temporal de concentração de metabólitos e B) proporção de metabólitos Concentração e distribuição de ácidos.



Fonte: Autor (2022).

5.2. Desempenho dos RCTM10 e RCTM18: vinhaça de cana-de-açúcar

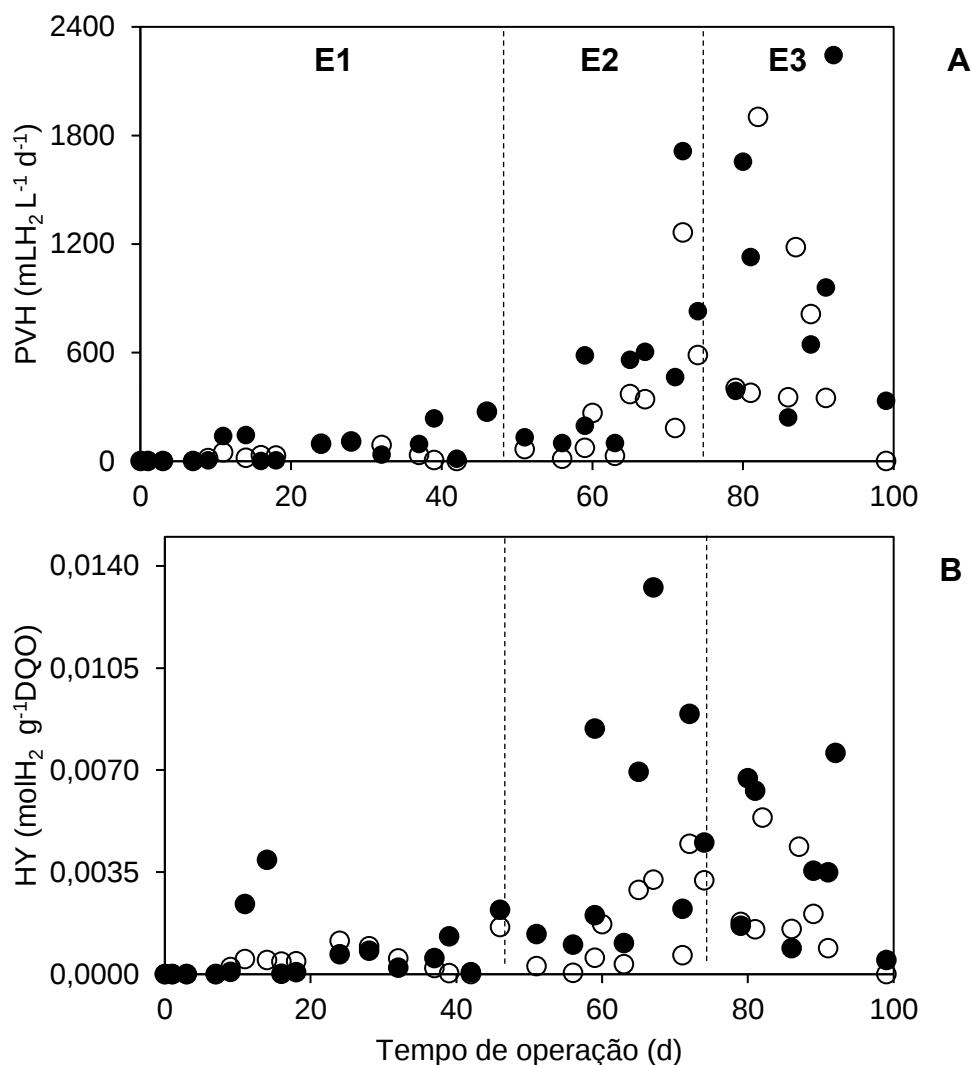
5.2.1. Produção e rendimento de H_2

A configuração RCTM ainda não tinha sido testada para vinhaça de cana-de-açúcar, desta forma, este trabalho é o primeiro com esta aplicação. Neste contexto, os dados de referência para estes parâmetros serão com base em estudos de reatores acidogênicos de leito fixo alimentados com vinhaça.

Para realizar este estudo, um teste de varredura foi realizado considerando três condições. Este teste de varredura consistiu em valores de TDH máximo para um mínimo (24, 12 e 8 h) e valores de COVa iguais a 32, 57 e 71 gDQO $L^{-1}d^{-1}$. O objetivo de testar estes parâmetros de operação foi determinar o valor de COVa ótima para a configuração RCTM alimentada com vinhaça de cana-de-açúcar, porém não foi possível obter uma COVa ótima nas condições testadas para os RCTMs, uma vez que o reator continuou apresentou um rendimento de hidrogênio crescente a medida que a COVa aumentava, o sugere um estudo com valores de COVa maiores que 71 gDQO $L^{-1}d^{-1}$.

Na Figura 18 A-B é possível notar o perfil temporal de produção e rendimento de hidrogênio na operação com a vinhaça. Observa-se um comportamento quase nulo de produção de hidrogênio nos primeiros 60 dias de operação. Considerando o estudo de varredura, neste período, os valores de TDH testados foram 24h para uma COVa de 31,87 gDQO $L^{-1} d^{-1}$ e TDH de 12h para uma COVa de 61,83 gDQO $L^{-1} d^{-1}$, a partir do 60º observa-se um período considerável de instabilidade nas produções e rendimentos de hidrogênio. Isto pode ser a resposta a perturbação de troca de TDH e COVa (8h e 71 gDQO $L^{-1} d^{-1}$). Neste período de 60º a 70º dias de operação atingiram-se os valores máximos para PVH e HY de 2243,3 mL H_2 $L^{-1} d^{-1}$ e 4 mol H_2 .molCH $^{-1}$ para o RCTM10, 1901,9 mL H_2 . $L^{-1} d^{-1}$ e 4 mol H_2 .molCH $^{-1}$ para o RCTM18. Esses valores máximos de PVH são maiores que os valores reportados em alguns sistemas acidogênicos de leito fixo alimentados com vinhaça e mantido a 55 °C, como é visto no estudo de Ferraz et al. (2015a) com uma PVH de 762 mL H_2 $L^{-1} d^{-1}$ para uma COVa igual a 84,2 kg DQO $m^{-3} d^{-1}$, e no estudo de Fuess et al. (2016) com o valor de PVH igual a 1604 mL H_2 . $L^{-1}d^{-1}$ para uma COVa igual a 84.2 kg DQO $m^{-3} d^{-1}$.

Figura 18. Produção de BioH₂ nos RCTMs: A) Produção volumétrica de hidrogênio (PVH). B) rendimento de hidrogênio (HY) na operação dos RCTMs com vinhaça de cana de açúcar. Legenda: RCTM10 (-●-); RCTM18 (-○-)



Fonte: Autor (2022).

O valor de HY médio obtido no RCTM18 ($0,0006 \text{ molH}_2 \text{ mol}^{-1}\text{CH} \pm 0,014$) e no RCTM10 ($0,0013 \text{ molH}_2 \text{ mol}^{-1}\text{CH} \pm 0,003$) foram inferiores em relação ao valor médio de HY igual a $1,5 \text{ molH}_2 \text{ mol}^{-1}\text{CH}$, apresentado no estudo de Fuess et al. (2016). Os autores reportam que o rendimento de hidrogênio obtido está associado a valores de pH de efluentes na faixa de 5,1-5,2, e embora a COVe não tenha sido controlada adequadamente devido ao acúmulo de sólidos retidos no leito do reator, nos primeiros 100º dias de operação foi possível obter uma COVe ótima de $6,3\text{-}6,4 \text{ g CH g}^{-1}\text{SSV d}^{-1}$. Em contraste, os RCTM18 e RCTM10 apresentaram operação com controle de pH

médio na faixa igual 4,0-5,5, a qual está próximo da faixa ótima (5,0-5,5) para produção de hidrogênio indicada na literatura para reatores que apresentam material suporte (leito fixo) (FUESS et al., 2016).

Ferraz-Jr et al. (2014b) apresentou a melhor performance de HY médio igual a $1,4 \text{ molH}_2 \text{ mol}^{-1}\text{CH}$ em 4 condições testadas no reator do tipo leito fixo estruturado enquanto Ferraz-Jr et al. (2015a) reportaram o valor de HY médio igual a $1,6 \text{ molH}_2 \text{ mol}^{-1}\text{CH}$. Todos estes valores também foram maiores que os valores encontrados no RCTM18 ($0,0006 \text{ molH}_2 \text{ mol}^{-1}\text{CH} \pm 0,014$) e RCTM10 ($0,0013 \text{ molH}_2 \text{ mol}^{-1}\text{CH} \pm 0,003$), isto pode ser justificado pelo pH de operação dos RCTMs, o qual permaneceu entre a faixa de 4,0-5,5, para ambos os reatores. No entanto, o trabalho de Fuess et al. (2019) associou a boa performance do reator de leito fixo em termos de produção volumétrica e rendimento de hidrogênio à estratégia operacional de controle de pH na faixa ideal de 5,0-5,5 para direcionar a fermentação anaeróbia para a produção de BioH₂-butirato. Ainda os autores afirmam que o controle do pH no processo de fermentação pode ajudar a minimizar os impactos negativos associados a variabilidade composicional da vinhaça da cana-de-açúcar. Desta forma, é válido realizar um estudo sobre o controle de pH nos RCTMs ao longo de um período de safra de cana-de-açúcar para verificar o rendimento de produção desta tecnologia diante da variação de pH.

Observando ainda a Figura 18 A-B, os valores nulos de PVH e HY obtidos no RCTM-18 nos 42º e 46º dias não podem estar associados a valores de pH (5,33 e 5,44), esses valores estão próximos dos valores ótimos da literatura para sistemas acidogênicos.

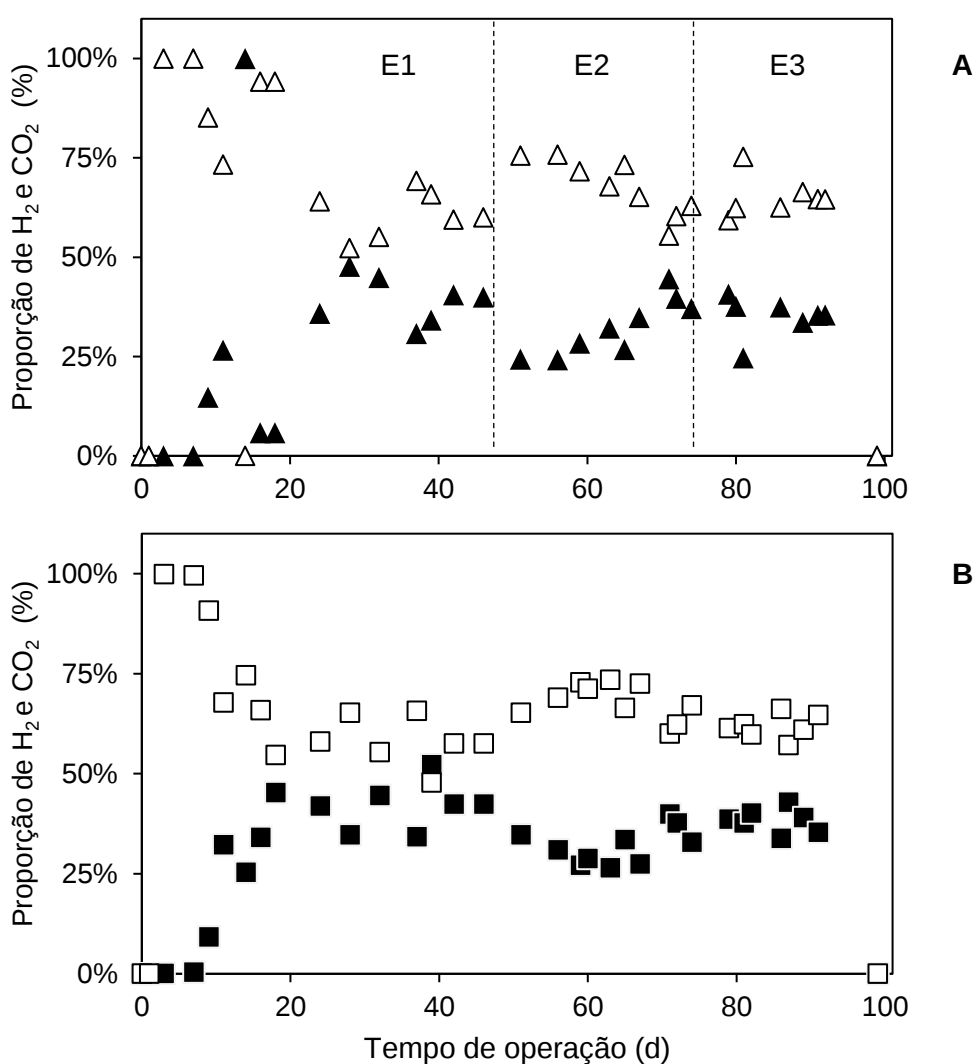
O que é possível inferir é que a produção de gás e do rendimento de hidrogênio é calculada levando-se em consideração o número de pulsos de gás contabilizados no medidor Arduíno, verificando os dados obtidos nestes dias de operação observa-se que o número de pulsos contabilizados no canal do medidor conectado ao reator RCTM18 foi igual a zero, logo conclui-se que ocorreu uma falha na medição que impossibilitou o cálculo de pulsos de gás e consequentemente o cálculo de PVH e HY. Não se pode afirmar que a produção nula de hidrogênio baixa neste dia é exclusivamente ligada a falha no medidor, já que a produção depende de um conjunto de parâmetros monitorados ao longo da operação, por isso, a baixa produção pode estar associada a estrutura do reator, a variação da carga orgânica neste dia e ainda

a produção de metabólitos secundários como ácidos orgânicos. Este comportamento não foi observado para o RCTM10.

Na Figura 19 A-B observa-se a composição de biogás, a qual apresentou valores médios semelhantes de hidrogênio para o RCTM10 (29,3%) e RCTM18 (30,2%), nenhum percentual de metano foi detectado.

Figura 19. Composição de biogás nos reatores acidogênicos: A) composição de biogás no RCTM10 e B) composição de biogás no RCTM18.

Legenda: H₂ (▲) e CO₂ (△), H₂ (■) e CO₂ (□).



Fonte: Autor (2022).

5.2.2. Conversão de substratos e pH

A análise dos dados de pH obtidos nos reatores RCTM10 e RCTM18 (Figura 20 A) mostram que o pH permaneceu entre a faixa de 4,0-5,5, uma faixa de pH próxima da faixa ótima (5,0-5,5) para produção de hidrogênio indicada na literatura para reatores que apresentam material suporte (leito fixo), reportada em Fuess et al. (2016).

A faixa de valores de pH (4,0-5,5) na fermentação da vinhaça de cana-de-açúcar ficou próxima da faixa de valores otimizados de pH (5,0-5,5) reportado por Fuess et al. (2019). É importante controlar o pH na faixa otimizada durante a fermentação, pois isto é uma estratégia que permite manter estabilidade do sistema acidogênico em termos de consumo de DQO, consumo de carboidratos, produção de hidrogênio, em sistema acidogênico submetido a variabilidade composicional de vinhaça (FUESS et al., 2019).

Estudos sobre sistemas acidogênicos reportaram condições ótimas de produção de hidrogênio para valores de pH próximos a 5,2 em reatores contínuos, considerando o uso de diferentes tipos de águas residuárias e resíduos (MIZUNO et al., 2000). Para sistemas acidogênicos utilizando-se vinhaça de cana-de-açúcar como substrato, os valores de pH associados às produções de hidrogênio são reportados em Santos et al. (2014a, b e c) 4,1, 4,5-4,9 e 4,2-4,6, sem ajuste prévio de pH na corrente afluyente. Estes resultados são similares da faixa de pH de operação obtida para ambos RCTMs (4 – 5,5) com ajuste prévio do pH na corrente afluyente aos reatores, porém não ocorreu produção de H_2 no RCTM18 ($0,0006 \text{ molH}_2 \text{ mol}^{-1}\text{CH} \pm 0,014$) e nem no RCTM10 ($0,0013 \text{ molH}_2 \text{ mol}^{-1}\text{CH} \pm 0,003$) como foi observado na Figura 18 B.

Embora a literatura indique que para valores de pH inferiores a 5,0 ocorre perdas na produção de hidrogênio, confirmando a tendência observada neste trabalho. Estas perdas podem estar associadas a efeitos inibitórios causados pela permeabilidade de ácidos não dissociados pela membrana celular (van GINKEL e HALLENBECK, 2009; ANTONOPOULOU et al., 2010).

Em condições ácidas extremas, a energia proveniente dos substratos orgânicos pode ser direcionada para a manutenção das células, ocasionando produções nulas de hidrogênio, como foi observado nos RCTMs. A diminuição do pH no interior das células também afeta negativamente a atividade das hidrogenases, enzimas envolvidas na produção de hidrogênio (DAREIOTI et al., 2014). Estudos em sistemas

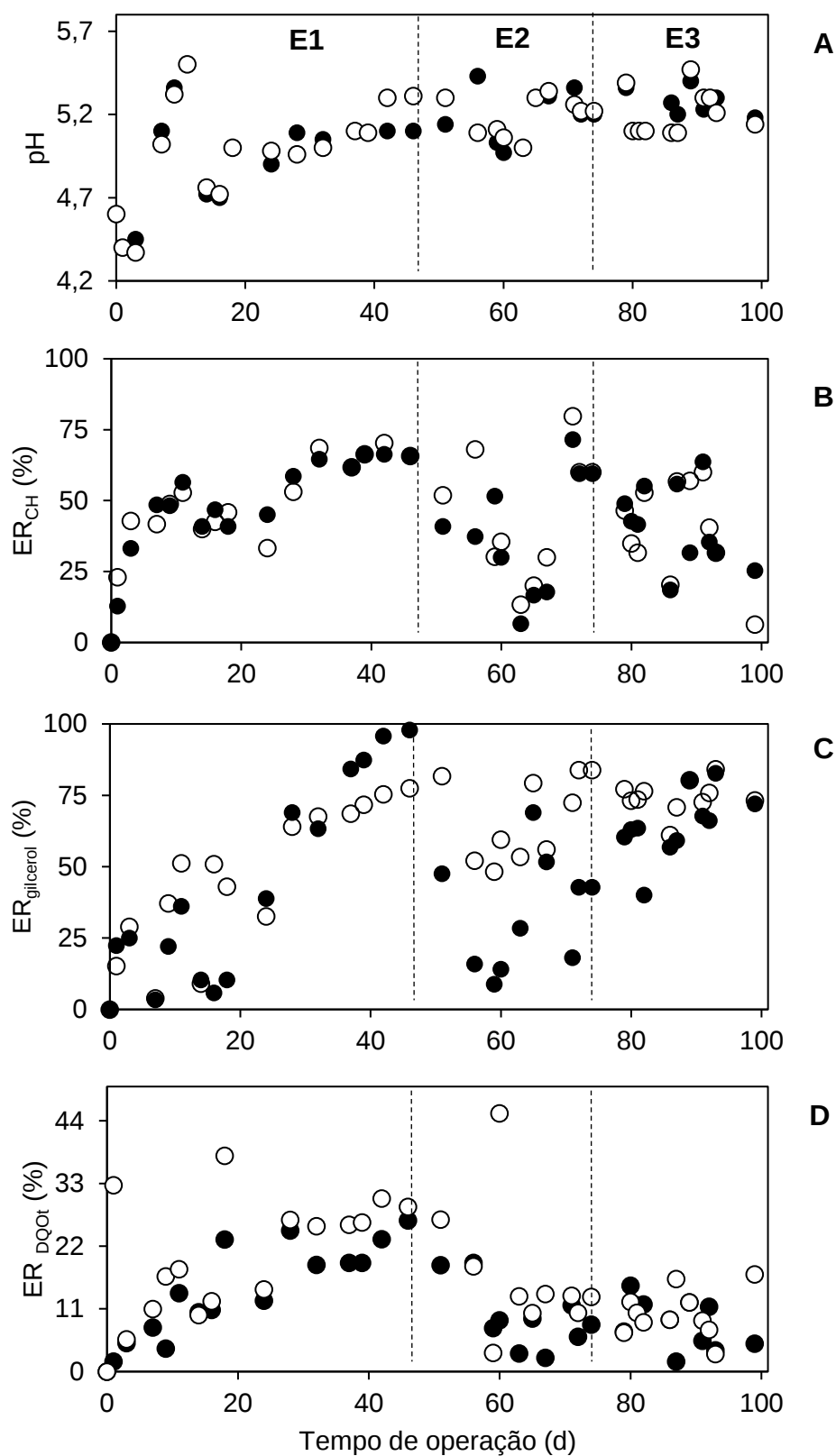
fermentativos direcionados para a produção de hidrogênio normalmente associam elevadas atividades das enzimas hidrogenases em valores de pH próximos a 5,5 (CASTELLÓ et al., 2020), pH máximo obtido nos RCTMs ao longo da operação. O desempenho dos reatores foi analisado a partir da conversão de carboidratos totais, consumo de glicerol, produção de ácido láctico, conversão da demanda química total e produção de fenol.

A conversão de carboidratos da operação com a vinhaça ao longo de 99 dias pode ser vista na Figura 20B. É possível observar que os reatores operados com vinhaça apresentaram períodos de instabilidade na conversão de carboidratos.

Ao comparar a conversão média dos reatores RCTM10 ($45,10 \pm 18,30\%$), e RCTM18 ($44,42 \pm 18,80\%$) com trabalhos precursores do estudo de sistemas acidogênicos de leito fixo e vinhaça de cana de açúcar, observa-se que a conversão média de carboidratos observada nos reatores em estudo foi inferior. Por exemplo, os autores do trabalho de Ferraz Jr. et al. (2015a) reportaram a eficiência média de conversão de carboidratos acima de 60%, considerando o substrato a vinhaça de cana de açúcar, enquanto o trabalho de Fuess et al. (2017) apresentou uma conversão média de $63,6 \pm 9,9\%$ para o estudo de reator de leito fixo ($COVa = 84,2 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, 55°C) operado com vinhaça de cana de açúcar.

Estudar a fermentação da vinhaça de cana-de-açúcar tem sido um desafio há anos. Com base na abordagem de Fuess et al. (2019), este trabalho considerou além do carboidrato total, o glicerol e o ácido láctico como substratos relevantes para a produção de hidrogênio. Estudos na literatura como Fuess et al. (2016) e Ferraz-Jr et al. (2014b, 2015a) são exemplos de trabalhos que consideraram apenas a conversão de carboidrato total para explicar e determinar a produção de hidrogênio e os metabólitos secundários gerados na fermentação, porém isto limita o entendimento acurado das rotas de conversão de substrato.

Figura 20. Monitoramento dos reatores acidogênicos em relação: A) pH, B) consumo do carboidrato total, C) consumo de glicerol e D) DQOt.
 Legenda: RCTM10 (-●-); RCTM18 (-○-)



Fonte: Autor (2022).

Considerando os avanços nos estudos dos processos de fermentação da vinhaça, na Figura 20C é possível observar o perfil temporal da conversão de glicerol ao longo da operação de 99 dias. A conversão do glicerol apresentou valores máximos de 98% no 46° dia para o RCTM10 e 84% no 72° dia para o RCTM18. A presença de glicerol na constituição da vinhaça pode favorecer a manutenção da população microbiana, ainda a elevada carga orgânica biodegradável presente no glicerol pode resultar em rápida conversão e acúmulo de ácidos orgânicos, inibindo a metanogênese.

Os valores de conversão média de cada reator RCTM10 ($48\% \pm 28$) e RCTM18 ($61\% \pm 22$) foram menores que a conversão média de 90% obtida por Fuess et al. (2019). Os autores concluem que esses resultados de conversão de glicerol não podem ser considerados determinantes na produção de hidrogênio, uma vez que ao associar esses resultados de pH, a conversão de glicerol ocorreu em pH menor que 5 e maior que 6, ou seja, em condições favoráveis e condições desfavoráveis de pH para produção de hidrogênio. Ao verificar os resultados de pH (Figura 20A) nos dias máximos de conversão de glicerol observa-se que a conversão de 98% encontrada no reator RCTM10 ocorreu a um pH igual 5, enquanto no RCTM18 foi igual a 5,22, dessa forma, tem-se que a maior conversão de glicerol entre os reatores estudados foi a um pH 5, o que foi verificado em Fuess et al. (2019), no entanto, vale ressaltar que os autores verificaram conversão de glicerol acima de 90% em pH menor que 5 e também acima de 6.

Na operação com a vinhaça, os valores médios remoção de DQOt obtidos foram $11,0\% \pm 6,8$ e $15,0\% \pm 8,0$ para RCTM10 e RCTM18 respectivamente. Em trabalhos reportados na literatura, para uma carga orgânica volumétrica ótima aplicada (COVa) de $84,2 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, em diferentes configurações de reatores com material suporte, a redução média de DQOt obtida encontra-se na faixa de 15 - 25% (FERRAZ-JR. et al., 2014b, 2015a; FUESS et al., 2016, 2017 e 2019). Logo, em termos de redução de DQOt, o RCTM18 apresentou valor dentro da faixa dos valores reportados nestes trabalhos anteriormente citados, uma vez que um dos valores de COVa testados nestes reatores foi igual a $71 \text{ gDQO.L}^{-1}\text{d}^{-1}$, valor próximo da COVa ótima reportada nos trabalhos citados. Entretanto, o RCTM-10 apresentou valor de remoção $11,0\% \pm 6,8$, o qual está dentro da faixa aceitável para sistemas acidogênicos.

Esses resultados mostram que o desempenho do RCTM18 quanto a remoção de DQOt foi maior quando comparado com o desempenho de remoção do RCTM10,

isto pode ser explicado pela diferença de tubos dos reatores, evidenciando que quanto maior a quantidade de tubos, maior a área superficial para aderir biomassa e reduzir a matéria orgânica presente na água residuária.

5.2.3. *Produção e dinâmica da COVe*

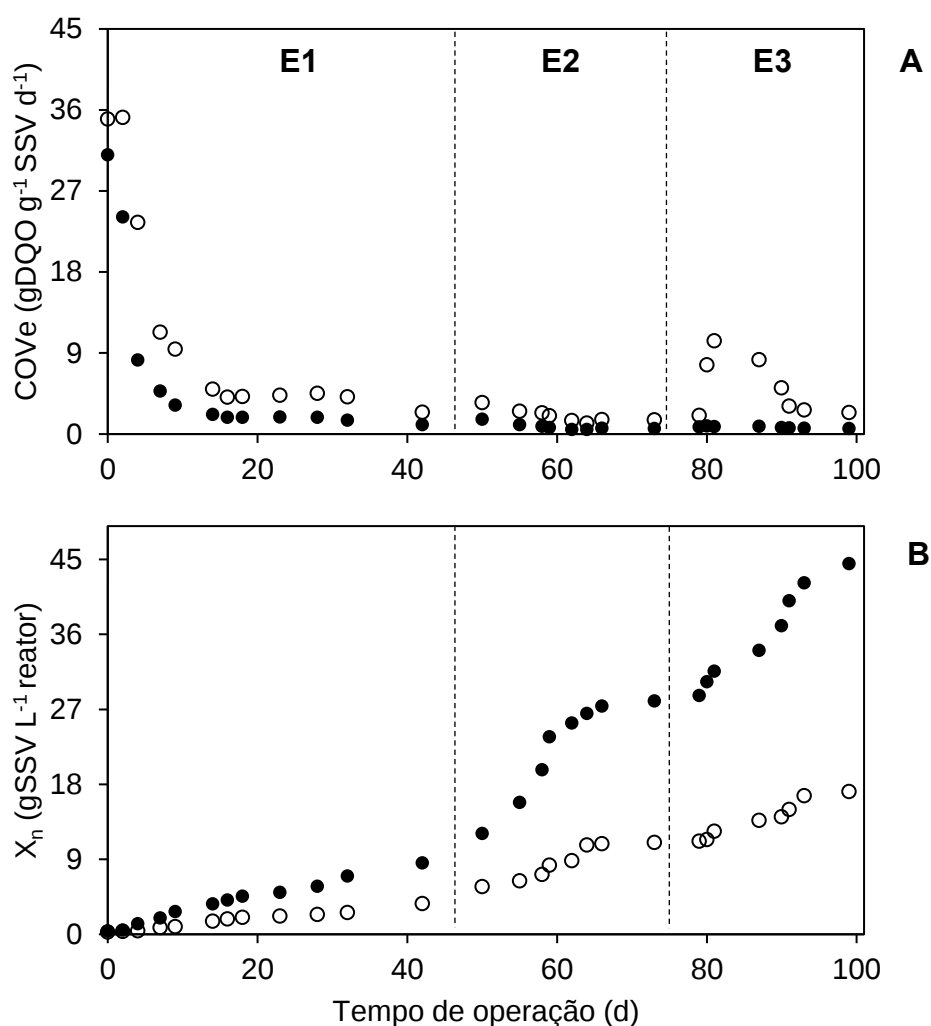
A proposta da configuração RCTM é verificar a retenção de biomassa na produção de hidrogênio em um reator sem material suporte, a partir do crescimento de biomassa aderida em tubos com ranhuras internas em forma de rosca sem fim, o que torna o controle da COVe importante na operação de um RCTM. Para esta discussão deve ser destacado que os trabalhos que apresentam o estudo de COVe em RCTM são, em sua maioria, referentes a sistemas acidogênicos de leito fixo alimentados com vinhaça de cana-de-açúcar. Uma vez que diversos estudos sobre sistemas acidogênicos contínuos com células imobilizadas relataram instabilidades operacionais (FONTE LIMA et al., 2013; ANZOLA-ROJAS et al., 2015; FERRAZ JR. et al., 2015a), afetando a produção de H_2 e resultando em um perfil de produção com picos no período inicial da operação e valor quase zero no decorrer desta. Ainda, entre os diversos fatores operacionais que podem ocasionar essa instabilidade na produção de H_2 em reatores de leito fixo, destaca-se o acúmulo excessivo de biomassa nos reatores (PEIXOTO et al., 2011; ANZOLA-ROJAS et al., 2015, FUESS et al. 2016).

Na Figura 21A, para os reatores RCTM10 e RCTM18 observa-se um perfil de continuidade na retenção de biomassa resultando em valores de COVe médios iguais a $3,24 \text{ gDQO g}^{-1}\text{SSV d}^{-1} \pm 7,06$ e $6,80 \text{ gDQO.g}^{-1}\text{SSV.d}^{-1} \pm 9,09$, respectivamente para cada reator. O valor de COVe médio obtido no RCTM18 é similar ao valor de COVe médio obtido ($6,21 \pm 2,1 \text{ gDQO.g}^{-1}\text{SSV.d}^{-1}$) no estudo de Fuess et al. (2021). Isto mostra que o RCTM18 apresentou uma performance em controle de COVe similar ao do reator de leito fixo estudado pelos autores, porém o RCTM10 não apresentou a mesma performance quando comparado com o RCTM18 e o reator de leito fixo. Em outras palavras, os RCTMs quando comparados entre si evidenciam que a diferença na quantidade de tubos disponíveis para adesão de biomassa (área superficial) afeta positivamente o controle em função da COVe, quanto maior o número de tubos, maior a retenção de biomassa.

Os RCTMs também apresentaram faixas de valores de COVe (RCTM18 - $2,0 - 8,0 \text{ gDQOg}^{-1}\text{SSV d}^{-1}$; RCTM10 - $0,5 - 4,0 \text{ gDQO.g}^{-1}\text{SSV.d}^{-1}$) próximos da faixa ótima

da faixa (2,0-7,0 gDQO g⁻¹SSV d⁻¹) indicada na literatura (ANZOLA-ROJAS et al., 2015; FUESS et al., 2016; FUESS et al., 2019). Entretanto, estes reatores não apresentaram produção de hidrogênio. De fato, os RCTMs apresentaram o controle em função da COVe, mas a hipótese para justificar a faixa otimizada de COVe e o baixo rendimento de H₂ (Figura 18B), é de que a biomassa retida e ativa nos RCTMs estava voltada para a manutenção celular (produção de SPE) e não para a produção de hidrogênio (BRAGA et al., 2016).

Figura 21. Dinâmica da retenção e acúmulo de biomassa nos reatores acidogênicos. Legenda: A) RCTM10 e B) RCTM18.



Fonte: Autor (2022).

Quando analisamos o controle da COVe em relação as condições de varredura testadas, observamos que a faixa ótima encontrada pelos RCTMs apresentou perfil

de estabilidade ao longo do experimento. Em relação ao perfil de acúmulo de biomassa (X_n), este permaneceu crescente em ambos os reatores ao longo da operação. O RCTM10 apresentou acúmulo máximo em torno de 45 g SSV L^{-1} reator enquanto o RCTM18 apresentou acúmulo máximo em torno de 18 g SSV L^{-1} reator. É possível ainda observar na Figura 21 de dinâmica da retenção e acúmulo de biomassa que embora o RCTM10 tenha apresentado maior acúmulo de biomassa ao decorrer do tempo de operação em comparação com o RCTM18, o melhor controle em função da COVe ocorreu no RCTM18.

A faixa de controle em função da COVe encontrado no RCTM18 ($2,0 - 8,0 \text{ gDQOg}^{-1}\text{SSV d}^{-1}$) para sistema alimentado com vinhaça de cana-de-açúcar foi melhor do que a faixa ótima citada na literatura para a configuração de leito fixo, por exemplo, reator de leito fixo empacotado (APBR) apresentado em trabalhos como de Anzola-rojas et al. (2015), Ferraz-Jr et al. (2015) e Fuess et al. (2016). Estes autores discutem que a maior retenção de células em sistemas de leito fixo empacotado apresenta condições desequilibradas de disponibilidade de substrato a longo prazo, e ainda pode resultar na manutenção de valores de COVe abaixo de $3,0 \text{ g CHt g}^{-1}\text{VSS d}^{-1}$ (ou $3,4 \text{ gDQO g}^{-1} \text{VSS d}^{-1}$) após aproximadamente 30 dias de operação em sistemas alimentados com vinhaça, em condições de temperatura termofílicas (55°C), mesma temperatura no estudo dos RCTMs.

Quando comparamos o RCTM18 com o reator de leito fixo, por exemplo, reator de leito estruturado (ASTBR), verificamos que o RCTM18 apresentou também melhor controle em função da COVe em relação a faixa obtida por Anzola-Rojas & Zaiat (2016). Embora este trabalho não tenha sido realizado com vinhaça e sim, com água sintética, foi o primeiro trabalho a estudar o controle em função da COVe em ASTBR evidenciando uma faixa ótima de controle COVe igual a $3,0-7,0 \text{ g de sacarose g}^{-1}\text{VSS d}^{-1}$ independentemente da COVa relativamente baixo ($24,0 \text{ g DQO L}^{-1} \text{d}^{-1}$). Assim, estudos como o Blanco et al. (2017) também destacou o potencial do ASTBR de manter valores ótimos de COVe na faixa igual a $4.0-6.0 \text{ g COD g}^{-1}\text{VSS d}^{-1}$, para longos períodos de operação (superiores a 40 dias) quando comparado com o APBR. Entretanto, o RCTM18 superou os resultados tanto para o ASTBR quanto para o APBR e obteve a faixa ótima ($2,0 - 8,0 \text{ gDQOg}^{-1}\text{SSV d}^{-1}$) para o período longo de operação acima de 70 dias, ainda que não tenha apresentado produção de hidrogênio. Isto confirma a hipótese de que o RCTM tem potencial de controle em função da COVe pois sua região de tubos trabalha como material suporte para adesão de biomassa.

Além disso, os resultados de controle em função da COVe encontrados para o RCTM18 mostram que esta configuração não precisa de intervenção operacional como descarte de biomassa para renovar a biomassa dentro do reator ou ainda evitar entupimento, o que é característica típica de reatores de leito fixo. Uma vez que, embora um controle efetivo da COVe não tenha sido relatado adequadamente, é comum o acúmulo contínuo de biomassa nos reatores de leito fixo sob operação a longo prazo (FUESS et al., 2019), direcionando às ações paliativas como descargas periódicas de biomassa, para tornar os sistemas de leito fixo mais eficazes no controle da COVe e consequentemente na retenção de biomassa (ANZOLA-ROJAS & ZAIAT, 2016).

De uma forma geral, é válido citar que os RCTMs apresentaram boa performance no controle em função da COVe, destacando o RCTM18. Desta forma, esta configuração pode ser validada como um sistema otimizado para o controle em função da COVe para operação contínua com vinhaça de cana-de-açúcar.

Os resultados deste estudo são relevantes dentro do cenário de acúmulo de biomassa, uma vez que este pode impactar significativamente a razão alimento/microorganismo aplicada no reator. Concentrações excessivas de sólidos podem propiciar condições de escassez de substrato no meio, estimulando o consumo de H_2 por populações homoacetogênicas (FONTES LIMA et al., 2013; ANZOLA-ROJAS et al., 2015; FERRAZ JR. et al., 2015a; ANZOLA-ROJAS e ZAIAT, 2016). Ainda, limitações decorrentes do acúmulo de sólidos podem ocasionar, por exemplo, o estabelecimento de elevadas pressões parciais de H_2 no leito empacotado, ou ainda podem levar às alterações nas rotas metabólicas como a produção de compostos intermediários mais reduzidos, tais como os ácidos propiônico e butírico (HALLENBECK, 2009; BRAGA et al., 2016).

O estudo de Fuess et al. (2019) ratifica a relevância deste estudo sobre a importância de investigar configurações adequadas de biorreatores e estudar a quantidade de biomassa dentro dos reatores conectado aos caminhos metabólicos associados à conversão dos substratos orgânicos encontrados na vinhaça de cana-de-açúcar. Os autores afirmam que os sistemas acidogênicos de leito fixo são as melhores opções para alcançar atividades hidrogênicas elevadas devido à sua eficiente capacidade de retenção celular (FERNANDES et al., 2013). Por outro lado, outros estudos indicam efeitos negativos do acúmulo excessivo de biomassa em sistemas acidogênicos já que a relação desequilibrada alimento/microorganismo (F/M) permite que du-

rante a operação se estabeleçam vias não produtoras ou consumidoras de H_2 consumidoras (ANZOLA-ROJAS et al., 2015). Assim, sistemas acidogênicos adequados devem simultaneamente fornecer superfície para fixação da biomassa como é identificado nos RCTMs por meio da região de tubos. Tal região apresentou capacidade de reter biomassa de forma equilibrada dentro dos sistemas estudados.

Desta forma, a configuração RCTM pode ser estabelecida como uma alternativa de reator com características otimizadas de controle em função da COVe em uma operação com uma vinhaça bruta com elevado teor de sólidos como a vinhaça de cana-de-açúcar. Os resultados apresentados na Figura 21 e na Tabela 15 validam esta configuração como um sistema potencial e alternativo no controle em função da COVe quando comparado aos sistemas de leito fixo como ASTBR e APBR (FUESS et al., 2016; FUESS et al, 2021; ANZOLA-ROJAS e ZAIAT, 2016).

O resumo da performance dos RCTMs no controle da COVe e dinâmica de biomassa ao longo da operação é apresentado na Tabela 13. Nesta tabela destaca-se os resultados de biomassa lavada iguais a 95,7% e 96,47% e valores de coeficiente de rendimento celular iguais a 0,933 e 0,746, respectivamente para RCTM10 e RCTM18.

Tabela 15. Balanço de biomassa dos reatores.

Parâmetros	Ensaio	
	RCTM10	RCTM18
	71 g DQO L ⁻¹ d ⁻¹	71 g DQO L ⁻¹ d ⁻¹
Biomassa inicial X_0 (g)	83,69	64,84
Biomassa aderida X_a (g)	24,3	11,70
Biomassa suspensa X_s (g)	27,4	29,7
Biomassa lavada X_e (g)	1154,0	1147,15
Biomassa nos descartes de fundo X_d (g)	0	0
Biomassa total produzida no reator X_t (g)	1205,68	1189,07
Consumo de DQO (g)	1292,66	1593,0
Coeficiente de rendimento celular $Y_{X/S}$ (g SSV g ⁻¹ sac)	0,933	0,746
Biomassa lavada (%)	95,7%	96,47%
Biomassa inicial (%)	6,94%	5,45%
COVe (g Sac g ⁻¹ SSV d ⁻¹)	3,24 ± 7,06 (34)	6,80 ± 9,09 (34)
Tempo de operação (d)	99	99

Fonte: Autor (2022).

5.2.4. Produção de metabólitos secundários

A Figura 22 A-B apresenta os metabólitos produzidos no RCTM10 e a Figura 23 A-B apresenta os metabólitos produzidos no RCTM18 ao longo da operação com vinhaça.

Ambos os RCTMs em estudo apresentaram perfil semelhante na produção de metabólitos secundários como ácidos orgânicos, sendo eles: ácido láctico, ácido acético, ácido propiônico, ácido butírico e solvente como o etanol.

Destaca-se que as maiores porcentagens de produção verificada nas Figuras 22 e 23 de distribuição de metabólitos nos RCTMs são para ácido láctico (RCTM18 – 57,9%; RCTM10 – 65,9%) e ácido butírico (RCTM18 -31,4%; RCTM10-19,7%) com

as seguintes concentrações médias ao longo da operação para o ácido láctico iguais a $2,1 \text{ g L}^{-1} \pm 20$ (RCTM18) e $3,3 \pm 17 \text{ g L}^{-1}$ (RCTM10), e para ácido butírico iguais a $31,4 \text{ g L}^{-1} \pm 17$ (RCTM18) e $19,7 \text{ g L}^{-1} \pm 18,1$ (RCTM10). Estes resultados direcionam a discussão de baixa produção de H_2 nos RCTMs estudados para a hipótese de que a microbiota dentro dos RCTMs controlou a COVe e poderia estar ativa para manutenção celular e ainda para a produção de metabólitos secundários.

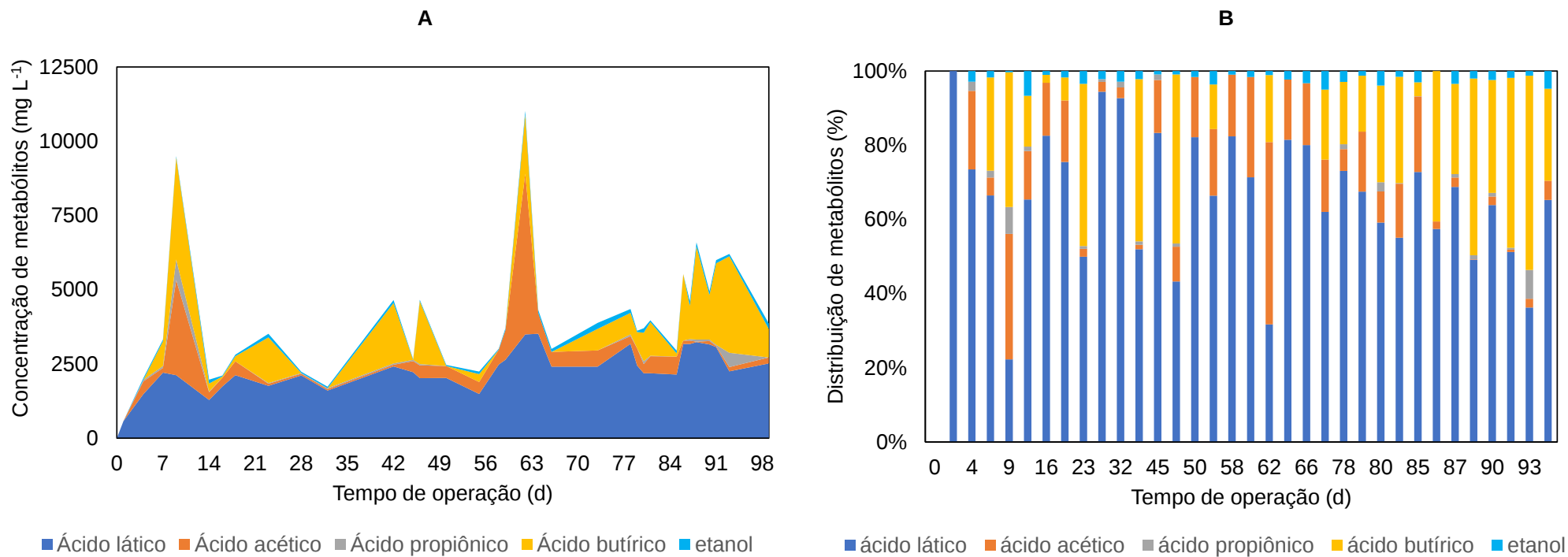
Trabalhos afirmam que a produção de ácido acético a partir de populações homoacetogênicas, no meio reacional, utilizam do biogás em termos de CO_2 como fonte de carbono e H_2 como doador de elétrons, para promover o crescimento celular via Rota Wood-Lyungdahl (ANZOLA-ROJAS et al., 2015). Enquanto a produção de etanol pode prejudicar a produção de H_2 , pois pH na faixa igual a 4-5 é considerado faixa de pH favorável para fermentação etanólica (TREVISAN, 2020). Ainda, a produção de ácido butírico e ácido propiônico podem acontecer em condições de elevados valores de COVa ou sobrecarga ($84 \text{ g DQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), prejudicando a produção de H_2 , isto valida os baixos rendimentos de H_2 nos RCTMs, ao longo da varredura em que ocorreu o aumento da COVa até atingir $71 \text{ g DQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (SANTOS et al., 2014), mesmo com valores de COVe dentro da faixa ótima. Fernandes et al. (2013) afirma que a produção de ácido butírico e etanol, metabólitos produzidos nos RCTMs, afetam a produção de H_2 porque estes metabólitos podem reter H_2 em suas moléculas mais reduzidas. No caso da produção de ácido propiônico, também observada nos RCTMs, leva ao consumo do hidrogênio disponível no meio reacional (MOSEY, 1974) ocasionando quedas na produção de hidrogênio, em que 2 mols de ácido propiônico consome 1 mol de H_2 .

Palomo-Briones et al. (2017), o qual afirma que na acidogênese em TDH altos (18 - 24h) ocorre o estabelecimento da comunidade microbiana *Sporolactobacillaceae*- *Streptococcaceae* ao invés de bactérias produtoras de hidrogênio, isto leva a produção de lactato no meio solúvel, já em TDHs baixos (6 - 12 h) ocorre a predominância de microbiota composta por *Clostridiaceae*-*Lachnospiraceae*-*Enterobacteriaceae*, esta comunidade pode direcionar as rotas metabólicas da fermentação para produção de hidrogênio, etanol e acetato. O principal ácido acumulado durante a operação dos sistemas acidogênicos RCTMs foi ácido láctico o qual ocorreu a pH 5. Outros estudos como o de Fuess et al. (2019) apresentaram que o ácido láctico não é consumido a pH menor que 5, o que poderia

explicar a produção de ácido láctico entre 80°-90° dias, em que os reatores apresentaram valores de pH menores que 5.

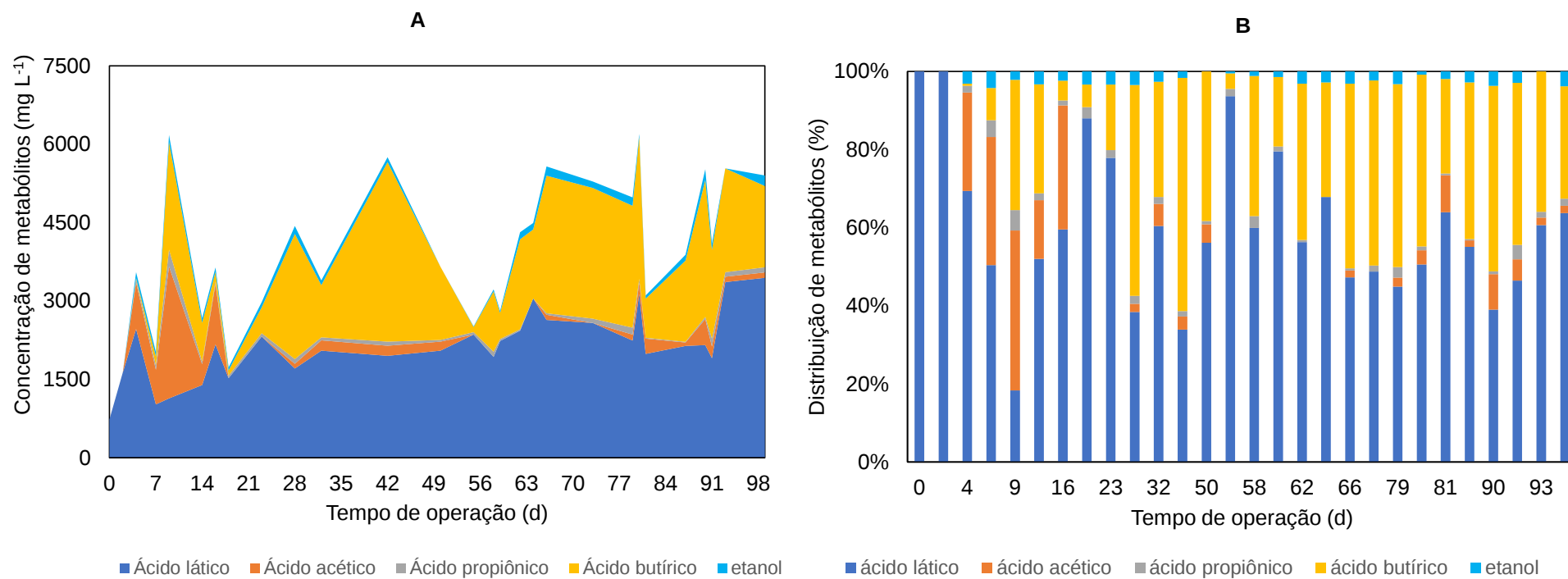
O estudo de Cassman et al. (2018) aborda o questionamento da vinhaça ser uma fonte de bactérias produtoras de ácido láctico, e observando os dados da caracterização da vinhaça utilizada neste trabalho, observa-se que no período de maior produção de ácido láctico, os reatores foram alimentados com a vinhaça que apresentou maior concentração de ácido láctico ($2 - 2,7 \text{ g L}^{-1}$) quando comparada a vinhaça usada no início da operação ($0,7 \text{ g L}^{-1}$) a qual já é coletada com concentração de ácido láctico o que é alimentado nos sistemas acidogênicos e pode resultar no aumento deste metabólito no sistema durante as condições altas de TDH testados.

Figura 22. Metabólitos solúveis quantificados no RCTM10 ao longo da operação da fase acidogênica: A) perfil temporal de concentração de metabólitos e B) proporção de metabólitos.



Fonte: Autor (2022).

Figura 23. Metabólitos solúveis quantificados no RCTM18 ao longo da operação da fase acidogênica: A) perfil temporal de concentração de metabólitos e B) proporção de metabólitos.



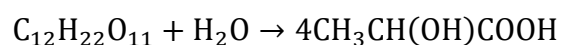
Fonte: Autor (2022).

Ainda, a produção de ácido láctico em ambos os RCTMs em estudo pode ser justificada pelo pH de operação em torno de 4,5 ao longo da operação nos reatores. Antonopoulou et al. (2010) reportaram decréscimos na produção de hidrogênio a partir de extrato de sorgo sacarino em reatores de mistura completa para valores de pH inferiores 4,6. Nestas condições, os autores identificaram etanol e ácido láctico como os principais metabólitos da fermentação.

É importante citar que a produção de ácido láctico pode afetar a produção de H_2 , uma vez que a redução da produção de H_2 pode ocorrer devido a competição por substrato e inibição pela excreção de bacteriocinas (GOMES et al., 2015; MIZUNO et al., 2000), o que poderia explicar a baixa produção de H_2 em contraste com a significativa produção de ácido láctico nos RCMTs.

De acordo com Trevisan (2020), os valores de pKa dos ácidos acético, butírico e láctico equivalem a 4,75, 4,8 e 3,86, respectivamente. Considerando que a operação dos RCTMs ocorreu na faixa de pH igual a 4,3 – 5,5, pode inferir que esses ácidos se apresentaram na forma não dissociada no meio reacional, pois os valores de pH são semelhantes aos valores de pKa dos referidos ácidos. Ainda, de acordo com Castelló et al. (2020), na forma não dissociada, os ácidos acético, butírico e láctico são considerados lipofílicos, e podem atravessar a membrana celular microbiana. No citoplasma, esses ácidos podem se dissociar e liberar prótons que acidificam o meio. Assim, a necessidade de energia é aumentada para manter o pH interno, resultando em um efeito contrário no metabolismo e crescimento microbiano. Desta forma, os resultados mostram que os ácidos butírico e láctico são os principais ácidos da fermentação da vinhaça de cana-de-açúcar neste estudo, o acúmulo significativo desses ácidos pode ter inibido a atividade metabólica da biomassa dentro do reator ao longo da operação.

Os valores baixos de PVH e HY, observados nos RCTMs (Figura 18), associados às porcentagens de ácido (Figuras 17 B-C), validam a hipótese de que a produção de H_2 foi afetada devido à formação ácido láctico. De acordo com Trevisan (2020), podem ocorrer a competição entre as bactérias produtoras de ácido láctico e as produtoras de H_2 , pelo substrato (Equação 32).



Eq.(32)

Ácido láctico

A literatura também indica que a produção de etanol em sistemas fermentativos tem sido associada com a preferência dos microrganismos produtores de H_2 para produzir solventes em condições de baixos valores de pH, corroborando o perfil de pH ao longo da operação deste estudo (4,3 – 5,5). Ainda, Ren et al. (2007) informam que a faixa de fermentação do etanol está entre 4,0-5,0, faixa similar a obtida nos RCTMs (Figuras 22 e 23).

Alguns estudos apresentam que a produção de H_2 , ácido butírico, ácido láctico e ácido acético, ácidos produzidos nos RCTMs (Figuras 22 e 23) podem estar associados a várias espécies de *Clostridium*, tais como *C. acetobutylicum*, *C. diolis* JPCC H3 e *C. butyricum*. Estudos sobre a fermentação escura da vinhaça de cana de açúcar relatam frequentemente a presença do gênero *Clostridium* em sistemas acidogênicos (FERRAZ- JÚNIOR et al., 2015a, FERRAZ- JÚNIOR et al., 2015b, FUESS et al., 2018a, SANTOS et al., 2014), sem consideração da temperatura. Apesar da alta heterogeneidade e da diversidade metabólica intrínseca deste grupo microbiano (FERRAZ- JÚNIOR et al., 2015a), o gênero *Clostridium* tem sido particularmente associado à produção de ácido butírico e ao gênero *Lactobacillus*, como foi discutido pelos autores do Fuess et al. (2018a), os quais sugerem que o *Lactobacillus* apresenta um papel determinante na fermentação do lactato em reatores alimentados com vinhaça.

De acordo com Niz et al. (2019), é importante citar que em condições de temperatura elevada (55 °C), a rota principal da vinhaça de cana-de-açúcar na FE para a produção de H_2 pode ser via láctico/acético. Os autores mencionam que a via acetato/lactato ($\Delta G^\circ = -156,6 \text{ kJ mol}^{-1}$) é energeticamente menos favorável do que as vias clássicas, como a via acética ($\Delta G^\circ = -206,0 \text{ kJ mol}^{-1}$) e a via butírica ($\Delta G^\circ = -255,0 \text{ kJ mol}^{-1}$). A ocorrência desta via, ao invés da via usual de conversão do CH (via acética e butírica), deve estar relacionada à associação sintrófica entre bactérias lácticas e bactérias produtoras de H_2 , pois a utilização do ácido láctico como substrato no meio reacional impede seu acúmulo no caldo de fermentação e, portanto, ocorre a queda do pH o qual prejudica a produção de H_2 pela via láctica/acética.

5.3. Desempenho dos reatores em batelada

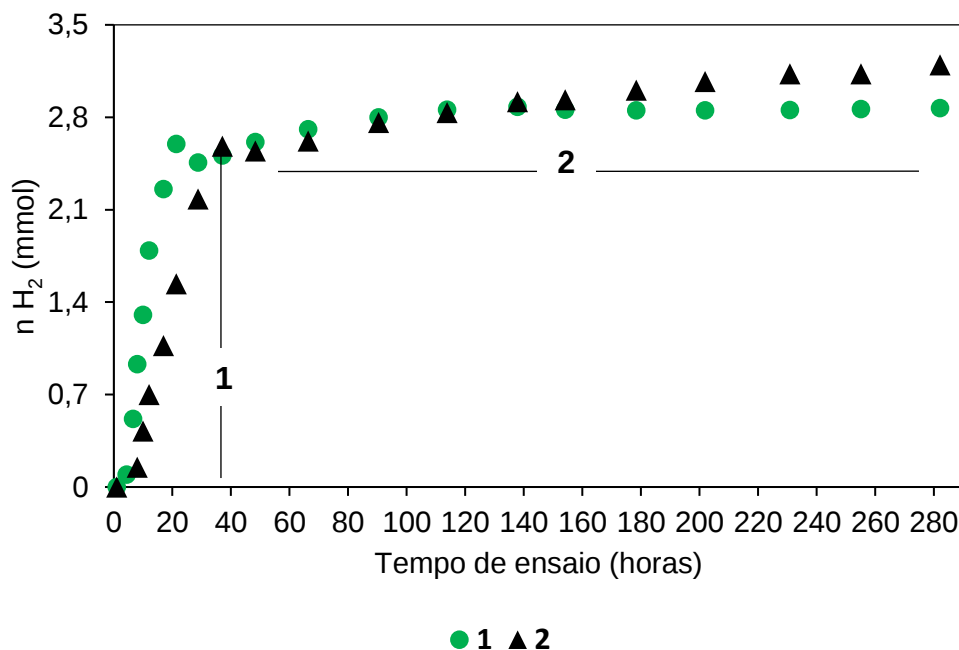
Após a operação contínua dos RCTMs, as biomassas geradas ao longo dos 99 dias de operação foram testadas em reatores termofílicos (55°C) em batelada. Este

teste das biomassas acidificadas foi realizado para verificar a produção em número de mols de H_2 e, principalmente, para retirar amostras de DNA do RCTM10 e RCTM18 para verificar a estrutura e dinâmica microbiana ao longo do experimento em batelada.

Desta forma, a Figura 24 apresenta as fases de operação de um sistema em batelada para verificar a produção de H_2 das biomassas acidificadas: 1- fase exponencial (produção de gás) e 2- fase de estabilidade (regime permanente em que a produção de gás se tornou estável).

É possível verificar que as biomassas acidificadas apresentaram potencial para produção de gás ($CO_2 + H_2$), em que obteve proporção máxima de produção de H_2 iguais a 50,84% com 8 h de ensaio para o RCTM10 e 48,80% com 21 h de ensaio para o RCTM18. Em relação a conversão de carboidratos analisados na fase líquida, observou-se as conversões médias acima de 55% tanto para o RCTM10 quanto para o RCTM18.

Figura 24. Perfil de produção de H_2 em mols ao longo da operação em batelada. Legenda: 1) RCTM10 e 2) RCTM18



Fonte: Autor (2022).

5.4. Estrutura e dinâmica microbiana nos reatores acidogênicos

A caracterização da estrutura microbiana nos reatores acidogênicos é apresentada em termos da abundância relativa no nível de filo (Figura 25 A-B) e gênero (Figura

26 A-B) para amostras de DNA retiradas dos RCTMs no início da operação contínua com vinhaça de cana-de-açúcar e no final da operação em batelada com as biomassa acidificadas obtidas dos RCTMs.

Na Figura 25 A-B são compilados os filos mais representativos, caracterizados por apresentar abundância relativa > 1% nas amostras retiradas no início da operação e no final da operação em batelada. Esta caracterização filogenética completa das amostras, considerando os principais grupos de microrganismos identificados no início da operação apresenta que o filo com maior abundância relativa (> 80%) para ambos os RCTM10 e RCTM18 foi o Firmicutes. Na amostra no final da batelada para os RCTMs, o filo o com maior abundância relativa também foi o Firmicutes (> 65%).

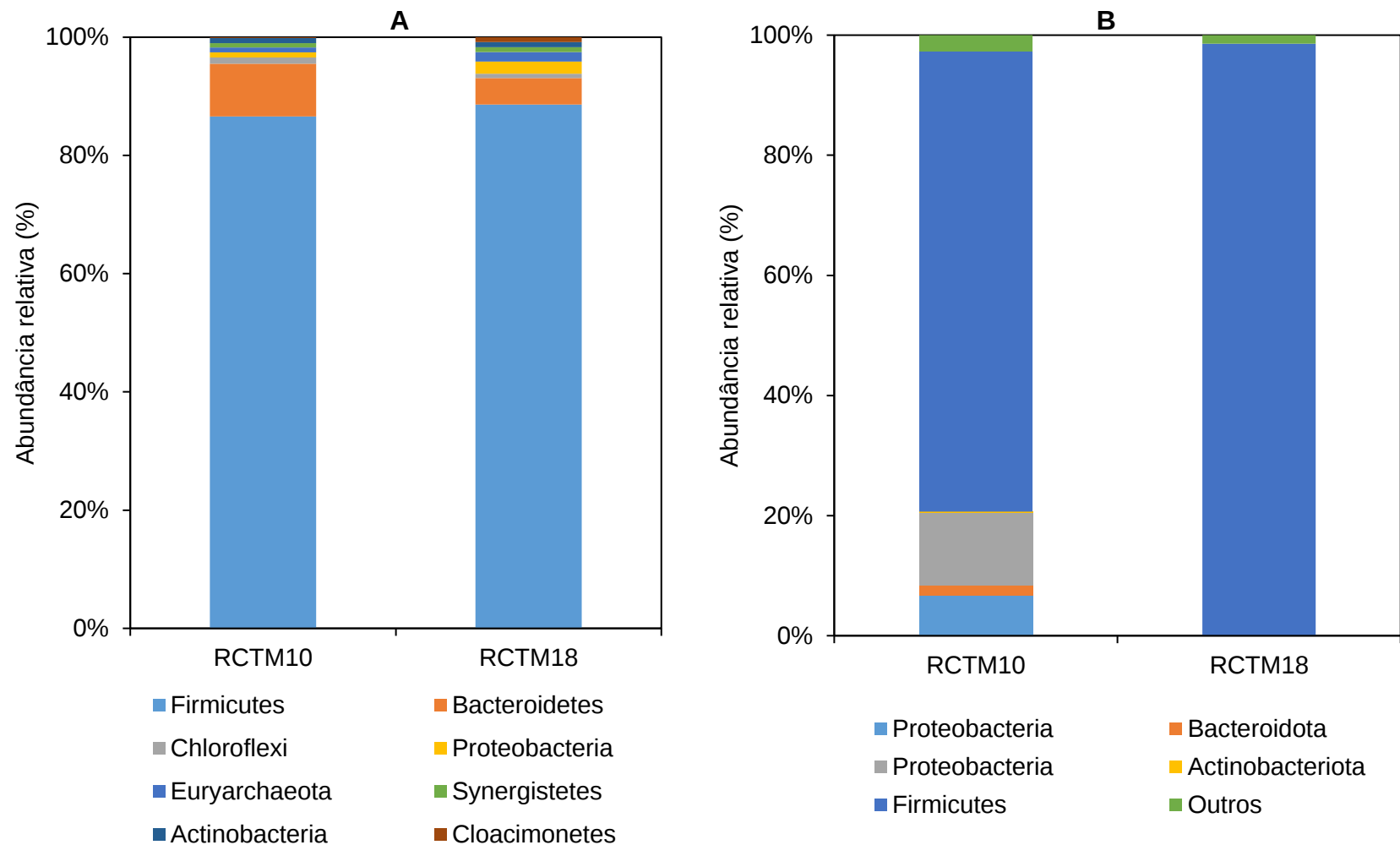
A Figura 26 A-B apresenta os gêneros mais representativos, caracterizados por apresentar abundância relativa > 0,5% nas amostras retiradas dos RCTMs tanto para o início da operação contínua como para o final da operação em batelada.

Para as amostras retiradas dos RCTMs no início da operação, aproximadamente 20-45% dos gêneros identificados corresponde ao gênero

De acordo com Niz et al. (2019) e Sánchez et al. (2021) a operação contínua de reatores anaeróbios termofílicos apresenta uma grande variedade de microrganismos envolvidos na metabolização de substratos, incluindo gêneros como *Bacillus*, *Thermopidimicrobium*, *Lysinibacillus* e *Thermoanaerobacterium*, e ainda, microrganismos da família *Clostridiaceae* (gêneros *Clostridium sensu stricto* 1, 7 e 12).

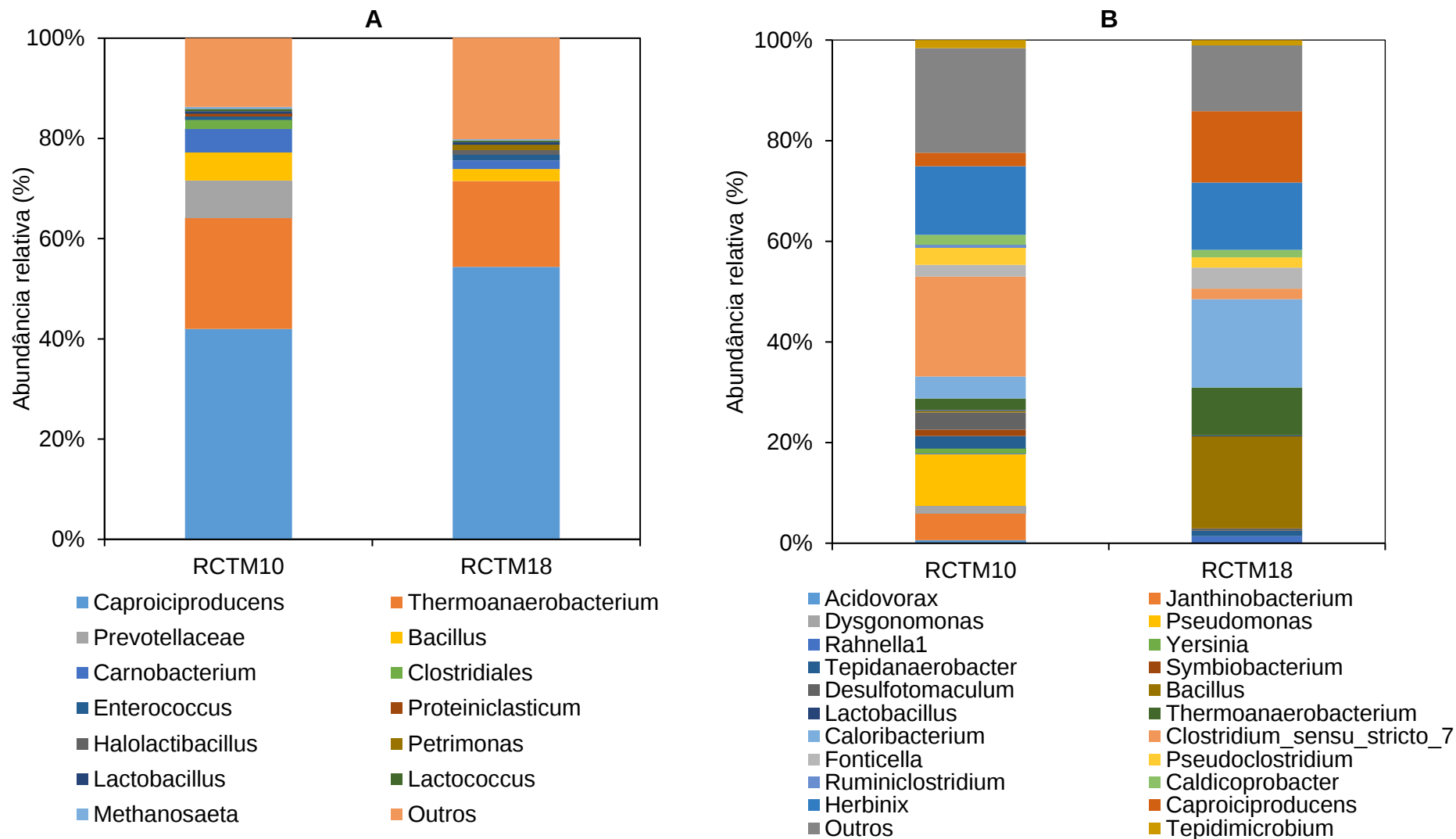
Desta forma, é possível verificar que na Figura 26 A identificam-se gêneros como *Bacillus* (5,10% - RCTM10, 2,37% - RCTM18), *Thermoanaerobacterium* (22,26% - RCTM10, 12,14% - RCTM18), microrganismos comumente encontrados em sistemas acidogênicos termofílicos com potencial para produzir hidrogênio (NIZ et al., 2019). Ainda é possível identificar microrganismos do gênero *Caproiciproducens* com abundância relativa igual a 41,96% para o RCTM10 e 54,36% para o RCTM18.

Figura 25. Representação filogenética da comunidade microbiana nas amostras obtidas durante: A) início da operação contínua dos RCTMs e B) final da operação em batelada, baseando-se no 16S RNAr (região V4).



Fonte: Autor (2022).

Figura 26. Composição microbiana no nível gênero das amostras obtidas durante: A) início da operação contínua dos RCTMs e B) final da operação em batelada, baseando-se no 16S RNAr (região V4).



Fonte: Autor (2022).

Na Figura 26 B, é possível observar a abundância de gênero para as amostras coletadas no final da operação em batelada. Os RCTM10 e RCTM18 apresentaram diversidade de microrganismos o que poderia sugerir diversidade e alterações metabólicas das comunidades estabelecidas ao longo do experimento, e também alterações na estrutura das comunidades microbianas. Ainda na Figura 26 B, o gênero *Clostridium sensu stricto* 7 apresenta-se com abundância igual a 19,87% no RCTM10 e 2,10% no RCTM18, tal microrganismos é conhecido com maior potencial para produção de hidrogênio, embora indivíduos deste gênero sejam caracterizados por uma ampla diversidade metabólica, levando a um grupo amplamente heterogêneo (FERRAZ JR. et al., 2015a). Ferraz Jr. et al. (2015a) reportaram valores de abundância relativa inferiores a 10% para o gênero *Clostridium* em um APBR operado em condições equivalentes de temperatura (55°C). Por outro lado, Ferraz Jr. et al. (2015b) reportaram uma abundância relativa para tal gênero (12,8%) valores diferentes dos observados neste considerando resultado obtido no RCTM10 (19,87%) e RCTM18 (2,10%).

De qualquer forma, os resultados sugerem que a produção de H₂ nos RCTMs ao longo da batelada pode estar associada a espécies deste gênero, bem como a outros grupos associados à produção de H₂ determinados na análise de microbiota e com abundância relativa igual a 2,29% (RCTM10) e 9,50% (RCTM18) para *Thermoanaerobacterium* (Figura 26 B), este último resultado é maior que o resultado obtido no estudo de Ferraz Jr. et al. (2015a) em que os autores identificaram valores de abundância relativa (7,2-8,1%) para o gênero *Thermoanaerobacterium* (APBR, 55°C, 84,2 kgDQO m⁻³ d⁻¹).

As bactérias produtoras de ácido láctico, como as bactérias do gênero *Lactobacillus* apresentaram abundância relativa menor que 2% em ambos os RCTMs. Diversos estudos abordam a interferência destas bactérias em sistemas fermentativos ao longo da produção de H₂, como a competição por substratos comuns e inibição pela excreção de bacteriocinas (GOMES et al., 2016), e ainda o papel do ácido láctico como precursor na formação de H₂. Os valores baixos obtidos nos RCTMs (2%) são semelhantes ao valor obtido no estudo de Ferraz Jr. et al. (2015a), em que os autores reportaram valores decrescentes para a abundância relativa de *Lactobacillus* (46,7 para 7,0%) ao longo da operação de reator acidogênico.

Por fim, gêneros apresentaram valores de abundância relativa superiores a 10%: *Pseudomonas* (10,26%) e *Herbinix* (13,64%) para RCTM10, e *Bacillus* (18,32%)

Caloribacterium (17,55%), *Herbinix* (13,35%) e *Caproiciproducens* (14,18%) para o RCTM18.

Os resultados de análise de biologia molecular não permitem a definição de rotas metabólicas, uma vez que a análise realizada para obter os resultados apresentados em termos de abundância relativa refere-se ao DNA extraído de biomassas coletadas ao longo da operação. Para definir rotas metabólicas, é necessária uma análise molecular mais específica a qual analisa a biomassa ativa dentro do reator.

De uma forma geral, é possível encontrar na literatura vários estudos que indicam possíveis rotas metabólicas durante a produção de H₂ em processo fermentativo.

5.5. Balanço de massa: fração solúvel e global

A partir dos dados obtidos ao longo da operação dos RCTMs, determinou-se o balanço de massa da fase acidogênica, em termos de DQO, buscando-se validar as metodologias analíticas utilizadas. Com base no procedimento de cálculo de Fuess (2016), foi possível determinar dois balanços distintos, sendo um referente à distribuição de compostos solúveis na corrente efluente aos RCTMs (balanço de massa da fase solúvel – BMFS) e o outro referente ao balanço de massa global (BMG), considerando, além dos compostos solúveis, a produção de hidrogênio e sólidos ao longo da operação. Nas Figuras 27 e 28 são apresentados o BMFS e o BMG referentes à operação do RCTM18 e RCTM10, respectivamente, enquanto nas Tabelas 16 e 17 apresentam-se as contribuições de cada grupo de compostos analisados sobre os balanços de massa.

Considerando inicialmente o BMFS, o valor médio obtido para o efluente (vinhaça acidificada) no RCTM10 foi igual a $92 \pm 0,28$ e no RCTM18 foi igual a $78,42 \pm 150$ B. MFS obtidos para os efluentes dos RCTMs neste trabalho atingiram patamar maior do que os valores aos apresentados por Ferraz Jr et al. (2014b) – 42,6-53,2%, Ferraz Jr. et al. (2015a) – 48,5%, e Ferraz Jr. et al. (2015b) – 37,3- 40,9%, para reatores de leito fixo empacotado aplicados na fermentação da vinhaça de cana-de-açúcar operados sob condições acidogênicas.

Considera-se que, a fração não medida analiticamente, como outros compostos orgânicos presentes nos substratos os quais não foram quantificados. Dentre os

compostos presentes na vinhaça destaca-se alguns compostos fenólicos e as melanoidinas, responsáveis por conferir cor ao substrato, além dos carboidratos e glicerol. As melanoidinas são macromoléculas formadas por meio da reação de Maillard, ou reação do tipo carbonila-amina, entre aminoácidos e açúcares sob condições de elevada temperatura. Essas moléculas comportam-se como matéria orgânica natural, ou seja, substâncias húmicas, em solução aquosa, e apresentam características recalcitrantes, explicando a coloração da corrente efluente e, parcialmente, a elevada fração indeterminada no BMFS (TAKEDA, 2021).

Vale ressaltar que o BMFS foi calculado considerando os metabólitos quantificados por cromatografia gasosa, segundo metodologia descrita por Adorno et al. (2014), podendo essa, portanto, ter sido subestimada por erros operacionais. Portanto, tendo em vista as elevadas concentrações dos compostos observados na vinhaça, as limitações no cálculo do BMFS podem ser justificadas pela não determinação destes compostos. Em termos de balanço de massa global, o valor médio calculado para a relação entre a DQOt estimada e a medida para RCTM10 ($75,62 \pm 14,52$) e RCTM18 ($73,47 \pm 11,7$) são semelhantes aos valores estudados por Ferraz Jr. et al. (2014b) com 66,4-78,9%, Ferraz Jr. et al. (2015a) com 67%, e Ferraz Jr. et al. (2015b) com 76,9-91,4%. Neste cálculo, foram utilizados os valores da DQOs efluente medida para compor a fração referente aos compostos orgânicos dissolvidos, devido os métodos analíticos utilizados não possibilitarem uma estimativa satisfatória da fração solúvel da vinhaça.

Tabela 16. Balanço de massa da fase solúvel e balanço de massa global calculados para a fase acidogênica do RCTM18.

Balanço de massa	Proporção na DQO medida (%)						
	Substratos	Metabólitos	DQOs Efluente	H ₂	SSV	Fração medida	Fração não medida
BMFS	44,42±18,80	35,32±14,8	-	-	-	78,42±1,5	21,58±0,26
BMG	-	-	72,2±11,88	0,15±0,34	0,02±0,01	73,47±11,7	27,6±12,1

Notas: Metabólitos = Etanol, ácido acético, ácido propiônico e ácido butírico, ácido láctico; Substratos + metabólitos para BMFS, DQOs efluente + hidrogênio + SSV para BMG; BMFS em relação à DQOs efluente (vinhaça acidificada). Siglas: BMFS = balanço de massa na fase solúvel; BMG = balanço de massa global.

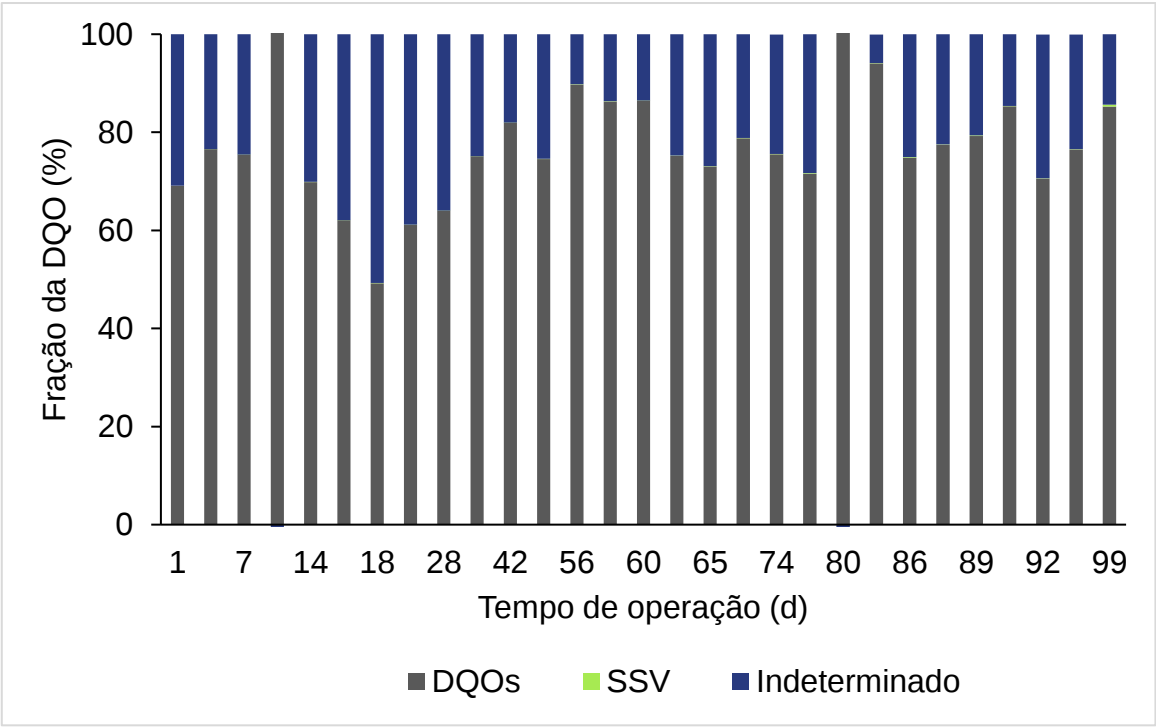
Tabela 17. Balanço de massa da fase solúvel e balanço de massa global calculados para a fase acidogênica do RCTM10.

Balanço de massa	Proporção na DQO medida (%)						
	Carboidratos	Metabólitos	DQOs efluente	H ₂	SSV	Fração medida	Fração não medida
BMFS	45,10±18,80	45,82±20,8	-	-	-	92±0,28	8,24 ±0,28
BMG	-	-	75,5±14,48	0,008±0,02	0,06±0,07	75,62±14,52	24,37±9,67

Notas: Metabólitos = Etanol, ácido acético, ácido propiônico e ácido butírico, ácido láctico; Substratos + metabólitos para BMFS, DQOs efluente + hidrogênio + SSV para BMG; BMFS em relação à DQOs efluente (vinhaça acidificada). Siglas: BMFS = balanço de massa na fase solúvel; BMG = balanço de massa global.

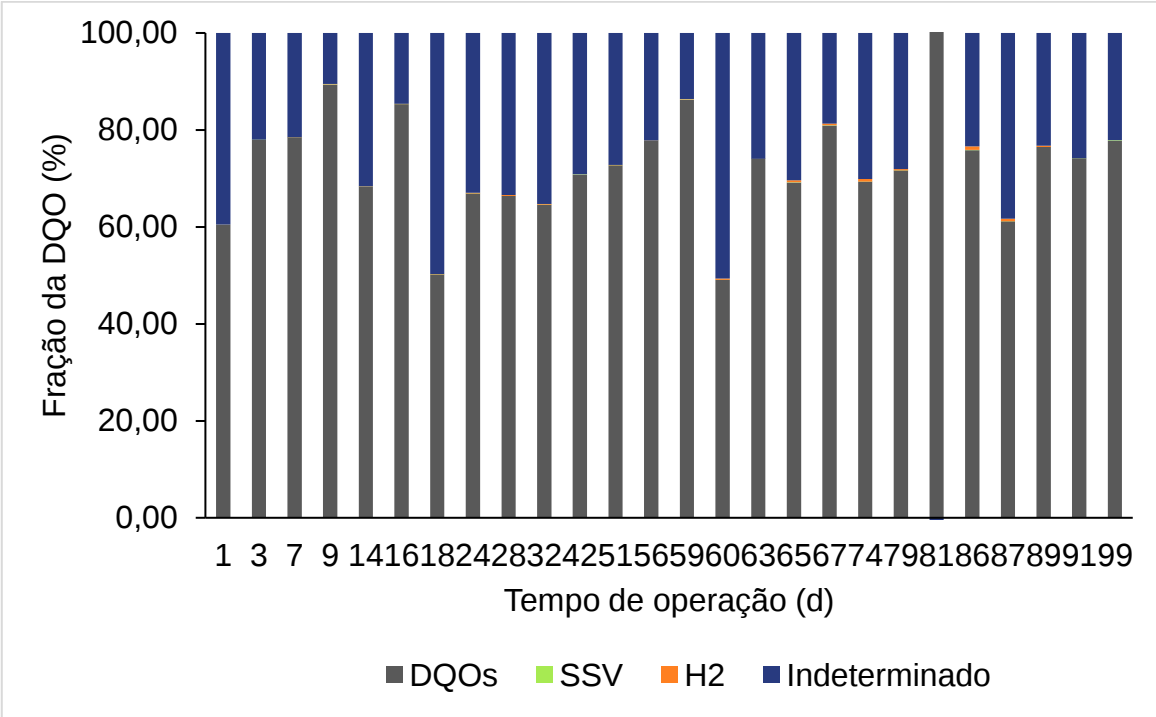
Fonte: Autor (2022).

Figura 27. Balanço de massa global da fase acidogênica RCTM10. Cálculos em relação à DQOs efluente; Cálculos em relação à DQOt afluente.



Fonte: Autor (2022).

Figura 28. Balanço de massa global da fase acidogênica RCTM18. Cálculos em relação à DQOs efluente; Cálculos em relação à DQOt afluente.



Fonte: Autor (2022).

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

A configuração de reator é considerada imprescindível ao rendimento do processo fermentativo de produção de hidrogênio, visto que pode influenciar a retenção da biomassa, o comportamento hidrodinâmico, a população microbiana e a efetividade do contato substrato/biomassa. Considerando estas informações, o RCTM foi testado para água sintética e para vinhaça de cana-de-açúcar afim de verificar o controle em função da COVe nesta configuração nas condições operacionais testadas.

Considerando os resultados obtidos nesta pesquisa comparados com os reportados na literatura, a configuração RCTM se apresenta como uma tecnologia alternativa aos reatores de leito fixo no controle da COVe e retenção de biomassa. Uma vez que os resultados no estudo e controle da COVe em meio sintético mostraram resultados de níveis adequados de retenção de biomassa permitindo o controle da COVe no RCTM18 numa faixa considerada ideal ($3,3 - 6,33 \text{ gDQOg}^{-1}\text{SSV d}^{-1}$) sem a necessidade de intervenções ou manipulações operacionais ao longo da operação, por exemplo, realização de descartes.

Embora o RCTM18 tenha apresentado o controle adequado em função da COVe, o reator ainda apresenta limitações na produção de biohidrogênio quando testada para água residuária sintética (base sacarose). Esta configuração não apresentou rendimentos significativos ($0,043 \pm 0,006 \text{ molH}_2.\text{molCH}^{-1}$) de produção de hidrogênio maiores que os citados na literatura ($0,4 - 0,6 \text{ molH}_2.\text{mol}^{-1}\text{CH}$) para o RCTM12. Isto indica que a biomassa dentro do reator não estava ativa para produção de H_2 . Como hipótese, pode-se dizer que a biomassa dentro do reator utilizou o substrato para manutenção celular e ainda para a produção de ácidos orgânicos e (acético, ácido láctico, ácido fórmico, ácido propiônico, ácido butírico) e solvente (etanol). Os resultados confirmam a produção de ácidos orgânicos com valores significativos na distribuição de metabólitos para ácido acético (28,4%) e etanol (48,2%).

Na operação contínua com vinhaça de cana-de-açúcar, os RCTM10 ($0,5 - 4,0 \text{ gDQO.g}^{-1}\text{SSV.d}^{-1}$) e RCTM18 ($2,0 - 8,0 \text{ gDQO g}^{-1}\text{SSVd}^{-1}$) apresentaram bons resultados para o controle em função da COVe com destaque para o RCTM18. Os resultados de COVe validam a hipótese de que o aumento da área superficial (aumento no número de tubos) interfere de forma positiva no controle da COVe e dinâmica de retenção de biomassa. Entretanto, o RCTM10 ($0,0013 \text{ molH}_2.\text{gDQO}^{-1}$) e

o RCTM18 ($0,0006 \text{ molH}_2 \text{ gDQO}^{-1}$) apresentaram rendimentos baixos de produções de hidrogênio, em faixa de pH de operação semelhante (4-5,5).

Em relação a produção de metabólitos secundários, ambos os RCTM10 e RCTM18 apresentam potencial para produção de ácidos orgânicos e (acético, ácido láctico, ácido fórmico, ácido propiônico, ácido butírico) e solvente (etanol). Os resultados confirmam a produção de ácidos orgânicos com valores significativos médios na distribuição de metabólitos para ácido butírico (RCTM10 = $19,7 \pm 18$, RCTM18 = $31,4 \pm 17$) e ácido láctico (RCTM10 = $65,9 \pm 16,3$, RCTM18 = $57,9 \pm 19$). Ainda, os resultados mostram que o maior metabólito secundário produzido em ambos reatores foi o ácido láctico. Este ácido pode afetar a produção de produção de H_2 , isto justificaria os baixos rendimentos obtidos no estudo, ou ainda, pode sugerir que a baixa produção de H_2 mesmo em valores ótimos de controle COVe pode ser devido o consumo de substrato pela biomassa ativa dentro do reator estar voltado para a produção de exopolímeros utilizados na adesão de biomassa na região de tubos.

A análise de biologia molecular para amostras dos reatores no início da operação com vinhaça de cana-de-açúcar, apresentou a abundância relativa para *Thermoanaerobacterium* (RCTM10 = 22,16%, RCTM18 = 17,14%), *Bacillus* (RCTM10 = 5,60%, RCTM18 = 2,37%) e *Caproiciproducens* (RCTM10 = 41,96%, RCTM18 = 54,36%). Enquanto nas amostras coletadas após a operação em batelada das biomassas acidificadas apresentaram abundância relativa para *Clostridium sensu stricto 1, 7* (RCTM10 = 17,87%, RCTM18 = 2,10%), bactérias características de sistemas acidogênicos termofílicos.

De uma forma geral, nos testes dos RCTMs alimentados com a vinhaça de cana-de-açúcar foi possível verificar que o estudo com valores de COVa próximos de $80 \text{ gDQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, estão associados a valores adequados e estáveis de COVe para o RCTM18, enquanto o RCTM10 apresentou valores de COVe inadequados e baixos dos valores otimizados na literatura. Isso demonstra que os tubos da configuração RCTM-18 apresentam potencial para adesão de biomassa semelhante ao material suporte em reatores de leito fixo, sem necessitar de intervenção operacional como drenagem periódica de biomassa ou mudança na direção de fluxo. Ainda este estudo evidencia que o aumento da área superficial vista no aumento das quantidades de tubos nos RCTMs é de fato significativo e relevante no controle da COVe, porém mais estudos precisam ser realizados para entender e discutir as limitações do RCTM-10 na retenção de biomassa. Além disso, embora os RCTMs não tenham apresentado

uma produção significativa e estável de hidrogênio, esta tecnologia apresenta potencial para o controle de COVe em períodos de operação igual a 100 dias.

A partir do estudo das configurações de reatores RCTM10 e RCTM18, na no controle da COVe e produção de hidrogênio, algumas sugestões são propostas:

- Avaliar condições de cargas orgânicas maiores que $71\text{g DQO L}^{-1}\text{d}^{-1}$, na operação com vinhaça de cana-de-açúcar para verificar a COVa ótima nestes reatores e uma melhor produção de hidrogênio;
- Caracterização das comunidades microbianas: investigar a dinâmica de colonização presente nos RCTMs, para identificar os microrganismos que se desenvolvem sob diferentes COVa e TDH, atribuindo importantes considerações sobre possíveis estratégias operacionais do sistema;
- Teste de controle de COVe e produção de hidrogênio a partir de vinhaça de cana-de-açúcar em sistema mesofílico;
- Aplicação de diferentes águas residuárias reais, como por exemplo, manipuleira, como forma de proteção ambiental no aproveitamento de efluentes, e também para fins econômicos;
- Construção de um RCTM com manutenção facilitada, em que é possível agir localmente (tubo a tubo) sem interromper a operação do reator.

7. REFERÊNCIAS

- Adorno, M. A. T., Hirasawa, J. S., & Varesche, M. B. A. (2014). 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*, 05(07), 406–414.
- Ahmad, T., Aadil, R. M., Ahmed, H., Rahman, U. ur, Soares, B. C. V, Souza, S. L. Q., Pimentel, T. C., Scudino, H., Guimarães, J. T., Esmerino, E. A., Freitas, M. Q., Almada, R. B., Vendramel, S. M. R., Silva, M. C., & Cruz, A. G. (2019). Treatment and utilization of dairy industrial waste: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 88, 361–372.
- Akitt, J. W. (2018). Some observations on the greenhouse effect at the Earth's surface. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 188, 127–134.
- Albanez, R., Lovato, G., Ratusznei, S. M., Zaiat, M., & Rodrigues, J. A. D. (2018). Feasibility of biohydrogen production by Co-digestion of vinasse (Sugarcane stillage) and Molasses in an Ansbbr. In *Brazilian Journal of Chemical Engineering* (Vol. 35, Issue 1, pp. 27–41).
- Alexandropoulou, M., Antonopoulou, G., Trably, E., Carrere, H., & Lyberatos, G. (2018). Continuous biohydrogen production from a food industry waste: Influence of operational parameters and microbial community analysis. *Journal of Cleaner Production*, 174, 1054–1063.
- Almeida, W. A., Ratusznei, S. M., Zaiat, M., & Rodrigues, J. A. D. (2017). AnSBBR applied to biomethane production for vinasse treatment: Effects of organic loading, feed strategy and temperature. In *Brazilian Journal of Chemical Engineering* (Vol. 34, Issue 3, pp. 759–773).
- Amorim, E. L. C. de, Barros, A. R., Rissato Zamariolli Damianovic, M. H., & Silva, E. L. (2009). Anaerobic fluidized bed reactor with expanded clay as support for hydrogen production through dark fermentation of glucose. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(2), 783–790.
- Andreani, C. L., Tonello, T. U., Mari, A. G., Leite, L. C. C., Campaña, H. D., Lopes, D. D., Rodrigues, J. A. D., & Gomes, S. D. (2019). Impact of operational conditions on development of the hydrogen-producing microbial consortium in an AnSBBR from cassava wastewater rich in lactic acid. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(3), 1474–1482. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.11.155>

- Antonopoulou, G., Gavala, H. N., Skiadas, I. V., & Lyberatos, G. (2010). Influence of pH on fermentative hydrogen production from sweet sorghum extract. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(5), 1921–1928.
- Anwar, S., Khan, F., Zhang, Y., & Djire, A. (2021). Recent development in electrocatalysts for hydrogen production through water electrolysis. *International Journal of Hydrogen Energy*. <https://doi.org/10.1016/J.IJHYDENE.2021.06.191>
- Anzola-Rojas, M. del P., & Zaiat, M. (2016). A novel anaerobic down-flow structured-bed reactor for long-term stable H₂ energy production from wastewater. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1002/jctb.4754>
- Anzola-Rojas, M., Da Fonseca, S. G., Da Silva, C. C., De Oliveira, V. M., & Zaiat, M. (2015). The use of the carbon/nitrogen ratio and specific organic loading rate as tools for improving biohydrogen production in fixed-bed reactors. *Biotechnology Reports*, 5(1), 46–54. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2014.10.010>
- Apergis, N., Chang, T., Gupta, R., & Ziramba, E. (2016). Hydroelectricity consumption and economic growth nexus: Evidence from a panel of ten largest hydroelectricity consumers. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 62, 318–325. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.04.075>
- APHA. (2012). AWWA, WEF. Standard Methods for examination of water and wastewater. 22nd ed. Washington: American Public Health Association; 2012, 1360 pp. ISBN 978-087553-013-0 <http://www.standardmethods.org/>. Washington: APHA, 5(3), 335.
- Arimi, M. M., Knodel, J., Kiprop, A., Namango, S. S., Zhang, Y., & Geißen, S. U. (2015). Strategies for improvement of biohydrogen production from organic-rich wastewater: A review. *Biomass and Bioenergy*, 75(0), 101–118. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.02.011>
- Azbar, N., Çetinkaya Dokgöz, F. T., Keskin, T., Korkmaz, K. S., & Syed, H. M. (2009). Continuous fermentative hydrogen production from cheese whey wastewater under thermophilic anaerobic conditions. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(17), 7441–7447. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.04.032>
- Bal, A. S., & Dhagat, N. N. (2001). Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor - A Review. In *Indian Journal of Environmental Health*.
- Banu J, R., Usman T M, M., S, K., Kannah R, Y., K N, Y., P, S., Bhatnagar, A., & Kumar, G. (2021). A critical review on limitations and enhancement strategies associated with biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 46(31), 16565–16590. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2021.01.075>
- Belaud, J. P., Prioux, N., Vialle, C., & Sablayrolles, C. (2019). Big data for agri-food 4.0:

- Application to sustainability management for by-products supply chain. *Computers in Industry*. <https://doi.org/10.1016/j.compind.2019.06.006>
- Bijarchiyan, M., Sahebi, H., & Mirzamohammadi, S. (2020). A sustainable biomass network design model for bioenergy production by anaerobic digestion technology: Using agricultural residues and livestock manure. *Energy, Sustainability and Society*, 10(1), 19. <https://doi.org/10.1186/s13705-020-00252-7>
- Blanco, V. M.C., Oliveira, G. H. D., & Zaiat, M. (2019). Dark fermentative biohydrogen production from synthetic cheese whey in an anaerobic structured-bed reactor: Performance evaluation and kinetic modeling. *Renewable Energy*, 139, 1310–1319. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.03.029>
- Blanco, Vivian Maria Carminato, Fuess, L. T., & Zaiat, M. (2017). Calcium dosing for the simultaneous control of biomass retention and the enhancement of fermentative biohydrogen production in an innovative fixed-film bioreactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(17), 12181–12196. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.02.180>
- Braga, A. F. M., Ferraz Júnior, A. D. N., & Zaiat, M. (2016). Thermophilic biohydrogen production using a UASB reactor: Performance during long-term operation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 91(4), 967–976. <https://doi.org/10.1002/jctb.4665>
- Braga, J. K., Soares, L. A., Motteran, F., Sakamoto, I. K., & Varesche, M. B. A. (2016). Effect of 2-bromoethanesulfonate on anaerobic consortium to enhance hydrogen production utilizing sugarcane bagasse. *International Journal of Hydrogen Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.09.065>
- Bravo, I. S. M., Lovato, G., Rodrigues, J. A. D., Ratusznei, S. M., & Zaiat, M. (2015). Biohydrogen Production in an AnSBBR Treating Glycerin-Based Wastewater: Effects of Organic Loading, Influent Concentration, and Cycle Time. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(4), 1892–1914. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1421-1>
- Buitrón, G., & Carvajal, C. (2010). Biohydrogen production from Tequila vinasses in an anaerobic sequencing batch reactor: Effect of initial substrate concentration, temperature and hydraulic retention time. *Bioresource Technology*, 101(23), 9071–9077. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.127>
- Buitrón, G., Kumar, G., Martinez-Arce, A., & Moreno, G. (2014). Hydrogen and methane production via a two-stage processes (H₂-SBR + CH₄-UASB) using tequila vinasses. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(33), 19249–19255. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.04.139>

- Buchanan, I. D.; Nicell, J. A. Model development for horseradish peroxidase catalyzed removal of aqueous phenol. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 54, n. 3, p. 251–261, 1997.
- Cabrol, L., Marone, A., Tapia-Venegas, E., Steyer, J. P., Ruiz-Filippi, G., & Trably, E. (2017). Microbial ecology of fermentative hydrogen producing bioprocesses: Useful insights for driving the ecosystem function. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(2), 158–181. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw043>
- Cai, G., Jin, B., Monis, P., & Saint, C. (2011). Metabolic flux network and analysis of fermentative hydrogen production. *Biotechnology Advances*, 29(4), 375–387. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.02.001>
- Carlos Augusto de Lemos Chernicharo. (2007). Biological Wastewater Treatment Vol.4: Anaerobic Reactors. In *Biological wastewater treatment in warm climate regions*.
- Cassman, N. A., Lourenço, K. S., Do Carmo, J. B., Cantarella, H., & Kuramae, E. E. (2018). Genome-resolved metagenomics of sugarcane vinasse bacteria. *Biotechnology for Biofuels*, 11(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1036-9>
- Castelló, E., Braga, L., Fuentes, L., & Etchebehere, C. (2018). Possible causes for the instability in the H₂ production from cheese whey in a CSTR. *International Journal of Hydrogen Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.12.104>
- Castelló, E., Nunes Ferraz-Junior, A. D., Andreani, C., Anzola-Rojas, M. del P., Borzacconi, L., Buitrón, G., Carrillo-Reyes, J., Gomes, S. D., Maintinguer, S. I., Moreno-Andrade, I., Palomo-Briones, R., Razo-Flores, E., Schiappacasse-Dasati, M., Tapia-Venegas, E., Valdez-Vázquez, I., Vesga-Baron, A., Zaiat, M., & Etchebehere, C. (2020). Stability problems in the hydrogen production by dark fermentation: Possible causes and solutions. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 119, 109602. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109602>
- CETESB. Vinhaça – Critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola.
- Chandrasekhar, K., Lee, Y.-J., & Lee, D.-W. (2015). Biohydrogen Production: Strategies to Improve Process Efficiency through Microbial Routes. *OPEN ACCESS Int. J. Mol. Sci*, 16, 16. <https://doi.org/10.3390/ijms16048266>
- Chang, F. Y., & Lin, C. Y. (2004). Biohydrogen production using an up-flow anaerobic sludge blanket reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29(1), 33–39. [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(03\)00082-X](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(03)00082-X)
- Chaves, T. C., Gois, G. N. S. B., Peiter, F. S., Vich, D. V., & de Amorim, E. L. C. (2021). Biohydrogen production in an AFBR using sugarcane molasses. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 44(2), 307–316. <https://doi.org/10.1007/s00449-020-02443->

0

- Chernicharo, C. A. L., van Lier, J. B., Noyola, A., & Bressani Ribeiro, T. (2015). Anaerobic sewage treatment: state of the art, constraints and challenges. In *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s11157-015-9377-3>
- Christofoletti, C. A., Escher, J. P., Correia, J. E., Fernanda, J., Marinho, U., & Fontanetti, C. S. (2013). Sugarcane vinasse: Environmental implications of its use. *Waste Management*, 33(12), 2752–2761. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2013.09.005>
- CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar, 2020.
- CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar, 2021.
- CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar, 2022.
- Corbari, S. D. M. L., Andreani, C. L., Torres, D. G. B., Eng, F., & Gomes, S. D. (2019). Strategies to improve the biohydrogen production from cassava wastewater in fixed-bed reactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(32), 17214–17223. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.04.242>
- Dahal, K., Juhola, S., & Niemelä, J. (2018). The role of renewable energy policies for carbon neutrality in Helsinki Metropolitan area. *Sustainable Cities and Society*, 40, 222–232. <https://doi.org/10.1016/j.scs.2018.04.015>
- Damasceno, L. H. S., Ratusznei, S. M., Zaiat, M., & Foresti, E. (2008). Effect of mixing mode on the behavior of an ASBBR with immobilized biomass in the treatment of cheese whey. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 25(02), 291–298.
- Dareioti, M. A., Vavouraki, A. I., & Kornaros, M. (2014). Effect of pH on the anaerobic acidogenesis of agroindustrial wastewaters for maximization of bio-hydrogen production: A lab-scale evaluation using batch tests. *Bioresource Technology*, 162, 218–227. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.149>
- Das, D. (2002). Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy*, 26(1), 13–28. [https://doi.org/10.1016/s0360-3199\(00\)00058-6](https://doi.org/10.1016/s0360-3199(00)00058-6)
- Davila-Vazquez, G., de León-Rodríguez, A., Alatraste-Mondragón, F., & Razo-Flores, E. (2011). The buffer composition impacts the hydrogen production and the microbial community composition in non-axenic cultures. *Biomass and Bioenergy*, 35(7), 3174–3181. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.04.046>
- De Araujo, M. M., Gaudencio, B. O., Ayabe, D. N., & Zaiat, M. (2016). Evaluation of an innovative anaerobic bioreactor with fixed-structured bed (ABFSB) for brewery wastewater treatment. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*.

<https://doi.org/10.1590/0104-6632.20160334s20150288>

- Del Nery, V. (1987). Utilization of immobilized anaerobic sludge in start-up of up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. MSc. Dissert., EESC/USP, São Carlos, SP, Brasil.
- Del Nery, V., Alves, I., Zamariolli Damianovic, M. H. R., & Pires, E. C. (2018). Hydraulic and organic rates applied to pilot scale UASB reactor for sugar cane vinasse degradation and biogas generation. *Biomass and Bioenergy*, 119(October), 411–417. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.10.002>
- Dincer, I., & Acar, C. (2014). Review and evaluation of hydrogen production methods for better sustainability. *International Journal of Hydrogen Energy*, 40(34), 11094–11111. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.12.035>
- Djalma Nunes Ferraz Júnior, A., Wenzel, J., Etchebehere, C., & Zaiat, M. (2014). Effect of organic loading rate on hydrogen production from sugarcane vinasse in thermophilic acidogenic packed bed reactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(30), 16852–16862. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.08.017>
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Egeland-Eriksen, T., Hajizadeh, A., & Sartori, S. (2021). Hydrogen-based systems for integration of renewable energy in power systems: Achievements and perspectives. *International Journal of Hydrogen Energy*. <https://doi.org/10.1016/J.IJHYDENE.2021.06.218>
- España-Gamboa, E. I., Mijangos-Cortés, J. O., Hernández-Zárate, G., Maldonado, J. A. D., & Alzate-Gaviria, L. M. (2012). Methane production by treating vinasses from hydrous ethanol using a modified UASB reactor. *Biotechnology for Biofuels*, 5, 1–9. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-82>
- Fan, Y. Van, Klemeš, J. J., Lee, C. T., & Perry, S. (2018). Anaerobic digestion of municipal solid waste: Energy and carbon emission footprint. *Journal of Environmental Management*, 223, 888–897. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.07.005>
- Fatsikostas, A. N., Kondarides, D. I., & Verykios, X. E. (2002). Production of hydrogen for fuel cells by reformation of biomass-derived ethanol. *Catalysis Today*, 75(1–4), 145–155. [https://doi.org/10.1016/S0920-5861\(02\)00057-3](https://doi.org/10.1016/S0920-5861(02)00057-3)
- Fernandes, B. S., Saavedra, N. K., Maintinguer, S. I., Sette, L. D., Oliveira, V. M., Varesche, M. B. A., & Zaiat, M. (2013). The effect of biomass immobilization support material and bed porosity on hydrogen production in an upflow anaerobic packed-bed

- bioreactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 170(6), 1348–1366. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0262-7>
- Ferraz Júnior, A. D. N., Etchebehere, C., & Zaiat, M. (2015). High organic loading rate on thermophilic hydrogen production and metagenomic study at an anaerobic packed-bed reactor treating a residual liquid stream of a Brazilian biorefinery. *Bioresource Technology*, 186, 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.035>
- Ferraz Jr., A.D.N., Etchebehere, C., Zaiat, M. (2015b) Mesophilic hydrogen production in acidogenic packed-bed reactors (APBR) using raw sugarcane vinasse as substrate: influence of support materials. *Anaerobe* 34, 94–105.
- Ferraz Jr., A.D.N., Zaiat, M., Guta, M., Elbeshbjshy, E., Hafez, H., Nakhlab, G. (2014a) Impact of organic loading rate on biohydrogen production in an up-flow anaerobic packed bed reactor (UAnPBR). *Bioresour. Technol.* 164, 371–379.
- Ferraz Jr., A.D.N., Wenzel, J., Etchebehere, C., Zait, M. (2014b) Effect of organic loading rate on hydrogen production from sugarcane vinasse in thermophilic acidogenic packed bed reactors. *Int. J. Hydrogen Energy* 39, 16852–16862.
- Fiorese, G., Catenacci, M., Bosetti, V., & Verdolini, E. (2014). The power of biomass: Experts disclose the potential for success of bioenergy technologies. *Energy Policy*, 65, 94–114. <https://doi.org/10.1016/j.enpol.2013.10.015>
- Fontes Lima, D. M., Moreira, W. K., & Zaiat, M. (2013). Comparison of the use of sucrose and glucose as a substrate for hydrogen production in an upflow anaerobic fixed-bed reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.09.003>
- Fontes Lima, D. M., & Zaiat, M. (2012). The influence of the degree of back-mixing on hydrogen production in an anaerobic fixed-bed reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.03.097>
- Fuess, Lucas T., Rodrigues, I. J., & Garcia, M. L. (2017). Fertirrigation with sugarcane vinasse: Foreseeing potential impacts on soil and water resources through vinasse characterization. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 52(11), 1063–1072. <https://doi.org/10.1080/10934529.2017.1338892>
- Fuess, Lucas Tadeu, Ferraz, A. D. N., Machado, C. B., & Zaiat, M. (2018). Temporal dynamics and metabolic correlation between lactate-producing and hydrogen-producing bacteria in sugarcane vinasse dark fermentation: The key role of lactate. *Bioresource Technology*, 247, 426–433. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.121>

- Fuess, Lucas Tadeu, & Garcia, M. L. (2014). Implications of stillage land disposal: A critical review on the impacts of fertigation. In *Journal of Environmental Management* (Vol. 145, pp. 210–229). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.07.003>
- Fuess, Lucas Tadeu, Kiyuna, L. S. M., Ferraz, A. D. N., Persinoti, G. F., Squina, F. M., Garcia, M. L., & Zaiat, M. (2017). Thermophilic two-phase anaerobic digestion using an innovative fixed-bed reactor for enhanced organic matter removal and bioenergy recovery from sugarcane vinasse. *Applied Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.12.071>
- Fuess, Lucas Tadeu, Mazine Kiyuna, L. S., Garcia, M. L., & Zaiat, M. (2016). Operational strategies for long-term biohydrogen production from sugarcane stillage in a continuous acidogenic packed-bed reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(19), 8132–8145. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.10.143>
- Fuess, Lucas Tadeu, Zaiat, M., & do Nascimento, C. A. O. (2019). Novel insights on the versatility of biohydrogen production from sugarcane vinasse via thermophilic dark fermentation: Impacts of pH-driven operating strategies on acidogenesis metabolite profiles. *Bioresource Technology*, 286, 121379. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121379>
- Fuess, Lucas Tadeu, Zaiat, M., & Nascimento, C. A. O. do. (2021). Thermophilic biodigestion of fermented sugarcane molasses in high-rate structured-bed reactors: Alkalinization strategies define the operating limits. *Energy Conversion and Management*, 239, 114203. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2021.114203>
- Fuess, Lucas Tadeu, Zaiat, M., & Oller Do Nascimento, C. A. (2021). Thermophilic biodigestion of fermented sugarcane molasses in high-rate structured-bed reactors: Alkalinization strategies define the operating limits. *Energy Conversion and Management*, 239, 114203. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2021.114203>
- Gavala, H. N.; Skiadas, I. V.; Ahring, B. K. Biological hydrogen production in suspended and attached growth anaerobic reactor systems. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 31, n. 9, p. 1164-75, 2006.
- Geissdoerfer, M., Savaget, P., Bocken, N. M. P., & Hultink, E. J. (2017). The Circular Economy – A new sustainability paradigm? In *Journal of Cleaner Production* (Vol. 143, pp. 757–768). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.12.048>
- Ghimire, A., Frunzo, L., Pirozzi, F., Trably, E., Escudie, R., Lens, P. N. L., & Esposito, G. (2015). A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products. *Applied Energy*, 144, 73–95. <https://doi.org/10.1016/J.APENERGY.2015.01.045>

- Gomes, Simone D., Fuess, L. T., Penteado, E. D., Lucas, S. D. M., Gotardo, J. T., & Zaiat, M. (2015). 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. *Bioresource Technology*, 197, 201–207. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.077>
- Gomes, Simone Damasceno, Fuess, L. T., Mañunga, T., De Lima Gomes, P. C. F., & Zaiat, M. (2016). Bacteriocins of lactic acid bacteria as a hindering factor for biohydrogen production from cassava flour wastewater in a continuous multiple tube reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(19), 8120–8131. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.11.186>
- González-Cabaleiro, R., Lema, J. M., & Rodríguez, J. (2015). Metabolic energy-based modelling explains product yielding in anaerobic mixed culture fermentations. *PLoS ONE*, 10(5), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126739>
- Grangeiro, L. C., de Almeida, S. G. C., Mello, B. S. de, Fuess, L. T., Sarti, A., & Dussán, K. J. (2019). New trends in biogas production and utilization. *Sustainable Bioenergy*, 199–223. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817654-2.00007-1>
- Guo, S., Liu, Q., Sun, J., & Jin, H. (2018). A review on the utilization of hybrid renewable energy. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 91(April), 1121–1147. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.105>
- Guo, W.-Q., Ren, N.-Q., Wang, X.-J., Xiang, W.-S., Meng, Z.-H., Ding, J., Qu, Y.-Y., & Zhang, L.-S. (2008). Biohydrogen production from ethanol-type fermentation of molasses in an expanded granular sludge bed (EGSB) reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(19), 4981–4988. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.05.033>
- Gyalai-Korpos, M., Fehér, A., Barta, Z., & Réczey, K. (2014). Evaluation of an online fermentation monitoring system. *Acta Alimentaria*, 43(1), 76–87. <https://doi.org/10.1556/AAlim.43.2014.1.8>
- Hafez, H., Nakhla, G., El. Naggar, M. H., Elbeshbishy, E., & Baghchehsaraee, B. (2010). Effect of organic loading on a novel hydrogen bioreactor. *International Journal of Hydrogen Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.10.051>
- Hallenbeck, P. C. (2009). Fermentative hydrogen production: Principles, progress, and prognosis. *International Journal of Hydrogen Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.12.080>
- Hawkes, F. R., Dinsdale, R., Hawkes, D. L., & Hussy, I. (2002). Sustainable fermentative hydrogen production: Challenges for process optimisation. *International Journal of*

- Hydrogen Energy*, 27(11–12), 1339–1347. [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(02\)00090-3](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(02)00090-3)
- Holladay, J. D., Hu, J., King, D. L., & Wang, Y. (2009). An overview of hydrogen production technologies. *Catalysis Today*, 139(4), 244–260. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2008.08.039>
- Holm-Nielsen, J. B., Al Seadi, T., & Oleskowicz-Popiel, P. (2009). The future of anaerobic digestion and biogas utilization. *Bioresource Technology*, 100(22), 5478–5484. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.12.046>
- IEA. (2020). *Outlook for biogas and biomethane. Prospects for organic growth. World Energy Outlook Special Report*. 93.
- Ingrao, C., Bacenetti, J., Bezama, A., Blok, V., Goglio, P., Koukios, E. G., Lindner, M., Nemecek, T., Siracusa, V., Zabaniotou, A., & Huisingsh, D. (2018). The potential roles of bio-economy in the transition to equitable, sustainable, post fossil-carbon societies: Findings from this virtual special issue. In *Journal of Cleaner Production* (Vol. 204, pp. 471–488). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.09.068>
- Inoue, R. K., Lima, D. M. F., Rodrigues, J. A. D., Ratusznei, S. M., & Zaiat, M. (2014). Effect of Organic Loading Rate and Fill Time on the Biohydrogen Production in a Mechanically Stirred AnSBBR Treating Synthetic Sucrose-Based Wastewater. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 174(6), 2326–2349. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1205-7>
- Intanoo, P., Chaimongkol, P., & Chavadej, S. (2016). Hydrogen and methane production from cassava wastewater using two-stage upflow anaerobic sludge blanket reactors (UASB) with an emphasis on maximum hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.10.125>
- Ishaq, H., Dincer, I., & Naterer, G. F. (2018). ScienceDirect Performance investigation of an integrated wind energy system for co-generation of power and hydrogen. *International Journal of Hydrogen Energy*, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.03.139>
- Jain, S. (2019). Global potential of biogas. In *World Biogas Association*.
- Jhung, J. K., & Choi, E. (1995). A comparative study of UASB and anaerobic fixed film reactors with development of sludge granulation. *Water Research*, 29(1), 271–277. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(94\)E0123-N](https://doi.org/10.1016/0043-1354(94)E0123-N)
- Jung, K. W., Kim, D. H., & Shin, H. S. (2010). Continuous fermentative hydrogen production from coffee drink manufacturing wastewater by applying UASB reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*.

- <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.11.120>
- Kang, S., Selosse, S., & Maïzi, N. (2016). Contribution of global GHG reduction pledges to bioenergy expansion. *Biomass and Bioenergy*, 111, 142–153. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2017.05.017>
- Khanal, S. K., Chen, W. H., Li, L., & Sung, S. (2004). Biological hydrogen production: Effects of pH and intermediate products. *International Journal of Hydrogen Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2003.11.002>
- Kirk-davidoff, D. (2018). The Greenhouse Effect, Aerosols, and Climate Change. In *Green Chemistry* (pp. 211–234). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809270-5.00009-1>
- Koyama, M. H., Araújo Júnior, M. M., Zaiat, M., & Ferraz Júnior, A. D. N. (2016). Kinetics of thermophilic acidogenesis of typical Brazilian sugarcane vinasse. *Energy*, 116, 1097–1103. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2016.10.043>
- Kumari, S., & Das, D. (2017). Improvement of biohydrogen production using acidogenic culture. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(7), 4083–4094. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.09.021>
- Lee, D. H. (2017). Econometric assessment of bioenergy development. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(45), 27701–27717. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.08.055>
- Leite, J. A. C., Fernandes, B. S., Pozzi, E., Barboza, M., & Zaiat, M. (2008). Application of an anaerobic packed-bed bioreactor for the production of hydrogen and organic acids. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(2), 579–586. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2007.10.009>
- Lettinga, G. (1995). Anaerobic digestion and wastewater treatment systems. *Antonie van Leeuwenhoek*. <https://doi.org/10.1007/BF00872193>
- Lettinga, G., van Velsen, A. F. M., Hobma, S. W., de Zeeuw, W., & Klapwijk, A. (1980). Use of the upflow sludge blanket (USB) reactor concept for biological wastewater treatment, especially for anaerobic treatment. *Biotechnology and Bioengineering*, 22(4), 699–734. <https://doi.org/10.1002/bit.260220402>
- Lettinga, G., Rebecq, S., Parshina, S., Nozhevnikova, A., Van Lier, J. B., & Stams, A. J. M. (1999). High-rate anaerobic treatment of wastewater at low temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/aem.65.4.1696-1702.1999>
- Levin, D. B., Pitt, L., & Love, M. (2004). Biohydrogen production: Prospects and limitations to practical application. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29(2), 173–185. [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(03\)00094-6](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(03)00094-6)

- Lima, D. M. F., Inoue, R. K., Rodrigues, J. A. D., Ratusznei, S. M., & Zaiat, M. (2015). Biohydrogen from cheese whey treatment in an AnSBBR: Achieving process stability. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 32(2), 397–408. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20150322s00003342>
- Lima, D. M. F., Lazaro, C. Z., Rodrigues, J. A. D., Ratusznei, S. M., & Zaiat, M. (2016). Optimization performance of an AnSBBR applied to biohydrogen production treating whey. *Journal of Environmental Management*, 169, 191–201. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.12.032>
- Lin, C. Y., & Chang, R. C. (1999). Hydrogen production during the anaerobic acidogenic conversion of glucose. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 74(6), 498–500. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4660\(199906\)74:6<498::AID-JCTB67>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4660(199906)74:6<498::AID-JCTB67>3.0.CO;2-D)
- Lin, C. Y., & Jo, C. H. (2003). Hydrogen production from sucrose using an anaerobic sequencing batch reactor process. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 78(6), 678–684. <https://doi.org/10.1002/jctb.848>
- Lindoso, D. P., Rocha, J. D., Debortoli, N., Parente, I. C. I., Eiró, F., Bursztyn, M., & Rodrigues-Filho, S. (2011). Climate Change and Vulnerability to drought in the semiarid: the case of smallholder farmers in the Brazilian northeast. In *Climate change in Brazil: economic, social and regulatory aspects*.
- Liu, T., Schnürer, A., Björkholm, J., Willquist, K., & Kreuger, E. (2020). Diversity and abundance of microbial communities in UASB reactors during methane production from hydrolyzed wheat straw and lucerne. *Microorganisms*, 8(9), 1–27. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091394>
- Lo, Y. C.; CHEN, W. M.; HUNG, C. H.; CHEN, S. D.; CHANG, J. S. Dark H₂ fermentation from sucrose and xylose using H₂-producing indigenous bacteria: feasibility and kinetic studies. *Water Research*, v. 42, n. 4, p. 827-842, 2008
- Lopes Silva, D. A., Delai, I., Delgado Montes, M. L., & Roberto Ometto, A. (2014). Life cycle assessment of the sugarcane bagasse electricity generation in Brazil. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 32, 532–547. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.12.056>
- Lovato, G., Moncayo Bravo, I. S., Ratusznei, S. M., Rodrigues, J. A. D., & Zaiat, M. (2015). The effect of organic load and feed strategy on biohydrogen production in an AnSBBR treating glycerin-based wastewater. *Journal of Environmental Management*, 154, 128–137. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.02.014>
- Łukajtis, R., Hołowacz, I., Kucharska, K., Glinka, M., Rybarczyk, P., Przyjazny, A., &

- Kamiński, M. (2018). Hydrogen production from biomass using dark fermentation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 91(April 2017), 665–694. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.043>
- Luo, G., Xie, L., Zhou, Q., & Angelidaki, I. (2011). Enhancement of bioenergy production from organic wastes by two-stage anaerobic hydrogen and methane production process. *Bioresource Technology*, 102(18), 8700–8706. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.012>
- Luo, G., Xie, L., Zou, Z., Wang, W., & Zhou, Q. (2010). Exploring optimal conditions for thermophilic fermentative hydrogen production from cassava stillage. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(12), 6161–6169. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.03.126>
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Stahl, D. A., & Clark, D. P. (2012). *Brock Biology of Microorganisms* (13th ed.). Pearson.
- Maintinguer, S. I., Fernandes, B. S., Duarte, I. C. S., Saavedra, N. K., Adorno, M. A. T., & Varesche, M. B. A. (2011). Fermentative hydrogen production with xylose by *Clostridium* and *Klebsiella* species in anaerobic batch reactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(21), 13508–13517. <https://doi.org/10.1016/J.IJHYDENE.2011.07.095>
- Manssouri, M., Rodrigues, J. A. D., Ratusznei, S. M., & Zaiat, M. (2013). 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*. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0457-y>
- Manzano-Agugliaro, F., Alcayde, A., Montoya, F. G., Zapata-Sierra, A., & Gil, C. (2013). Scientific production of renewable energies worldwide: An overview. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 18, 134–143. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.10.020>
- Mao, C., Feng, Y., Wang, X., & Ren, G. (2015). Review on research achievements of biogas from anaerobic digestion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 45, 540–555. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.02.032>
- McCarty, P. L. (1982). One hundred years of anaerobic treatment. *Anaerobic Digestion 1981. Proc. Symposium, Travemunde*.
- McCarty, P. L. (2001). The developmental of anaerobic treatment and its future. *Water Science and Technology*. <https://doi.org/10.2166/wst.2001.0487>
- McCormick, K., & Kautto, N. (2013). The Bioeconomy in Europe: An Overview. *Sustainability (Switzerland)*, 5(6), 2589–2608. <https://doi.org/10.3390/su5062589>
- Mercosur, D. E. L. (2017). *BIOGAS AND BIOMETHANE REPORT IN MERCOSUR*

- Mercosul Ad Hoc Group on Biofuels - GAHB Relatório de Biogás e Biometano.*
- Metcalf, W., & Eddy, C. (2003). *Metcalf and Eddy Wastewater Engineering: Treatment and Reuse. Wastewater Engineering: Treatment and Reuse McGraw Hill. New York, NY.*
- Milanez, A. Y., Guimarães, D. D., Maia, G. B. da S., de Souza, J. A. P., & Lemos, M. L. F. (2018). Biogás de resíduos agroindustriais : panorama e perspectivas. In *BNDES Setorial* (Vol. 47).
- Mizuno, O., Ohara, T., Shinya, M., & Noike, T. (2000). Characteristics of hydrogen production from bean curd manufacturing waste by anaerobic microflora. *Water Science and Technology*, 42(3–4), 345–350. <https://doi.org/10.2166/wst.2000.0401>
- Mockaitis, G., Ratusznei, S. M., Rodrigues, J. A. D., Zaiat, M., & Foresti, E. (2006). Anaerobic whey treatment by a stirred sequencing batch reactor (ASBR): Effects of organic loading and supplemented alkalinity. *Journal of Environmental Management*, 79(2), 198–206. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2005.07.001>
- Montoya-Rosales, J. de J., Palomo-Briones, R., Celis, L. B., Etchebehere, C., & Razo-Flores, E. (2020). Discontinuous biomass recycling as a successful strategy to enhance continuous hydrogen production at high organic loading rates. *International Journal of Hydrogen Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.04.265>
- Moraes, B. S., Junqueira, T. L., Pavanello, L. G., Cavalett, O., Mantelatto, P. E., Bonomi, A., & Zaiat, M. (2014). Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane biorefineries in Brazil from energy, environmental, and economic perspectives: Profit or expense? *Applied Energy*, 113, 825–835. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.07.018>
- Moraes, B. S., Zaiat, M., & Bonomi, A. (2015). Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil : Challenges and perspectives. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 44, 888–903. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.01.023>
- Mosey, F. E. (1974). Anaerobic biological treatment. *INST.WATER POLL.CONTROL*.
- Ndaba, B., Chiyanzu, I., & Marx, S. (2015). n-Butanol derived from biochemical and chemical routes: A review. *Biotechnology Reports*, 8, 1–9. <https://doi.org/10.1016/J.BTRE.2015.08.001>
- Niz, M. Y. K., Etchelet, I., Fuentes, L., Etchebehere, C., & Zaiat, M. (2019). Extreme thermophilic condition: An alternative for long-term biohydrogen production from sugarcane vinasse. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(41), 22876–22887. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.07.015>
- Okonkwo, O., Escudie, R., Bernet, N., Mangayil, R., Lakaniemi, A. M., & Trably, E. (2019). Impacts of short-term temperature fluctuations on biohydrogen production and

- resilience of thermophilic microbial communities. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(16), 8028–8037. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.01.256>
- Okonkwo, O., Papirio, S., Trably, E., Escudie, R., Lakaniemi, A.-M., & Esposito, G. (2020). Enhancing thermophilic dark fermentative hydrogen production at high glucose concentrations via bioaugmentation with *Thermotoga neapolitana*. *International Journal of Hydrogen Energy*, in press, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.04.231>
- Oliveira, C. A., Fuess, L. T., Soares, L. A., & Damianovic, M. H. R. Z. (2020). Thermophilic biohydrogen production from sugarcane molasses under low pH: Metabolic and microbial aspects. *International Journal of Hydrogen Energy*, 45(7), 4182–4192. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.12.013>
- Pachiega, R., Rodrigues, M. F., Rodrigues, C. V., Sakamoto, I. K., Varesche, M. B. A., De Oliveira, J. E., & Maintinguer, S. I. (2019). Hydrogen bioproduction with anaerobic bacteria consortium from brewery wastewater. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(1), 155–163. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.02.107>
- Palomo-Briones, R., Razo-Flores, E., Bernet, N., & Trably, E. (2017). Dark-fermentative biohydrogen pathways and microbial networks in continuous stirred tank reactors: Novel insights on their control. *Applied Energy*, 198, 77–87. <https://doi.org/10.1016/J.APENERGY.2017.04.051>
- Pareek, A., Dom, R., Gupta, J., Chandran, J., Adepu, V., & Borse, P. H. (2020). Insights into renewable hydrogen energy: Recent advances and prospects. *Materials Science for Energy Technologies*, 3, 319–327. <https://doi.org/10.1016/j.mset.2019.12.002>
- Parsaee, M., Kiani Deh Kiani, M., & Karimi, K. (2019). A review of biogas production from sugarcane vinasse. *Biomass and Bioenergy*, 122(January), 117–125. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.01.034>
- Peixoto, G., Saavedra, N. K., Varesche, M. B. A., & Zaiat, M. (2011). Hydrogen production from soft-drink wastewater in an upflow anaerobic packed-bed reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.05.014>
- Penteado, E. D. Influência da origem e do pré-tratamento do inóculo na produção de hidrogênio a partir de águas residuárias em biorreatores anaeróbios. 2012. 165 f. Dissertação. (Mestrado em 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. (2013). Influence of seed sludge and pretreatment method on hydrogen production in packed-bed anaerobic reactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(14), 6137–6145.

- <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.01.067>
- Perna, V., Castelló, E., Wenzel, J., Zampol, C., Fontes Lima, D. M., Borzacconi, L., Varesche, M. B., Zaiat, M., & Etchebehere, C. (2013). Hydrogen production in an upflow anaerobic packed bed reactor used to treat cheese whey. *International Journal of Hydrogen Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.10.022>
- Piffer, M. A., Zaiat, M., Nascimento, C. A. O. do, & Fuess, L. T. (2021). Dynamics of sulfate reduction in the thermophilic dark fermentation of sugarcane vinasse: A biohydrogen-independent approach targeting enhanced bioenergy production. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(5), 105956. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105956>
- Rajeshwari, K. V., Balakrishnan, M., Kansal, A., Lata, K., & Kishore, V. V. N. (2000). State-of-the-art of anaerobic digestion technology for industrial wastewater treatment. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*. [https://doi.org/10.1016/S1364-0321\(99\)00014-3](https://doi.org/10.1016/S1364-0321(99)00014-3)
- Ren, N., XING, D., RITTMANN, B.E., ZHAO, L., XIE, T., ZHAO, X. Microbial community structure of ethanol type fermentation in bio-hydrogen production. *Environmental Microbiology*, v.9, p.1112-1125, 2007
- Rodrigues, B. C. G., de Mello, B. S., Gonsales da Costa Araujo, M. L., Ribeiro da Silva, G. H., & Sarti, A. (2021). Soybean molasses as feedstock for sustainable generation of biomethane using high-rate anaerobic reactor. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(4), 105226. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105226>
- Rodrigues, B. C. G., de Mello, B. S., Grangeiro, L. C., Sarti, A., & Dussán, K. J. (2021). Microbial degradation in the biogas production of value-added compounds. In *Recent Advances in Microbial Degradation*.
- Rossi, D. M., Berne Da Costa, J., Aquino De Souza, E., Peralba, M. D. C. R., Samios, D., & Záchia Ayub, M. A. (2011). Comparison of different pretreatment methods for hydrogen production using environmental microbial consortia on residual glycerol from biodiesel. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(8), 4814–4819.
- Salomon, K. R.; LORA, E. E. S. Estimate of the electric energy generating potential for different sources of biogas in Brazil. *Biomass and Bioenergy*, v. 33, n. 9, p. 1101–1107, 2009.
- Saady, N. M. C. (2013). Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(30), 13172–13191.
- Sahota, S., Vijay, V. K., Subbarao, P. M. V., Chandra, R., Ghosh, P., Shah, G., Kapoor,

- R., Vijay, V., Koutu, V., & Thakur, I. S. (2018). Characterization of leaf waste based biochar for cost effective hydrogen sulphide removal from biogas. *Bioresource Technology*, 250, 635–641. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.11.093>
- Sánchez, F., Tadeu Fuess, L., Soares Cavalcante, G., Ângela Talarico Adorno, M., & Zaiat, M. (2021b). Value-added soluble metabolite production from sugarcane vinasse within the carboxylate platform: An application of the anaerobic biorefinery beyond biogas production. *Fuel*, 286, 119378. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.119378>
- Sansaniwal, S. K., Sharma, V., & Mathur, J. (2018). Energy and exergy analyses of various typical solar energy applications: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 82(January), 1576–1601.
- Santos, S. C., Ferreira Rosa, P. R., Sakamoto, I. K., Amâncio Varesche, M. B., & Silva, E. L. (2014). Continuous thermophilic hydrogen production and microbial community analysis from anaerobic digestion of diluted sugar cane stillage. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(17), 9000–9011.
- Sarti, A., Côrtes, R. S., Hirasawa, J. S., Pires, E. C., & Foresti, E. (2009). Post-treatment of effluents from the sulfate reduction process by anaerobic sequencing batch biofilm reactors. *Desalination*, 237(1–3), 243–253.
- Scoma, A., Bertin, L., & Fava, F. (2013). Effect of hydraulic retention time on biohydrogen and volatile fatty acids production during acidogenic digestion of dephenolized olive mill wastewaters. *Biomass and Bioenergy*, 48, 51–58.
- Searmsirimongkol, P., Rangsunvigit, P., Leethochawalit, M., & Chavadej, S. (2011). Hydrogen production from alcohol distillery wastewater containing high potassium and sulfate using an anaerobic sequencing batch reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*.
- Seghezzo, L., Zeeman, G., Van Lier, J. B., Hamelers, H. V. M., & Lettinga, G. (1998). A review: The anaerobic treatment of sewage in UASB and EGSB reactors. *Bioresource Technology*, 65(3), 175–190.
- Seta, K., Suzuki, T., Kiyoshi, K., Shigeno, T., & Nakajima-Kambe, T. (2018). Potential use of methane fermentation digested slurry as a low-cost, environmentally-friendly nutrient for bioethanol production from crude glycerol by *Klebsiella variicola* TB-83D. *New Biotechnology*, 44, 1–5.
- Sharma, S., Basu, S., Shetti, N. P., & Aminabhavi, T. M. (2020). Waste-to-energy nexus for circular economy and environmental protection: Recent trends in hydrogen energy. *Science of the Total Environment*, 713, 136633.

- Silva Martins, J., & Lucena Cavalcante de Amorim, E. (2016). Produção de hidrogênio em reator anaeróbico a partir de efluente do processamento de coco. *Ciência & Engenharia*. h
- Speece, R. E., Duran, M., Demirer, G., Zhang, H., & Distefano, T. (1997). The role of process configuration in the performance of anaerobic systems. *Water Science and Technology*, 36(6–7), 539–547.
- Stickland, L. H. (1951). The determination of small quantities of bacteria by means of the biuret reaction. *Journal of General Microbiology*, 5(4), 698–703.
- Takeda, P. Y. (2021). Manutenção da produção de metano em indústrias sucroalcooleiras, a partir da substituição de vinhaça por glicerol no período de entressafra de cana-de-açúcar (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- Taylor, K. A. C. C. A simple colorimetric assay for muramic acid and lactic acid. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*, v. 56, n. 1, p. 49–58, 1996.
- Thanwised, P., Wirojanagud, W., & Reungsang, A. (2012). Effect of hydraulic retention time on hydrogen production and chemical oxygen demand removal from tapioca wastewater using anaerobic mixed cultures in anaerobic baffled reactor (ABR). *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(20), 15503–15510.
- Tikariha, A., & Sahu, O. (2014). Study of Characteristics and Treatments of Dairy Industry Waste Water. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 2(1), 16–22.
- Toledo-Cervantes, A., Villafán-Carranza, F., Arreola-Vargas, J., Razo-Flores, E., & Méndez-Acosta, H. O. (2020). Comparative evaluation of the mesophilic and thermophilic biohydrogen production at optimized conditions using tequila vinasses as substrate. *International Journal of Hydrogen Energy*, 45(19), 11000–11010.
- Trevisan, A. P., Lied, E. B., Devens, K. U., Tonello, T. U., Biasotto, G., Rossi, L. C. L., Fernandes, J. R., & Gomes, S. D. (2019). Continuous multiple tube reactor in the hydrogen production using sucrose. *Chemical Engineering Transactions*, 74(December 2018), 181–186.
- Trevisan, A. P. (2020). Atributos do reator anaeróbico contínuo de tubos múltiplos no controle da carga orgânica volumétrica específica na fase acidogênica visando à produção de hidrogênio
- Urbaniec, K., & Bakker, R. R. (2015). Biomass residues as raw material for dark hydrogen fermentation – A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 40(9), 3648–3658.
- Valenti, F., Porto, S. M. C., Selvaggi, R., & Pecorino, B. (2020). Co-digestion of by-products and agricultural residues: A bioeconomy perspective for a Mediterranean

- feedstock mixture. *Science of the Total Environment*, 700, 134440.
- Van Ginkel, S., Sung, S., & Lay, J. J. (2001). Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration. *Environmental Science and Technology*. h
- Van Ginkel, S. W., Oh, S. E., & Logan, B. E. (2005). Biohydrogen gas production from food processing and domestic wastewaters. *International Journal of Hydrogen Energy*, 30(15), 1535–1542. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2004.09.017>
- Van Haandel, A., Kato, M. T., Cavalcanti, P. F. F., & Florencio, L. (2006). Anaerobic reactor design concepts for the treatment of domestic wastewater. In *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s11157-005-4888-y>
- van Lier, J. B., van der Zee, F. P., Frijters, C. T. M. J., & Ersahin, M. E. (2015). Celebrating 40 years anaerobic sludge bed reactors for industrial wastewater treatment. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 14(4), 681–702. <https://doi.org/10.1007/s11157-015-9375-5>
- Vatsala, T. M. (1992). Hydrogen production from (cane-molasses) stillage by *Citrobacter freundii* and its use in improving methanogenesis. *International Journal of Hydrogen Energy*, 17(12), 923–927. [https://doi.org/10.1016/0360-3199\(92\)90052-X](https://doi.org/10.1016/0360-3199(92)90052-X)
- Vilela, R., Saia, F. T., Gregoracci, G. B., Duarte, R., Andrade, P., van der Zaan, B., Langenhoff, A., & Damianovic, M. H. R. Z. (2019). Hydrogen production in reactors: The influence of organic loading rate, inoculum and support material. *International Journal of Hydrogen Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.08.180>
- Wang, J., & Wan, W. (2009). Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. In *International Journal of Hydrogen Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.11.015>
- Wang, W., Xie, L., Luo, G., & Zhou, Q. (2013). Enhanced fermentative hydrogen production from cassava stillage by co-digestion: The effects of different co-substrates. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(17), 6980–6988.
- Won, S. G., & Lau, A. K. (2011). Effects of key operational parameters on biohydrogen production via anaerobic fermentation in a sequencing batch reactor. *Bioresource Technology*.
- Yang, H., Shao, P., Lu, T., Shen, J., Wang, D., Xu, Z., & Yuan, X. (2006). Continuous biohydrogen production from citric acid wastewater via facultative anaerobic bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31(10), 1306–1313.
- Yentekakis, I. V., & Goula, G. (2017). Biogas management: Advanced utilization for production of renewable energy and added-value chemicals. *Frontiers in*

Environmental Science, 5(FEB).

- Yu, H., Zhu, Z., Hu, W., & Zhang, H. (2002). Hydrogen production from rice winery wastewater in an upflow anaerobic reactor by using mixed anaerobic cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27(11–12), 1359–1365.
- Zidwick, M. J., Chen, J.-S., & Rogers, P. (2013). Organic Acid and Solvent Production: Propionic and Butyric Acids and Ethanol. In E. Rosenberg, E. F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, & F. Thompson (Eds.), *The Prokaryotes* (pp. 135–167). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-31331-8_385