UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AGRÍCOLA

PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO A PARTIR DE ÁGUA RESIDUÁRIA DE INDÚSTRIA DE FÉCULA DE MANDIOCA

CRISTIANE LURDES ANDREANI

Cascavel, dezembro de 2012.

CRISTIANE LURDES ANDREANI

PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO A PARTIR DE ÁGUA RESIDUÁRIA DE INDÚSTRIA DE FÉCULA DE MANDIOCA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Agrícola em cumprimento parcial aos requisitos para à obtenção do título de Mestre em Engenharia Agrícola, área de concentração em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental.

Orientadora: Profa. Dra. Simone Damasceno Gomes Coorientadora: Profa. Dra. Karina Querne de Carvalho

CASCAVEL – Paraná – Brasil Dezembro – 2012

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP) Biblioteca Central do Campus de Cascavel – Unioeste Ficha catalográfica elaborada por Jeanine da Silva Barros CRB-9/1362

Γ

A574p	Andreani, Cristiane Lurdes Produção de hidrogênio a partir de água residuária de indústria de fécula de mandioca. / Cristiane Lurdes Andreani — Cascavel, PR: UNIOESTE, 2012. 54f. ;30 cm.
	Orientadora: Profa. Dra.Simone Damasceno Gomes Co-orientadora: Profa. Dra.Karina Querne de Carvalho Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Programa de Pós-Graduação <i>Stricto Sensu</i> em Engenharia Agrícola, Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas. Bibliografia.
	1. Reatores de leito fixo. 2. Resíduos agroindustriais. 3. Processos fermentativos I. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. II. Título.
	CDD 21. ed.633.68

Revisado por Dhandara Soares de Lima em 25 de março de 2013.

PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO A PARTIR DE ÁGUA RESIDUÁRIA DE INDÚSTRIA DE FÉCULA DE MANDIOCA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Agrícola, área de concentração Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental, apresentado à seguinte banca examinadora:

> Profa. Dra. **SIMONE DAMASCENO GOMES** (Orientadora) Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, UNIOESTE

Prof. Dr. **AJADIR FAZOLO** Universidade Tecnológica Federal do Paraná, UTFPR

Profa. Dra. **SÍLVIA RENATA MACHADO COELHO** Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, UNIOESTE

Cascavel, dezembro de 2012.

BIOGRAFIA

Cristiane Lurdes Andreani, filha de Izidoro e Lurdes Andreani, nasceu em Corbélia – PR, em maio de 1981. Em 2002 iniciou o Curso de Ciências Biológicas (Licenciatura) na Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Unioeste, diplomando-se em março de 2006.

Neste mesmo ano atuou como professora na Rede Estadual de Ensino do Estado do Paraná.

Em 2009 iniciou o curso de especialização *lato sensu* em Educação e Gestão Ambiental pelo Instituto de Estudos Avançados e Pós-Graduação, concluindo-o no mesmo ano.

Em 2011 ingressou no curso de mestrado *stricto sensu* do Programa de Pós-Graduação de Engenharia Agrícola da Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

"All of these lines across my face Tell you the story of who I am So many stories of where I've been And how I got to where I am..."

(Brandi Carlile)

"Nada na vida deve ser temido, somente compreendido. Agora é hora de compreender mais, para temer menos."

(Marie Curie)

Aos meus pais, Lurdes e Izidoro, pelo amor incondicional, pelo apoio, pelo incentivo, por sonharem esse sonho comigo...

AGRADECIMENTOS

A Deus: "Tudo posso naquele que me fortalece", FI.4,13.

Aos meus pais, pelo amor, educação, incentivo e, sobretudo, pelo exemplo de dedicação e honestidade.

À minha irmã Carmem, por todo amor e pela sua insistência em me fazer tomar gosto pela leitura.

Ao meu namorado Diogo, por estar ao meu lado em todos os momentos e me fazer acreditar que era possível.

À Flávia e Elisangela, minhas eternas amigas e grande incentivadoras.

Aos meus grandes amigos do mestrado: Bruna, Carla, Davi, Darlisson, Graziela e Rafaela, a vida fica mais fácil com vocês por perto! Quero vocês por perto sempre!

Ao incansável companheiro de pesquisa Douglas Torres, pela dedicação, o entusiasmo e a persistência. Douglas, finalmente a sexta-feira chegou!

Aos alunos da graduação Henrique e Leonardo, pela dedicação e a amizade.

Aos meus colegas do Laboratório de Reatores Biológicos: Denise, Jefferson, Larissa, Shaiane e Tati.

À minha orientadora Profa. Dra. Simone D. Gomes, pela dedicação, o carinho, a confiança e a amizade.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Karina Q. de Carvalho, pelo carinho, a disponibilidade e a dedicação.

À Profa. Dra. Sílvia R. M. Coelho, pela dedicação, o carinho e a amizade, e pela incansável orientação nas análises cromatográficas.

À Dra. Gizelle Bedendo, pela valiosa ajuda na instrumentação do cromatógrafo gasoso.

Aos nossos técnicos Edison B. Cunha, Euro Kailer e Julinha, por toda ajuda e a dedicação.

À E9 Recicladora de Plásticos.

À Zadimel Indústria e Comércio.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste projeto.

PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO A PARTIR DE ÁGUA RESIDUÁRIA DE INDÚSTRIA DE FÉCULA DE MANDIOCA

RESUMO

Buscando aliar o tratamento de resíduos à produção de energia limpa e renovável, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a produção biológica de hidrogênio a partir da água residuária da indústria de fécula de mandioca, resíduo líquido de elevada carga orgânica, gerado durante os processos de extração e purificação do amido. O experimento foi realizado em dois reatores anaeróbios de leito fixo e fluxo ascendente. Como meio suporte foram utilizadas hastes de bambu e aparas de polietileno de baixa densidade. Confeccionados em pexiglass, cada reator foi construído com 75 cm de altura, o volume útil calculado foi de 2,96 L para o reator com suporte de bambu e 3,13 L para o reator com suporte de polietileno. O inóculo, coletado em um reator anaeróbio piloto, recebeu pré-tratamento térmico e foi recirculado nos reatores por 48 h. Em seguida, iniciou-se a alimentação em modo contínuo. O sistema foi operado com tempo de detenção hidráulica (TDH) de 4 e 3 h, a 36 °C e pH inicial 6,0. No TDH de 4 h foram aplicadas 3 cargas orgânicas volumétricas (COV) de 28; 15 e 26 g.L⁻¹.d⁻¹; no TDH de 3 h foram aplicadas 4 COV de 35; 22; 22 e 27 g.L⁻¹.d⁻¹. A aplicação das COV não seguiu a um padrão devido à variabilidade na constituição da água residuária. Dessa forma, foram avaliados os efeitos do TDH, da COV e do suporte sobre a produção fermentativa de hidrogênio e também a influência do bambu e do polietileno de baixa densidade na fixação e seleção dos microorganismos produtores de hidrogênio. A produção máxima de hidrogênio no reator com bambu foi de 2,9 L.d⁻¹ em TDH 4 h e de 2,2 L.d⁻¹ no reator com polietileno em TDH de 3 h. Foram alcançados percentuais de hidrogênio no biogás de 25% no reator com bambu e 29% o reator com polietileno. O rendimento obtido foi de 0,6 L H₂.g⁻¹açúcar no reator com bambu em TDH 4 h e 0,8 L H₂.g⁻¹açúcar no reator com polietileno em TDH 3 h. Em ambos os reatores a degradação média de acúcares totais foi de aproximadamente 90%.

Palavras-chave: reatores de leito fixo, resíduos agroindustriais, processos fermentativos.

HYDROGEN PRODUCTION FROM CASSAVA WASTEWATER TREATMENT INDUSTRY

ABSTRACT

Attempting to associate waste treatment to the production of clean and renewable energy, the present research aimed to evaluate the biological production of hydrogen using wastewater from the manioc starch treatment industry, a liquid wastewater of high organic content, generated during the processes of extraction and purification of manioc starch. The experiment was carried out in two upflow fixed-bed anaerobic reactors. As support, bamboo stems and low density polyethylene scraps. Made with pexiglass, each reactor was built with 75 cm of height, with 2.96 L of useful volume for the reactor with bamboo support and 3.13 L for the one with Polyethylene support. The inoculum, collected in a pilot anaerobic reactor, received thermal pretreatment and was recirculated in the reactors for 48 h. Then, alimentation was initiated in a continuum manner. The system was operated with hydraulic detention time (TDH) of 4 and 3 h, at 36 °C and initial pH of 6.0. In the TDH of 4 h, 3 organic loading rates were applied (COV), of 28; 15 and 26 g.L⁻¹.d⁻¹; in the TDH of 3 h 4 \acute{COV} were applied, of 35; 22; 22 and 27 g.L⁻¹.d⁻¹. The application of the COV did not follow any particular pattern due to the variability of the wastewater constitution. Hence, the effects of TDH, COV and the support mean on the production of hydrogen were evaluated, as well as the influence of bamboo and of low density polyethylene in the fixation and selection of microorganisms that produce hydrogen. Maximum hydrogen production in the reactor using bamboo was of 2.9 L.d⁻¹ in TDH 4h and of 2.2 L.d⁻¹ in the reactor using polyethylene in TDH of 3 h. Hydrogen percentage of 25% in biogas was reached in the reactor using bamboo and of 29% in the reactor using polyethylene. The yielding obtained was of 0.6 L H₂.g⁻¹sugar in the reactor using bamboo in TDH 4 h and of 0.8 L H_2 .g⁻¹sugar in the reactor using polyethylene in TDH 3 h. In both reactors, the mean total sugar removal was of approximately 90%.

Key-words: Fixed-bed reactors, agroindustrial waste, fermentation process.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
1 INTRODUÇÃO	01
2 OBJETIVOS	03
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	03
3 REVISÃO BILIOGRÁFICA	04
3.1 Hidrogênio como fonte de energia	04
3.2 Produção biológica de hidrogênio	05
3.2.1 Princípios da digestão anaeróbia	05
3.3 Produção fermentativa de hidrogênio	06
3.4 Fatores que influenciam o processo fermentativo	08
3.4.1 Configuração do reator	08
3.4.2 Meio suporte	09
3.4.3 Enriquecimento do inóculo	10
3.4.4 Ácidos graxos voláteis	11
3.4.5 pH	13
3.4.6 Temperatura	14
3.4.7 Tempo de detenção hidráulica	15
3.4.8 Substrato	16
3.4.9 Desafios para a produção biológica de hidrogênio	17
4 MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1 Procedimentos experimentais	19
4.2 Reatores anaeróbios de leito fixo	19
4.3 Material suporte	20
4.4 Inóculo	21
4.5 Caracterização da água residuária da indústria de fécula de mandioca	22
4.6 Partida e operação dos reatores	23
4.7 Métodos analíticos	24
4.7.1 Determinação dos açúcares totais	24
4.7.2 Determinação do pH	25
4.7.3 Determinação da demanda química de oxigênio (DQO)	25
4.7.4 Determinação dos sólidos totais (ST) e sólidos suspensos totais (SST)	25

4.7.5 Determinação do nitrogênio total	25
4.7.6 Determinação dos ácidos graxos voláteis	25
4.7.7 Determinação do gás	26
4.7.7.1 Determinação da vazão de biogás	26
4.7.7.2 Determinação da concentração do gás hidrogênio	27
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1 Degradação de carboidratos	29
5.2 Variação do pH efluente	30
5.3 Geração de ácidos graxos voláteis (AGV)	31
5.4 Remoção da demanda química de oxigênio (DQO)	35
5.5 Concentração de sólidos suspensos voláteis (SSV) no efluente	36
5.6 Produção de hidrogênio	38
5.6.1 Percentual médio de hidrogênio no biogás	38
5.6.2 Produção de hidrogênio por açúcares totais consumidos	39
5.6.3 Produção de biogás e hidrogênio	40
6 CONCLUSÕES	44
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	45
8 REFERÊNCIAS	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -Composição da água residuária de indústria de fécula de mandioca 17
Tabela 2 - Caracterização do inóculo após pré-tratamento térmico 22
Tabela 3 - Caracterização da água residuária de fecularia utilizada na alimentação dosreatores22
Tabela 4 – Condições operacionais e concentração da carga orgânica volumétrica aplicada aos reatores com bambu e polietileno de baixa densidade durante o período experimental.23
Tabela 5 – Parâmetros avaliados e frequência de coleta das amostras
Tabela 6 - Concentração média de ácidos graxos voláteis por carga orgânica volumétricaaplicada ao reator RB32
Tabela 7 - Concentração média de ácidos graxos voláteis por carga orgânica volumétricaaplicada ao reator RP32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema da digestão anaeróbia adaptado de Gujer e Zehnder (1983), citado por Aquino e Chernicharo
Figura 2 - Reatores anaeróbios de leito fixo e fluxo ascendente, com dimensões em centímetros
Figura 3 - Hastes de bambu (a) e aparas de polietileno de baixa densidade (b) utilizados como suporte na fixação da biomassa
Figura 4 - Disposição dos suportes de bambu (a) e polietileno de baixa densidade (b) nos reatores de leito fixo e fluxo ascendente
Figura 5 - Inóculo em peças de bambu usadas como meio suporte de reator anaeróbio de leito fixo (a) e inóculo submetido ao tratamento térmico (b)
Figura 6 - Cromatograma típico de ácidos graxos voláteis determinados por CLAE, com detector UV e arranjo de diodos. Os ácidos lático (5.814), acético (6.968), propiônico (11.636) e butírico (15.519) estão identificados de acordo com o tempo de retenção
Figura 7 – Cromatograma obtido através da injeção de 50 µL de padrão de gás hidrogênio em coluna Carboxen [®] 1010 Plot, com detector de condutividade térmica
Figura 8 - Percentual de degradação de açúcares em função da carga orgânica volumétrica aplicada para os reatores RB e RP
Figura 9 - Variação do pH efluente para os reatores RB e RP em função da carga orgânica volumétrica aplicada
Figura 10 - Distribuição percentual média dos ácidos graxos voláteis para o reator RB em função da carga orgânica volumétrica aplicada
Figura 11 - Distribuição percentual média dos ácidos graxos voláteis para o reator RP em função da carga orgânica volumétrica aplicada
Figura 12 - Remoção média de DQO para os reatores RB e RP em função da carga orgânica volumétrica aplicada
Figura 13 - Concentração de SSV no efluente dos reatores RB e RP em função da carga orgânica volumétrica aplicada
Figura 14 - Percentual médio de H ₂ no biogás em função da carga orgânica volumétrica aplicada para os reatores RB e RP
Figura 15 - Produção média de biogás e de H ₂ por açúcar total consumido em função da carga orgânica volumétrica aplicada para os reatores RB e RP
Figura 16 - Vazões médias de biogás e de H ₂ em função da carga orgânica volumétrica aplicada para o reator RB
Figura 17 - Vazões médias de biogás e de H ₂ em função da carga orgânica volumétrica aplicada para o reator RP

LISTA DE ABREVIATURAS

AR - Argônio

- AGV Ácidos graxos voláteis (M.L⁻¹)
- CG Cromatografia gasosa
- CLAE Cromatografia líquida de alta eficiência
- CNTP Condições normais de temperatura e pressão
- **COV** Carga orgânica volumétrica (M.L⁻¹)
- **DQO** Demanda química de oxigênio (M.L⁻¹)
- **HAc** Ácido acético (M.L⁻¹)
- **HBu** Ácido butírico (M.L⁻¹)

HLa - Ácido lático (M.L⁻¹)

- HPr Ácido propiônico (M.L⁻¹)
- K Kelvin
- N Newton
- NTK Nitrogênio total Kjeldahl (M.L⁻¹)
- Pa- Pascal
- SF Sólidos Fixos (M.L⁻¹)
- **SF** Sólidos Suspensos Fixos (M.L⁻¹)
- SST Sólidos Suspensos Totais (M.L⁻¹)
- SSV Sólidos Suspensos Voláteis (M.L⁻¹)
- **ST** Sólidos Totais (M.L⁻¹)
- SV Sólidos Voláteis (M.L⁻¹)
- TCD Detector de condutividade térmica
- TDH Tempo de Detenção Hidráulica (H)

1 INTRODUÇÃO

Cultivada em todas as regiões brasileiras, a mandioca desempenha papel importante na alimentação humana e animal, como matéria-prima para diversos produtos industriais e na geração de emprego e renda (SOUZA; FIALHO, 2003). Segundo dados da Estatística da Produção Agrícola realizada pelo IBGE, somente no ano de 2011 a produção brasileira de mandioca foi estimada em mais de 26 mil toneladas (IBGE, 2011). A região Sul destaca-se como produtora de raiz e fécula, sendo o estado do Paraná seu maior produtor e processador (GROXKO, 2010). Em 2010, das 542 mil toneladas de fécula produzidas no Brasil, cerca de 75% foram produzidas no estado do Paraná (CEPEA, 2011).

O processo de extração e purificação da fécula está vinculado à geração de grande volume de resíduos líquidos, provenientes das operações de lavagem das raízes e da extração da fécula. São, em média, 2,63 m³. t⁻¹ raiz de água de lavagem e 3,68 m³.t⁻¹ raiz de água da extração de fécula (CEREDA, 2001). De acordo com Colin *et al.* (2006), em média 1,1 L de resíduo é gerado por Kg de raiz processada.

O resíduo líquido de fecularia possui carga orgânica elevada e pode variar em função do processo empregado pela indústria. Na literatura, os valores de DQO variam de 8000 mg.L⁻¹ (RAJASIMANN; KARTHIKEYAN, 2007) a 12000 mg.L⁻¹ (WATTHIER, 2011). Aliado ao elevado conteúdo orgânico, o resíduo é potencialmente tóxico devido à presença do glicosídeo cianogênico linamarina, encontrado em concentrações que variam de 86 mg.L⁻¹ (KAEWKANNETRA; CHIWES; CHIU, 2011) a 140 mg.L⁻¹ (BARANA, 2001). Normalmente, as fecularias concentram-se em áreas específicas, próximas a rios e córregos e tornam-se poluidoras potenciais quando o descarte de seus resíduos ocorre sem o tratamento adequado, causando grandes prejuízos ao ambiente (BARANA, 2000; ALMEIDA; BUENO; DEL BIANCHI, 2010).

Materiais orgânicos são substratos potenciais para geração de biohidrogênio, devido a sua disponibilidade, abundância, baixo custo e alta biodegradabilidade (GUO et al., 2011). O hidrogênio é um substituto promissor na linha de evolução dos combustíveis, uma vez que traz benefícios técnicos, ambientais e socioeconômicos (DAS; VEZIROGLU, 2008). Nesse contexto, a aplicação da água residuária do processamento de mandioca como substrato para produção de hidrogênio é vantajosa, pois adiciona valor a um resíduo potencialmente poluidor através de seu uso como fonte de energia (CAPPELLETTI et al., 2011).

Diversos autores têm utilizado amido como substrato nos processos fermentativos para geração de biohidrogênio (O-THONG et al., 2011; SREETHAWONG et al., 2010; LUO et al., 2010; AKUTSU et al., 2009; AROOJ et al., 2008; LIN; CHANG; HUNG, 2008; LEE et al., 2008). No entanto, ainda são poucos os trabalhos que têm investigado a produção de biohidrogênio a partir de substratos renováveis, como resíduos (LUO et al., 2010).

Dessa forma, esse trabalho tem como principal objetivo avaliar o desempenho de reatores de leito fixo e fluxo ascendente na digestão anaeróbia do efluente líquido de indústria de fécula de mandioca, tendo em vista a produção biológica de hidrogênio.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o desempenho de reatores de leito fixo e fluxo ascendente na digestão anaeróbia de efluente de fecularia, visando à produção de hidrogênio.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o desempenho do bambu e do polietileno de baixa densidade como meio suporte dos reatores durante a produção biológica de hidrogênio;
- Avaliar o efeito do TDHsobre a produção volumétrica, o rendimento em função do consumo de açúcares e o percentual de hidrogênio no biogás;
- Avaliar a influência das cargas orgânicas sobre a produção volumétrica, o rendimento em função do consumo de açúcares e o percentual de hidrogênio no biogás;
- Quantificar os ácidos graxos voláteis produzidos durante o processo fermentativo, relacionando seus efeitos à produção de hidrogênio.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Hidrogênio como fonte de energia

Os padrões atuais de consumo energético são baseados nas fontes fósseis, o que gera emissões de poluentes locais, gases de efeito estufa e põe em risco o suprimento de longo prazo do planeta (GOLDEMBERG; LUCON, 2007). Um sistema de geração de energia eficiente e renovável permitirá reverter as tendências de aumento da emissão de gases de efeito estufa, pelo qual o uso de combustíveis fósseis é o principal responsável (LUCON; GOLDEMBERG, 2009).

Nas últimas décadas, as pesquisas têm focado principalmente a produção de bioetanol e biodiesel. A primeira geração desses biocombustíveis foi produzida a partir das culturas de milho, cana-de-açúcar e óleo de palma. Nessa perspectiva, uma segunda geração de biocombustíveis que utilize fontes alternativas é essencial para a geração de energias renováveis (GUO et al., 2010).

O hidrogênio é uma alternativa energética promissora e tem recebido a atenção do mundo nos últimos anos (WANG; WAN, 2009). É um combustível limpo, facilmente utilizável em células combustíveis para a geração de eletricidade e que pode proporcionar rendimento energético 2,75 vezes superior ao dos hidrocarbonetos (KAPDAN; KARGI, 2006). A demanda pelo hidrogênio não se limita ao uso como fonte de energia, pois o gás é largamente utilizado na produção de fertilizantes, hidrogenação de óleos e gorduras, tratamento do aço, refinarias de petróleo e na síntese industrial da amônia (KAPDAN; KARGI, 2006).

Atualmente, o hidrogênio pode ser obtido de fontes fósseis como gás natural e carvão. No entanto, esses combustíveis são esgotáveis e emitem gases de efeito estufa durante o processo de produção. Portanto, por razões ambientais e econômicas, deve-se buscar processos alternativos com o propósito de implantar políticas econômicas baseadas em fontes de energia limpa, como o hidrogênio (BARTELS; PATE; OLSON, 2010).

Os processos biológicos para produção de hidrogênio são catalisados por microorganismos em meio aquoso, à temperatura e à pressão ambiente (DAS; VEZIROGLU, 2008). A biofotólise direta pelas algas verdes, a biofotólise indireta pelas cianobactérias, a fotofermentação pelas bactérias fotossintéticas e a fermentação por bactérias anaeróbias estritas ou facultativas são exemplos de processos promissores para produção de biohidrogênio (GUO et al., 2010). A produção fermentativa de hidrogênio é caracterizada por elevadas taxas de produção e fácil operação, quando comparada a outros processos para obtenção do gás, sendo largamente utilizada (WANG; WAN, 2009). O uso do hidrogênio como fonte de energia está vinculado ao estabelecimento de uma matriz sólida de geração, que seja capaz de produzir grandes quantidades de gás. Aliado ao uso de substratos adequados e renováveis o estabelecimento de um consórcio microbiano adaptado está entre os principais fatores que limitam a produção de biohidrogênio em grande escala (DAS; VEZIROGLU, 2008). Assim, a otimização dos parâmetros operacionais é a condição chave para se obter uma produção efetiva de hidrogênio (GUO et al., 2010).

3.2 Produção biológica de hidrogênio

3.2.1 Princípios da digestão anaeróbia

Comparado aos métodos aeróbios convencionais, o tratamento anaeróbio oferece benefícios, uma vez que os reatores são tecnicamente simples, relativamente baratos e demandam baixo custo energético. O sistema proporciona a aplicação de cargas orgânicas elevadas e possibilita a recuperação do biogás como fonte de energia (LETTINGA et al., 1981).

A digestão anaeróbia envolve processos complexos e ocorre em etapas que dependem da atividade de três grupos de micro-organismos: as bactérias fermentativas (ou acidogênicas), as bactérias sintróficas (ou acetogênicas) e as arqueias metanogênicas (AQUINO; CHERNICHARO, 2005). Primeiramente, a matéria orgânica complexa é convertida em compostos mais simples por um grupo de bactérias anaeróbias ou facultativas (acidogênicas). O produto final dessa fase são açúcares livres, alcoóis, ácidos voláteis, hidrogênio e dióxido de carbono. A fase intermediária do processo é caracterizada pela conversão de alcoóis e ácidos graxos voláteis em acetato pelas bactérias acetogênicas. Durante a última etapa, um grupo especial de bactérias anaeróbias estritas (arqueias metanogênicas) gera metano a partir do acetato e do hidrogênio produzidos na fase anterior, promovendo a estabilização da matéria orgânica (MCCARTY, 1964; SPEECE, 1983).





As bactérias redutoras de sulfato, as produtoras de metano e as homoacetogênicas são responsáveis por interferir direta e indiretamente na produção de bio-hidrogênio. Em condições anaeróbias, as arqueias metanogênicas são consideradas como principais microorganismos consumidores de hidrogênio; dentre as opções para inibir a metanogênese, estão a aplicação de compostos químicos, baixo pH, tratamento térmico do inóculo e baixos tempos de detenção hidráulica (GUO et al., 2010).

3.3 Produção fermentativa de hidrogênio

Várias rotas biológicas podem ser usadas na produção de hidrogênio, tais como a biofotólise, a fotofermentação e a fermentação (MOHAN, 2009). Dentre elas, a fermentação é considerada como método mais prático e viável para geração de hidrogênio (DAS; KHANNA; VEZIROGLU, 2008).

A fermentação anaeróbia possibilita a produção de hidrogênio através de processos relativamente simples, com um amplo espectro de substratos potencialmente utilizáveis (DAS; VERIZOGLU, 2008). Carboidratos, principalmente glicose, são substratos preferenciais na produção fermentativa de hidrogênio, além de amido, celulose, bem como resíduos orgânicos (VARDAR-SCHARA; MAEDA; WOOD, 2008).

A fermentação compreende dois processos, hidrólise e acidogênese, levando à formação de hidrogênio, dióxido de carbono e de alguns compostos orgânicos simples, tais como ácidos graxos voláteis e alcoóis (BARTACEK; ZABRANSKA; LENS, 2007). Em condições anaeróbias, micro-organismos fermentativos não dispõem de um aceptor final de elétrons, o substrato orgânico é utilizado como aceptor e doador de elétrons, ou seja, ao

mesmo tempo uma parte do composto orgânico é oxidada, enquanto a outra parte é reduzida (AQUINO; CHERNICHARO, 2005).

Uma estratégia para dispor os equivalentes redutores, resultantes do metabolismo primário, ocorre através da redução de prótons a hidrogênio. A oxidação de substratos orgânicos para produção de energia gera elétrons que precisam ser dispostos para manter a neutralidade elétrica celular. Em condições anaeróbias e anóxicas, prótons atuam como aceptores desses elétrons, sendo reduzidos a hidrogênio molecular pela ação das hidrogenases (VRIJE; CLAASSEN, 2003; HALLENBECK, 2009).

As hidrogenases são enzimas intracelulares ligadas diretamente ao metabolismo fermentativo. Elas catalisam uma reação redox muito simples, que converte o hidrogênio em dois prótons e dois elétrons: $2H^+ + 2e^{-\leftrightarrow} H_2$ (ADAM; MORTENSON; CHEN, 1981; SCONIECZNY; YARGEAU, 2009; CHONG et al., 2009). Essas enzimas são agrupadas em duas famílias principais, de acordo com o metal existente em seu centro de ativação. As [FeFe]-hidrogenase contêm somente ferro, as [NiFe]-hidrogenase e [Ni-Fe-Se]-hidrogenase contém níquel, ferro e, algumas vezes, selênio (SÁ et al., 2011).

*Clostridium*sp. e*Enterobacter* sp. são espécies largamente utilizadas na produção fermentativa de hidrogênio (VARDAR-SCHARA; MAEDA; WOOD, 2008; SINHA; PANDEY, 2011). Bactérias do gênero *Clostridium*sp. são anaeróbias estritas, frequentemente encontradas em consórcios microbianos e consideradas efetivas produtoras de hidrogênio em substratos orgânicos, especialmente carboidratos.

As espécies de *Clostridium* utilizam diferentes vias metabólicas na geração de hidrogênio e são capazes de modificar seu metabolismo de acordo com as condições ambientais. Na etapa da acidogênese são produzidos principalmente acetato e butirato, e durante a solventogênese são gerados acetona e etanol (VASQUEZ; VARALDO, 2009).

Bactérias do gênero *Enterobacters*p. são anaeróbias facultativas e sobrevivem na presença de pequenas quantidades de oxigênio no meio, o que contribui para a manutenção da condição de anaerobiose nos reatores (KAPDAN; KARGI, 2006; BAGHCHEHSARAEE et al., 2010).

No processo fermentativo para a produção de hidrogênio, a glicose é inicialmente convertida a piruvato através da via glicolítica (DAS; VEZIROGLU, 2008). O piruvato é o intermediário chave das principais vias metabólicas na fermentação. No caso de microorganismos anaeróbios estritos, como *Clostridium*sp., o piruvato é convertido a acetil CoA e CO₂, produzindo ferrodoxina reduzida. Por sua vez, a redução da ferrodoxina transfere elétrons a [FeFe]-hidrogenase, garantindo a produção de 2 mols de hidrogênio por mol de glicose consumida. Adicionalmente, 2 mols de hidrogênio podem ser produzidos a partir do NADH gerado durante a glicólise pela ação da ferrodoxina oxidorredutase, resultando em rendimento máximo teórico de 4 mols de hidrogênio por mol de glicose (HALLENBECK, 2009; VARDAR-SCHARA; MAEDA; WOOD, 2008). Na prática, os rendimentos são menores, uma vez que a oxidação de NADH pela ferrodoxina oxidorredutase normalmente é inibida em condições normais, sendo o rendimento teórico alcançado em pressões parciais de hidrogênio muito baixas, menores que 60 Pa (VARDAR-SCHARA; MAEDA; WOOD, 2008). Além disso, alguns carboidratos que podem ser convertidos em células microbianas e produtos finais, como ácido butírico, podem ser formados ao invés do ácido acético, o que causa diminuição no rendimento teórico (HAWKES et al., 2007).

3.4 Fatores que influenciam o processo fermentativo

A produção fermentativa de hidrogênio é um processo complexo que depende do controle de fatores como enriquecimento do inóculo, composição do substrato, tipo de reator, seleção do meio suporte, balanço de nutrientes, temperatura e pH. Eles são garantia de estabilidade e de máxima produção de hidrogênio (WANG; WAN, 2009; SHIDA, 2008).

3.4.1 Configuração do reator

Reatores de alta taxa são capazes de reter grandes quantidades de biomassa em flocos, filmes ou grânulos, permitindo baixos tempos de detenção hidráulica e diminuindo a perda de micro-organismos no efluente o que representa melhores resultados em operações contínuas (HAWKES et al., 2007; PEIXOTO, 2008).

De acordo com Barros *et al.* (2010), reatores como os de leito fixo, leito fluidificado e manta de lodo tem eficiências superiores pela sua capacidade de reter grandes quantidades de biomassa. Essa característica proporciona maior produção volumétrica de hidrogênio (HAWKES et al., 2007).

Para avaliar a produção de hidrogênio a partir de água residuária semi-sintética com e sem suplementação de nutrientes (uréia, minerais e metais traço), Peixoto *et al.* (2010) utilizaram dois reatores anaeróbios de leito fixo e fluxo ascendente tendo como meio suporte aparas de Polietileno. Os autores observaram rendimento superior no reator que não recebeu a adição de nutrientes (3,5 mol H₂mol⁻¹ sacarose). A diferença entre a eficiência dos reatores foi atribuída à diminuição da porosidade do leito, resultado do crescimento celular no reator que recebeu substrato suplementado (rendimento de 3,3 mol H₂mol⁻¹ sacarose). A eficiência na produção de hidrogênio é favorecida tanto pela imobilização da biomassa em leitos fixos quanto pela porosidade dos mesmos (PEIXOTO, 2008).

Jo *et al.* (2008) avaliaram a produção de hidrogênio em um reator de leito fixo, tendo espuma de poliuretano como meio suporte. Os autores obtiveram a máxima taxa de produção de hidrogênio de 7,2 L H₂ L⁻¹ d⁻¹, 50% de H₂ no biogás e eficiência de conversão de substrato de 97,4% no TDH de 2 h. A lavagem celular não foi observada até o TDH de 1

h, indicando que o meio de imobilização do reator foi estável e capaz de manter elevadas concentrações celulares. Em reatores de mistura completa, os autores verificaram que baixos TDHs (<1 h) provocaram lavagem do reator na ausência de imobilização celular.

Leite *et al.* (2008) estudaram a produção de hidrogênio e ácidos orgânicos em um reator anaeróbio com meio suporte de argila expandida a partir de resíduo sintético e obtiveram produções médias de 2,48, 2,15 e 1,81molH₂.mol_{glicose}⁻¹ para um efluente com concentrações de 0, 1000 e 2000 mg.L⁻¹ de NaHCO₃. Segundo os autores, o regime de operação, material suporte e controle da alcalinidade foram efetivos na seleção e na imobilização dos micro-organismos no biofilme, favorecendo a produção de ácidos orgânicos e hidrogênio.

3.4.2 Meio suporte

A imobilização de células é uma técnica largamente utilizada em reatores anaeróbios quando se pretende aumentar a concentração de biomassa e o tempo de retenção celular, contribuindo para a minimização do arraste de sólidos no efluente (SILVA et al., 2006). A escolha do material suporte pode ser um fator determinante na seleção de micro-organismos, e diferentes suportes podem ser empregados em aplicações específicas (SILVA et al., 2006).

Reatores com crescimento bacteriano aderido em leito fixo são caracterizados pela presença de um material de empacotamento estacionário, onde os sólidos podem se aderir ou ficar retidos nos interstícios. Dentre as características desejáveis na escolha do meio suporte estão: a resistência estrutural, a capacidade de ser quimicamente inerte, apresentar grande área específica, porosidade elevada e preço reduzido (CHERNICHARO, 2007).

O suporte atua como um mecanismo separador de gases e sólidos, promovendo o fluxo uniforme ao longo do reator e o contato entre água residuária e a biomassa aderida (YOUNG, 1991). Devido ao aumento no tempo de retenção celular, sistemas com leitos fixos estruturados aumentam a resistência do reator a choques de carga, à presença de compostos inibitórios e às mudanças na composição do substrato (SÁNCHEZ; WEILAND; TRAVIESO, 1994).

Desvantagens como obstrução ou fixação de micro-organismos indesejáveis podem ser solucionadas através do uso de material adequado e da estruturação da matriz de imobilização, de forma a manter a porosidade do leito (PEIXOTO et al., 2010).

Diversos materiais têm sido testados como meio suporte na produção fermentativa de hidrogênio, tais como argila expandida (SHIDA et al., 2009), poliestireno (BARROS et al., 2010), espuma de poliuretano (JO et al., 2008), carvão vegetal, cerâmica (SILVA et al., 2006), polietileno de baixa densidade (PEIXOTO et al., 2010), lascas de pedra (BABU; MOHAN; SARMA, 2009), dentre outros.

Barros *et al.* (2010) compararam a eficácia de argila e poliestireno na produção fermentativa de hidrogênio em um reator anaeróbio de leito fluidificado alimentado com água residuária sintética. Com TDH de 2 h, os autores obtiveram 1,90 mol H₂.mol⁻¹ glicose para o reator com suporte de poliestireno e 2,59 mol H₂.mol⁻¹glicose para o de argila expandida. O desempenho alcançado pelos reatores deve-se à quantidade de biomassa aderida ao meio suporte, resultando em altos níveis de rendimento na produção de hidrogênio.

Avaliando a eficácia de quatro suportes na fixação de micro-organismos, Silva *et al.* (2006) observaram que o polietileno de baixa densidade foi colonizado principalmente por bactérias hidrolíticas, fermentativas e não redutoras de sulfato. Dessa forma, esse meio suporte pode ser usado como meio seletivo na produção fermentativa de hidrogênio, uma vez que não favorece a fixação de bactérias redutoras de sulfato e de arqueias metanogênicas.

3.4.3 Enriquecimento do inóculo

Micro-organismos com capacidade de produzir hidrogênio existem no solo, em águas residuárias, lodo, composto entre outras fontes. Esses materiais podem ser usados como fontes potenciais de inóculo para produção fermentativa de hidrogênio. O uso de microflora mista é mais viável por que simplifica a operação e o controle do sistema. Em culturas mistas, organismos produtores e consumidores de hidrogênio coexistem; no entanto, quando esse inóculo é submetido a condições ambientais extremas, produtores de hidrogênio têm mais condições de sobreviver (SINHA; PANDEY, 2011).

Para assegurar a produção de hidrogênio e de ácidos orgânicos, é necessário que o sistema contenha essencialmente organismos produtores de hidrogênio. A produção de hidrogênio, CO₂ e ácidos orgânicos ocorre durante uma fase intermediária da digestão anaeróbia; dessa forma, sua interrupção garante que os produtos intermediários não sejam consumidos na etapa posterior (SHIDA, 2008).

As diferenças fisiológicas entre micro-organismos produtores (acidogênicas) e consumidores de hidrogênio (arqueias metanogênicas) servem de base para os diferentes métodos de enriquecimento. Bactérias acidogênicas, como as do gênero *Clostridium*, podem formar esporos de resistência quando submetidas a condições ambientais desfavoráveis, como altas temperaturas, acidez ou alcalinidade extremas. Essas bactérias crescem em amplas faixas de pH e de forma mais rápida do que as arqueias metanogênicas (ZHU; BÉLAND, 2006).

Várias formas de pré-tratamento têm sido empregadas no enriquecimento de inóculos, dentre elas, o tratamento térmico (BAGHCHEHSARAEE et al., 2008), ácido e alcalino (MU; YU; WANG et al., 2007) por inibidores químicos como ácido 2-bromoetanosulfônico, iodopropano (ZHU; BÉLAND, 2006) e clorofórmio (WANG; WAN,

2008a), por sonicação (ELBESHBISHY et al., 2011a) ou ainda através de métodos combinados (ELBESHBISHY; HAFEZ; NAKHLA, 2011b).

O enriquecimento térmico é uma técnica muito comum para a seleção de bactérias produtoras de hidrogênio (BAGHCHEHSARAEE et al., 2008), além de um método fácil e prático (WANG; WAN, 2008a). A maioria dos tratamentos térmicos reportados na literatura encontra-se em faixas de temperatura entre 80 e 104°C e em tempos de exposição que variam de 15 a 120 minutos (ZHU; BÉLAND, 2006).

Mu, Yu e Wang (2007), avaliando o enriquecimento do inóculo através de tratamento térmico, ácido e básico, obtiveram rendimento de 2 mol H_2 .mol⁻¹ glicose quando o lodo foi aquecido a 102°C por 90 minutos e de 0,48 mol H_2 .mol⁻¹ glicose quando o tratamento recebido foi o agente alcalinizante. Wang e Wan (2008a) obtiveram rendimento máximo de 221,5 mL H_2 g⁻¹ glicose quando realizaram o aquecimento do lodo anaeróbio a 100°C por 15 minutos.

Baghchehsaraee *et al.* (2008) verificaram o efeito do tratamento térmico em Iodo anaeróbio em três faixas de temperatura 65°C, 80°C e 95°C por 30 minutos. Os autores concluíram que o rendimento e a produção específica de hidrogênio diminuíram 15% com o aumento da temperatura de 65°C (2,30 mol H₂ mol⁻¹ glicose e 63,3 mmol H₂ g⁻¹ SSV, respectivamente) para 95°C (1,95 mol H₂ mol⁻¹ glicose e 54,2 mmol H₂ g⁻¹ SSV, respectivamente).

Ao analisar os dados coletados após testar seis formas de pré-tratamento por métodos físicos e químicos, Zhu e Béland (2006) concluíram que o inóculo pode ser cultivado sem qualquer tratamento para sistemas de produção de hidrogênio. Segundo os autores, as condições ácidas (baixo pH) desenvolvidas durante o processo podem reprimir a atividade metanogênica. Embora os cultivos com o lodo sem tratamento tenham exibido pequena atividade metanogênica, ela foi de curta duração e desapareceu quando ocorreu redução do pH, resultando em elevada produção de hidrogênio, de 5,17 mol H₂ mol⁻¹ sacarose.

Diversos estudos têm comparado vários métodos de pré-tratamento para enriquecimento de inóculo para produção de hidrogênio; no entanto, algumas conclusões ainda são conflitantes (WANG; WAN, 2008a). Por esse motivo, há necessidade de realizar pré-tratamentos com fontes de lodo específicas, para que se possa determinar a melhor faixa de temperatura e o tempo de tratamento do lodo a ser utilizado como inóculo na produção de hidrogênio em processos contínuos.

3.4.4 Ácidos orgânicos voláteis

A produção de hidrogênio é usualmente acompanhada pela produção de ácidos e álcoois. A identificação desses compostos intermediários proporciona informações

relevantes sobre as vias metabólicas seguidas pelos micro-organismos bem como de condições favoráveis para se obter melhores rendimentos na obtenção do gás (KHANAL; CHENG; SUNG, 2004, DE SÁ et al., 2011; CERQUEIRA et al., 2011).

Os principais produtos formados na fermentação de carboidratos para produção de hidrogênio são os ácidos acético, propiônico e butírico (KAPDAN; KARGI, 2006). Dependendo de suas concentrações, os ácidos orgânicos voláteis (AGV) podem ser estimulantes, inibitórios e até mesmo tóxicos. Baixos níveis de AGV não afetam ou exercem efeito estimulante; no entanto, altos níveis podem causar a severa inibição da produção fermentativa de hidrogênio (DONG et al., 2009, ZHENG; YU, 2005).

Teoricamente, 4 mol H_2 .mol⁻¹ glicose podem ser obtidos pela conversão da glicose em ácido acético, o equivalente a 498 mL H_2 g glicose⁻¹. Quando a glicose é convertida a ácido butírico, 2 mol H_2 .mol⁻¹ glicose são gerados, obtendo-se rendimento de 249 mL H_2 g glicose⁻¹ (HAFEZ et al., 2010; GUO et al., 2010). O rendimento estequiométrico pode ser verificado nas Equações 1 e 2:

$$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COOH \text{ (Acético)} + 2CO_2 + 4H_2$$
 Eq. (1)

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CH_2CH_2COOH (Butírico) + 2CO_2 + 2H_2$$
 Eq. (2)

A ausência de propionato é associada à melhora no rendimento da produção de hidrogênio, uma vez que a produção de ácido propiônico consome 2 mols de hidrogênio para cada 2 mols de propionato produzido (Equação 3) (SHIDA et al., 2009).

$$C_6H_{12}O_6 + 2H_2 \rightarrow 2 CH_3CH_2COOH (Propiônico) + 2H_2O$$
 Eq. (3)

A presença de etanol e ácido lático indica que o hidrogênio não é gerado, nem consumido (Equações 4 e 5) (GUO et al., 2010).

$$C_6H_{12}O_6 + 2H_2 \rightarrow 2 CH_3CH_2OH \text{ (Etanol)} + 2CO_2 \qquad \qquad \text{Eq. (4)}$$

$$C_6H_{12}O_6 + 2H_2 \rightarrow 2CH_3CHOHCOOH (Lático) + 2CO_2$$
 Eq.(5)

Apesar do elevado rendimento teórico obtido pela conversão de glicose a ácido acético, nem sempre o acúmulo desse metabólito implica necessariamente em altas taxas de produção de hidrogênio. Bactérias homoacetogênicas, principalmente do gênero *Clostridium*, são capazes de crescer heterotroficamente, convertendo açúcares simples a acetato (Equação 6), e autotroficamente, produzindo ácido acético a partir de H₂ e CO₂ (Equação 7) (CHEN; SUNG, CHEN, 2009).

$2CO_2 + 4H_2 \rightarrow CH_3COOH + 2H_2O \qquad \qquad \text{Eq. (7)}$

De acordo com Kim *et al.* (2006),micro-organismos homoacetogênicos, do gênero *Clostridium*, têm a capacidade de formar esporos de resistência. Como não são inibidos por tratamentos térmicos, tornam-se competidores potenciais dos produtores de hidrogênio (OH; VAN GINKEL; LOGAN, 2003).

Levando-se em consideração a existência de rotas alternativas para a produção de ácido acético, Chong *et al.* (2009) sugerem que a produção de hidrogênio a partir de carboidratos, por bactérias do gênero Clostridium, pode ser estimada através da relação entre os ácidos butírico e acético. De acordo com Hawkes *et al.* (2007), relações butirato/acetato na proporção de 3:2 resultam em rendimento teórico médio de 2,5 mol H₂ mol glicose⁻¹.

3.4.5 pH

As condições ambientais são os principais parâmetros a serem controlados durante a produção de hidrogênio. O pH tem implicações diretas no rendimento da produção, no tipo de ácidos orgânicos produzidos e na regulação da mudança da via metabólica em direção a solventogênese (KAPDAN; KARGI, 2006; VASQUEZ; VARALDO, 2009).

O pH pode afetar a atividade da hidrogenase, bem como das vias metabólicas. (SINHA; PANDEY, 2011; WANG; WAN, 2009). Em experimentos com pH inicial elevado (6,0-6,5), observa-se rápida produção de hidrogênio e de ácidos, que, em níveis inibitórios, causam depleção da capacidade de tamponamento. Quando o pH inicial é reduzido (4,5), as condições de partida podem não ser favoráveis; no entanto, com a adaptação dos microorganismos aos baixos valores de pH, a produção de hidrogênio pode ocorrer gradualmente, em taxas moderadas e de longa duração (18 \pm 1h) (KHANAL; CHEN; SUNG, 2004).

Jung *et al.* (2011) consideram que o valor inicial do pH tido como ótimo para produção de hidrogênio varia na faixa de 4,5 a 9,0 e que são preferíveis valores de pH menores que 5,0. De acordo com Lee *et al.* (2008), o pH ótimo para produção de hidrogênio a partir do amido varia de 4,5 a 6,0, com poucas exceções. Khanal, Chen e Sung (2004),utilizando amido como substrato, obtiveram a melhor produção específica (5 mL H₂ h⁻¹ g⁻¹ SSV) na faixa de pH entre 5,5 e 5,7.

Chen *et al.* (2005) avaliaram a influência de diferentes faixas de pH na produção fermentativa de hidrogênio em culturas de *C. butyricum* e observaram forte inibição do crescimento celular e da produção de hidrogênio quando o pH foi fixado em 5,0. Com o

Eq. (6)

aumento do pH para 6,5 houve rápida depleção das fontes de carbono e aumento da biomassa, porém, queda na produção total de hidrogênio (2,17 L H₂). Os autores notaram que os melhores resultados em termos de rendimento e de produção total de hidrogênio foram obtidos para faixa de pH de 5,5 (2,78 mol H₂ mol⁻¹ sacarose e 5,25 L H₂, respectivamente) e 6,0 (1,43 mol H₂ mol⁻¹ sacarose e 2,73 L H₂, respectivamente).

Won e Lau (2011) obtiveram melhor rendimento na produção fermentativa de hidrogênio de 2,16 mol H_2 mol⁻¹ hexose em pH inicial de 4,5 em um reator batelada sequencial. Baixos valores iniciais de pH podem direcionar a via metabólica para a produção de acetato, resultando em alta produção de hidrogênio (KHANAL; CHEN; SUNG, 2004).

Ao avaliarem a produção fermentativa de hidrogênio, Lee *et al.* (2008) constataram que o rendimento e a produção de hidrogênio foram superiores quando o valor do pH da cultura foi mantido entre 5,5 (9,19 mmol H₂ g⁻¹ amido e 511 mL H₂) e 6,0 (8,63 mmol H₂ g⁻¹ amido e 857 mL H₂), se comparados aos verificados nas culturas em que o pH foi estabelecido entre 6,5 (8,12 mmol H₂ g⁻¹ amido e 612 mL H₂) e 7,0 (0,996 mmol H₂ g⁻¹ amido e 396 mL H₂). Entre a faixa de pH de 5,5 e 7,0 houve predominância de butirato. Em condições de pH não controlado (8,5 inicial), o rendimento e a produção de hidrogênio foram de 0,998 mmol H₂ g⁻¹ amido e 477 L H₂, etanol e butirato foram os principais metabólitos solúveis.

Existem desacordos sobre o pH ótimo para produção fermentativa de hidrogênio, possivelmente devido à diferença entre inóculos, substratos e a faixa de pH inicial nos experimentos realizados (WANG; WAN, 2009).

3.4.6 Temperatura

A temperatura é um fator importante na produção fermentativa de hidrogênio, afetando diretamente a taxa de crescimento e as vias metabólicas dos micro-organismos (SINHA; PANDEY, 2011).

O efeito da temperatura durante a produção de hidrogênio pode ser explicada termodinamicamente quando são consideradas as mudanças na energia livre de Gibbs e nas condições padrão de entalpia para conversão de glicose em acetato, assumindo-se o rendimento teórico de 4 mols de H₂ por mol de glicose (SINHA; PANDEY, 2011).

Mudanças na energia livre de Gibbs e na entalpia indicam a forma como a reação pode ocorrer, se é espontânea e se sua natureza é endotérmica. Com o aumento da temperatura, o equilíbrio cinético aumenta devido à natureza endotérmica da reação (Δ H° is+ve). Assim, com aumento na temperatura a concentração do reagente se mantém constante, o que pode melhorar a concentração de H₂ (SINHA; PANDEY, 2011).

Baghchehsaraee *et al.* (2010), ao avaliarem a produção biológica de hidrogênio em condições mesofílicas e termofílicas, obtiveram 2,18 mol H₂.mol⁻¹ glicose quando o

experimento foi conduzido a 37°C e 1,25 mol H_2 .mol⁻¹ glicose em cultivo a 55°C. Os autores verificaram que a 37°C a produção de hidrogênio não sofreu variações com a redução do pH e prosseguiu, mesmo com valores inferiores a 4,0. A 55°C a produção de hidrogênio foi observada somente até o pH 4,0, indicando que temperaturas termofílicas tornam o inóculo mais susceptível à variação do pH.

Lee *et al.* (2008), ao utilizarem amido como substrato durante a produção fermentativa de hidrogênio em microflora mista, obtiveram rendimento de 5,34 mmolH₂.g⁻¹ amido a 37°C, um resultado 6 vezes superior ao do rendimento obtido a 55°C (1,44 mmolH₂.g⁻¹ amido).

Para avaliar o efeito da temperatura sobre a produção fermentativa de hidrogênio, Wang e Wan (2008b) conduziram experimentos em modo batelada em que foram testadas temperaturas entre 20°C e 55°C. Mudanças significativas na degradação do substrato e na produção potencial de hidrogênio foram observadas quando houve aumento da temperatura de 20°C para 40°C.

3.4.7 Tempo de detenção hidráulica

De acordo com Barros *et al.* (2010), o TDH mínimo para manter a produção específica de hidrogênio é relatado como aquele em que se possa manter adequadas concentrações de micro-organismos produtores, enquanto a predominância de organismos consumidores não seja favorecida.

A aplicação de baixos tempos de detenção hidráulica pode ser utilizada como estratégia na produção fermentativa de hidrogênio, uma vez que altas taxas de diluição não são propícias à fixação de arqueias metanogênicas que crescem a taxas muito lentas. Baixos valores de TDH podem afetar fortemente a produção de metano (VAZQUEZ; VARALDO, 2009).

Shida *et al.* (2009), utilizando como substrato água residuária sintética, obtiveram aumento significativo no rendimento e na produção de hidrogênio em um reator anaeróbio de leito fluidificado, com diminuição do TDH de 8 h para 2 h, alcançando valores máximos de 2,29 mol H₂.mol⁻¹ de glicose.

Jo *et al.* (2008) verificaram que a diminuição do TDH de 24 h para 2 h em um reator de leito fixo com meio suporte em espuma de poliuretano foi acompanhado de um aumento de até 7 vezes na taxa de produção de hidrogênio, obtendo 7,2 LH₂L⁻¹d⁻¹ e 97,4% de eficiência na utilização do substrato. Com a redução do TDH para 1 h, houve diminuição na concentração de ácido butírico e aumento na concentração de ácido lático.

Durante produção contínua de biohidrogênio em reator mistura completa, Arooj *et al.* (2008) observaram que os produtos do metabolismo e a população de micro-organismos foram afetados pela variação no TDH. A máxima taxa de produção de 5,59 L H₂ L⁻¹ d⁻¹ e de

produção específica de hidrogênio e 2,98 L H_2 g SSV⁻¹ d⁻¹ foi alcançada no TDH de 6 h. Quando o TDH foi reduzido para 4 h e para 3 h houve arraste dos micro-organismos e decréscimo na concentração de ácido butírico, o que pode justificar a baixa produção de hidrogênio.

Lin, Chang e Hung (2008), em um reator de mistura completa, testaram TDHs que variaram entre 12 h e 2 h. Segundo os autores, a redução do TDH de 12 h para 2 h, acarretou redução no rendimento; no entanto, foi verificado aumento na taxa de produção e na produção específica de hidrogênio. Os melhores resultados obtidos foram de 1,5 mol H₂ mol hexose⁻¹ (TDH 12 h) para rendimento, 450 mmol H₂ L⁻¹ d⁻¹ (TDH 4 h) para taxa de produção e 200 mmol H₂gSSV d⁻¹ (TDH 6h) para produção específica. Os autores sugerem que para produção contínua de hidrogênio, o TDH ótimo varia entre 6 h e 4 h; em TDHs menores (2 h) foi observada lavagem dos micro-organismos produtores de hidrogênio.

3.4.8 Substrato

Resíduos ricos em carboidratos são substratos preferenciais para produção de hidrogênio (JUNG et al., 2011). Caracterizada por elevadas concentrações de matéria orgânica e por sua natureza ácida (RIBAS; CEREDA; VILLAS BÔAS, 2010; RAJASIMMAN; KARTHIKEYAN, 2007), a água residuária de fecularia pode ser considerada como substrato potencial para geração de hidrogênio, uma vez que, além de atender critérios como elevada concentração de carboidratos, há disponibilidade desse resíduo (KAPDAN; KARGI, 2006).

O nitrogênio é um nutriente essencial, importante componente de proteínas, ácidos nucléicos e enzimas e que em níveis adequados beneficia o crescimento das bactérias produtoras de hidrogênio. Juntamente com o nitrogênio, o fósforo desempenha funções fundamentais, garantindo a capacidade de tamponamento dos sistemas fermentativos (WANG; WAN, 2009). Além de nitrogênio e fósforo, a água residuária de fecularia de mandioca é composta por potássio, cálcio, magnésio, enxofre, zinco, manganês, cobre, ferro e sódio (RIBAS; CEREDA; VILLAS BÔAS, 2010). Em média, a concentração de nitrogênio encontrada no resíduo varia entre 350 mg.L⁻¹ (KAEWKANNETRA et al., 2011; PINTO, 2008) e 112 mg.L⁻¹ (COLIN et al., 2006), enquanto a concentração de fósforo pode alcançar de 28 mg.L⁻¹ (COLIN et al., 2007) a 42 mg.L⁻¹ (PINTO, 2008).

Na Tabela 1 pode ser observada a composição da água residuária da indústria de fécula de mandioca, utilizada em experimentos realizados entre os anos de 2007 e 2012.

рН	DQO NTK		ST	STF	STV	Referência	
4,25	6719	231	-	-	6306	Kuczman(2012)	_
4,72	12143	-	8681	2685	5996	Watthier(2011)	
4,00	10743	-	10970	3285	7685	Kunzler(2010)	
-	9861	-	10194	2244	7950	Torres (2009)	
4,25	15720	-	9540	2030	7510	Kuczman(2007)	

Tabela 1 Composição da água residuária de indústria de fécula de mandioca

Legenda:

pH - potencial hidrogeniônico

DQO - demanda química de oxigênio

NTK - nitrogênio total Kjadahl

ST - sólidos totais

STF - sólidos totais fixos STV - sólidos totais voláteis

Argun *et al.* (2008) verificaram aumento no rendimento da produção de hidrogênio quando as relações C/N e C/P foram estabelecidas em 200 e 1000, respectivamente, obtendo rendimento máximo de 281 mL H_2 .g⁻¹ amido. Segundo os autores, elevadas relações C/N e C/P melhoram a produção de hidrogênio devido às baixas concentrações de nitrogênio e fósforo requeridas pelos micro-organismos, uma vez que altas concentrações desses nutrientes são inibitórias. A relação C/N/P de 100:0.5:0.1 mostrou-se a mais adequada, maximizando o rendimento (23 mL H_2 g⁻¹ amido) e a taxa de produção de hidrogênio (8,0 mL H_2 g⁻¹ biomassa h⁻¹) (ARGUN et al., 2008).

Peixoto *et al.* (2010) avaliaram o desempenho de dois reatores de leito fixo e fluxo ascendente quanto à adição de nutrientes. No reator onde houve suplementação nutricional (C:N:P = 100:1.8:0.4), foram observados baixos rendimento (3,3 mol H₂ mol⁻¹ sacarose) e produção volumétrica de hidrogênio (0,2 L h⁻¹ L⁻¹) quando comparados ao rendimento (3,5 mol H₂ mol⁻¹ sacarose) e produção volumétrica de hidrogênio (0,2 L h⁻¹ L⁻¹) quando comparados ao rendimento (3,5 mol H₂ mol⁻¹ sacarose) e produção volumétrica de hidrogênio (0,4 L h⁻¹ L⁻¹) do reator que não recebeu suplementação (C:N:P = 100:0.8:0.3). A adição de nutrientes acarretou na excessiva produção de biomassa, causada principalmente pela menor relação C/N.

Para avaliar o efeito da relação C/N em reatores de leito fixo e fluxo ascendente na produção biológica de hidrogênio a partir de água residuária sintética, Rojas (2010) testou relações C/N de 40, 90, 140 e 190, utilizando sacarose e uréia como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente. A melhor relação C/N foi estabelecida em 137, quando o rendimento foi de 3,5 mol H_2 mol⁻¹ sacarose.

3.4.9 Principais desafios na produção biológica de hidrogênio

- Desenvolvimento de uma matriz sólida de geração, capaz de produzir grandes quantidades de gás;
- Uso de substratos renováveis, como resíduos;

- ✓ Estabelecimento de um consórcio microbiano adequado;
- ✓ Otimização dos parâmetros operacionais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Procedimentos experimentais

Os procedimentos experimentais foram desenvolvidos no Laboratório de Reatores Biológicos, Laboratório de Saneamento Ambiental e no Laboratório de Análises Agro-Ambientais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *campus* de Cascavel - PR.

4.2 Reatores anaeróbios de leito fixo

Os reatores anaeróbios de leito fixo e fluxo ascendente foram construídos em *pexiglass* transparente com 5 mm de espessura, 75 cm de altura e 8 cm de diâmetro interno. O compartimento interno foi dividido por telas de aço inoxidável em: entrada, leito e saída, segundo modelo proposto por Peixoto (2008). A representação esquemática e a imagem dos reatores podem ser visualizadas na Figura 2.



Figura 2 Reatores anaeróbios de leito fixo e fluxo ascendente, com dimensões em centímetros.

Após o preenchimento com o material suporte, o volume útil foi de 3,13 L para o reator com polietileno e 2,96 L para o reator com bambu. Ao longo do perfil, foram fixados 5 pontos de amostragem, separados por 7,5 cm de distância. Na base do reator, está localizada a entrada do afluente, pela qual foi realizada a alimentação do sistema por uma bomba peristáltica dosadora da marca Milan[®] ligada a um reservatório de 10 L. Para evitar a

degradação do substrato, o recipiente utilizado para armazenar a água residuária foi mantido sob refrigeração constante a temperatura de 7 °C. Ao final do reator encontra-se a saída do efluente e o gasômetro.

4.3 Material suporte

Como meio suporte foram utilizadas hastes de bambu (TORRES, 2009; KUNZLER et al., 2009; WATTHIER, 2011) e aparas de polietileno de baixa densidade (SILVA et al., 2006; PEIXOTO et al., 2010). Os materiais utilizados como suporte podem ser visualizados na Figura 3.



Figura 3 Hastes de bambu (a) e aparas de polietileno de baixa densidade (b) utilizados como suporte na fixação da biomassa.

As 12 hastes de bambu, dispostas em arranjo vertical, possuíam comprimento médio de 14 cm e porosidade de 74%. A porosidade do bambu foi determinada através de sua secagem em estufa a 105 °C por 24 h para obter a massa seca, seguido da imersão em água por 48 h para a obtenção da massa saturada. A porosidade do material foi obtida com base na Equação 8 (TORRES, 2009).

$$P(\%) = \frac{(M1-M2)}{V} \times 100$$
 Eq. (8)

Em que:

P(%) - Porosidade do bambu em porcentagem;

M1 - Massa do bambu saturado;

M2 - Massa do bambu seco a 105 °C por 24 h;

V - Volume de cada peça de bambu.

A padronização das aparas de polietileno de baixa densidade foi realizada com base no índice de uniformidade, determinado por peneiramento em agitador Solotest conforme metodologia de Peixoto (2008). O recheio foi composto por 670 g de polietileno com granulometria de 3/4". A disposição do material suporte nos reatores pode ser observada na Figura 4.



Figura 4 Disposição dos suportes de bambu (a) e polietileno (b) nos reatores de leito fixo e fluxo ascendente.

4.4 Inóculo

O lodo utilizado como inóculo foi coletado de peças de bambu adaptadas como meio suporte de um reator anaeróbio tubular horizontal de 3200 L, utilizado no tratamento de efluente de fecularia (Figura 5).



Figura 5 Inóculo em peças de bambu usadas como meio suporte de reator anaeróbio de leito fixo (a) e inóculo submetido ao tratamento térmico (b).

Após a coleta de lodo, aproximadamente 2 L foram pré-tratados através de aquecimento a 95 °C durante 15 minutos, conforme recomendações de Sreethawong *et al.* (2010).

A caracterização do lodo anaeróbio após tratamento térmico pode ser visualizada na Tabela 2.

-	рН	Sólidos totais (mg.L ⁻¹)	Sólidos totais fixos (mg.L ^{⁻1})	Sólidos totais voláteis (mg.L⁻¹)
	8,4	45.400	20.280	25.120

Tabela 2 Caracterização do inóculo após pré-tratamento térmico

4.5 Caracterização da água residuária da indústria de fécula de mandioca

A água residuária de indústria de fécula de mandioca foi coletada no município de Toledo, PR. O efluente líquido de fecularia é composto pela água resultante do processo de extração e purificação da fécula de mandioca e pela água de lavagem das raízes. Na Tabela 3 é apresentado um resumo da caracterização dos lotes de água residuária de indústria de fécula de mandioca utilizados na alimentação dos reatores.

Tabela 3 Caracterização da água residuária de fecularia utilizada na alimentação dos reatores

Lates		DQO	ΑT	NTK	Relação	ST	STV
Lotes	рн	(mg.L ⁻¹)	(mg.L ⁻¹)	(mg.L ⁻¹)	C/N	(mg.L ⁻¹)	(mg.L ⁻¹)
1 (24/08/12)*	4,22	10737	4683	293	37	7183	5089
2 (31/08/12)*	4,38	11029	2544	279	40	7084	5968
3 (13/09/12)*	5,33	10936	4350	286	38	8750	7946
4 (19/09/12)*	6,11	14642	2799	246	59	6640	5952
5 (27/09/12)*	4,90	11800	2789	307	38	7562	6584
6 (05/10/12)*	4,62	11643	3373	249	47	8625	7075
X e S	4,93±0,7	11798±1454	3423±896	277±24	43±9	7641±863	6320±833

Legenda:

* período de coleta da água residuária;

X: média amostral;

S: desvio padrão amostral;

pH: potencial hidrogeniônico (EATON et al., 2005);

DQO: demanda química de oxigênio (EATON et al., 2005);

AT: açúcares totais (DUBOIS et al., 1956);

NTK: nitrogênio total Kjeldahl (EATON et al., 2005);

C/N: relação direta entre a concentração de carbono e nitrogênio, em termos de DQO e NTK;

ST: sólidos totais (EATON et al., 2005);

STV: sólidos totais voláteis (EATON et al., 2005).

A amostragem, para caracterização dos lotes, foi realizada após homogeneização do efluente coletado. Em seguida, a água residuária foi envasada em garrafas de politereftalato de etileno (PET) e congelada em um Freezer Electrolux a -18 °C.

4.6 Partida e operação dos reatores

A partida dos reatores foi realizada de acordo com recomendações de Fernandes (2008) e Shida (2009). Uma alíquota correspondente a 10% do volume útil dos reatores, cerca de 300 mL de inóculo, foi diluída em 3L de água residuária da indústria de fécula de mandioca. Com o auxílio de bombas peristálticas dosadoras (Milan[®]), essa mistura foi recirculada nos reatores, em circuito fechado, por 48 h. A recirculação do lodo em modo batelada teve como objetivos promover a adaptação dos micro-organismos ao substrato, propiciar o início das atividades metabólicas celulares e fixar o inóculo no meio suporte (SHIDA, 2009).

Após o período de fixação e adaptação, iniciou-se a etapa de alimentação contínua dos reatores que foram submetidos às mesmas condições operacionais de pH e temperatura, que pode ser visualizadas na Tabela 4.

Carga Orgânica	pH inicial	Temperatura (° C)	TDH (h)	C/N	Carga Orgânica Volumétrica Aplicada (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)
1	6,0	36	4	36	28
2	6,0	36	4	39	15
3	6,0	36	4	38	26
4	6,0	36	3	38	35
5	6,0	36	3	59	22
6	6,0	36	3	38	22
7	6,0	36	3	46	27

Tabela 4 Condições operacionais e concentração da carga orgânica volumétrica aplicada aos reatores com bambu e polietileno de baixa densidade durante o período experimental

Como pode ser visualizado na Tabela 4, a operação dos reatores foi feita em 7 etapas com variação de carga orgânica de 15 a 35 g.L⁻¹.d⁻¹ e do TDH de 3 e 4 h durante o período experimental. A redução do TDH de 4 para 3 h foi condicionada a redução da concentração de hidrogênio no biogás.

A variação das cargas orgânicas volumétricas em 28; 15; 26; 35; 22; 22 e 27 g.L⁻¹.d⁻¹, ocorreu devido à flutuação na composição da água residuária da indústria de fécula de mandioca. De acordo com Del Bianchi (1998), essa variabilidade na constituição está relacionada a fatores como tempo de colheita, idade das raízes e variedade da mandioca.

O tempo de operação do sistema foi de 46 dias.

Carboidratos são substratos preferenciais na produção biológica de hidrogênio por processos fermentativos, e por isso, a concentração afluente foi calculada em função da concentração dos açúcares totais presentes na água residuária. As cargas orgânicas volumétricas foram calculadas de acordo com a Equação 9 (CHERNICHARO, 2007).

$$COV = \frac{Q \times SO}{V}$$
 Eq. (9)

Em que:

COV - carga orgânica volumétrica, expressa em g.L⁻¹.d⁻¹;

Q - vazão (L.d⁻¹);

S0 - concentração do substrato afluente (g.L⁻¹);

V - volume total do reator (L).

As cargas orgânicas volumétricas aplicadas reproduziram em laboratório a realidade observada na indústria, onde há necessidade de implantar sistemas robustos, capazes de amortecer choques de carga impostos aos reatores em razão das variações constantes observadas na composição do resíduo.

Os parâmetros de monitoramento do comportamento dos reatores, o local da coleta e a frequência de amostragem durante o período experimental são apresentados na Tabela 5.

Parametro	Local da coleta	Frequencia
Vazão (L.d ⁻¹)	Saída do reator	Diária
рН	Efluente	Diária
Açúcares Totais (mg.L⁻¹)	Efluente	Diária
Ácidos Orgânicos Voláteis (mg.L ⁻¹)	Efluente	Diária
Sólidos Suspensos Voláteis (mg.L ⁻¹)	Efluente	Diária
Produção volumétrica de biogás (L.d ⁻¹)	Saída de gás	Diária
Composição do biogás (H ₂)	Saída de gás	Diária

Tabela 5 Parâmetros avaliados e frequência de coleta das amostras

4.7 Métodos analíticos

4.7.1 Determinação dos açúcares totais

A concentração de açúcares totais em amostras do afluente e efluente dos reatores, foi determinada através da metodologia de Dubois *et al.* (1956) com leitura da absorbância da amostras realizada em comprimento de onda de 490 nm em um espectrofotômetro uv-vis Hach[®] 2010.

4.7.2 Determinação do pH

A determinação do pH em amostras do afluente e efluente dos reatores foi realizada em pHmetro de bancada Tec 3MP da marca Tecnal[®].

4.7.3 Determinação da demanda química de oxigênio (DQO)

Na determinação da demanda bioquímica de oxigênio em amostras do afluente e efluente dos reatores foi utilizado o método 5220D do *Standards Methods for the Examination of Water and Wastewater* (EATON et al., 2005). A leitura da absorbância foi realizada em comprimento de onda de 620 nm em espectrofotômetro uv-vis Hach[®] 2010.

4.7.4 Determinação dos sólidos totais (ST) e sólidos suspensos totais (SST)

A concentração de sólidos em amostras do afluente e efluente dos reatores foi determinada de acordo com os métodos 2540B e 2540D do *Standards Methods for the Examination of Water and Wastewater* (EATON et al., 2005).

4.7.5 Determinação do nitrogênio total

A concentração de nitrogênio total em amostras do afluente dos reatores foi quantificada pelo método 4500 – Norg C – Semi-micro Kjeldahl do *Standards* Methods for the Examination of Water and Wastewater(EATON et al., 2005).

4.7.6 Determinação dos ácidos graxos voláteis

A concentração dos ácidos lático, acético, butírico e propiônico foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em sistema Shimadzu[®] 2010. O preparo das amostras e a construção da curva de calibração para os ácidos analisados foram realizadas seguindo a metodologia de Lazaro (2009). As condições cromatográficas basearam-se na metodologia de Cerqueira *et al.* (2011) com:

- Coluna Aminex[®] HPX-87H (300 mm x 7,8 mm);
- Fase móvel: água ultrapura Milli-Q (Millipore®) acidificada com 0,005% de

 $H_2SO_4;$

- Fluxo: 0,6 mL.min⁻¹;
- Detector: UV com arranjo de diodos de 208 nm;
- Volume de amostra: 20 µL;
- Temperatura do forno: 47°C.

Na Figura 6 pode ser observado um cromatograma dos ácidos lático (9.406), acético (11.126), propiônico (12.934) e butírico (15.159) por CLAE, com detector UV e arranjo de diodos.



Figura 6 Cromatograma típico de ácidos graxos voláteis determinados por CLAE, com detector UV e arranjo de diodos. Os ácidos lático (5.814), acético (6.968), propiônico (11.636) e butírico (15.519) estão identificados de acordo com o tempo de retenção.

Os padrões dos ácidos butírico, lático e propiônico foram adquiridos da empresa Vetec[®]. O padrão de ácido acético e o ácido sulfúrico pertencem às marcas Sigma-Aldrich[®] e F Maia[®], respectivamente.

4.7.7 Determinação do gás

4.7.7.1 Determinação da vazão de biogás

Para mensurar o conteúdo de biogás gerado nos reatores foi adotado um sistema de gasômetro, conforme descrito por Cappelletti *et al.* (2011), através do qual uma mangueira acoplada a saída do reator foi ligada a um Erlenmeyer de 500 mL contendo uma solução composta por 25% de NaCl e 3% de H₂SO₄ (m/v). O volume de solução deslocado foi considerado como correspondente ao volume de biogás gerado no sistema (Equação 10).

$$V = \frac{(P atm - p.H.g).V exp.T}{Patm.Texp}$$
 Eq. (10)

Em que:

V - volume de biogás nas CNTP (L);

Patm - pressão atmosférica (mmHg);

p - densidade da solução salina;

H - distância entre a saída do frasco contendo a solução salina e o frasco coletor (m);

g - gravidade (N);

Vexp - volume de solução salina deslocado durante a geração de gás;

T - temperatura nas CNTP (K);

Texp - temperatura experimental (°C).

A correção no volume do gás foi realizada de acordo com Equação 11.

$$\frac{P_{gas \ \hat{o}metro} \ \cdot V_{gas \ \hat{o}metro}}{T_{gas \ \hat{o}metro}} = \frac{P_{cntp} \ \cdot V_{cntp}}{T_{cntp}}$$
Eq. (11)

Em que:

P gasômetro - pressão atmosférica (mmHg);

V gasômetro - volume de gás aferido no gasômetro (L);

T gasômetro - temperatura ambiente (°C);

P CNTP - pressão atmosférica nas condições normais de temperatura e pressão (101 Pa);

V CNTP - volume nas condições normais de temperatura e pressão;

T CNTP - temperatura nas condições normais de temperatura e pressão (273 k).

A medida do volume de gás gerado foi realizada em média três vezes ao dia, durante todo o período de avaliação. Em função do volume de biogás aferido, da análise qualitativa do biogás e do consumo de açúcares, foram determinados a produção volumétrica de biogás e de hidrogênio ($L.d^{-1}$), o rendimento na produção de biogás e de hidrogênio em função do consumo de açúcares totais ($g.L^{-1}$) e o percentual de hidrogênio no biogás (H_2 %) para cada carga orgânica volumétrica aplicada nos reatores.

4.7.7.2 Determinação da concentração do gás hidrogênio

Para determinação da concentração de hidrogênio no biogás, foram realizadas amostragens no *headspace* dos reatores através da perfuração do septo localizado próximo à saída que conduz ao gasômetro. O gás foi coletado em seringa cromatográfica Hamilton Gastight[®] com trava e filtro de teflon.

As análises de biogás foram realizadas em Cromatógrafo gasoso Shimadzu[®] 2010, de acordo com a metodologia proposta por Peixoto (2008) com:

- Coluna Capilar Carboxen[®] 1010 Plot (30m de comprimento, 0,53 mm de diâmetro interno e 0,30µm de espessura);
- Gás de arraste: Argônio;
- Temperatura do Injetor: 200 °C;
- Temperatura do Detector: 230 °C;
- Detector de condutividade térmica (TCD);
- Volume de amostra: 50 µL;
- Vazão do ar de make-up (AR): 8 mL.min⁻¹;
- Programa de temperatura do forno: temperatura inicial de 40 °C (2 min); 1^a taxa de aquecimento: 5 °C.min⁻¹ até 60 °C; 2^a taxa de aquecimento: 25 °C.min⁻¹ até 200 °C; temperatura final 200 °C (5 min.).

Na Figura 7 pode ser visualizado um cromatograma típico de gás hidrogênio, obtido através da injeção de 50 µL de padrão.



Figura 7 Cromatograma obtido através da injeção de 50 µL de padrão de gás hidrogênio em coluna Carboxen[®] 1010 Plot, com detector de condutividade térmica.

A concentração de hidrogênio no biogás foi calculada através de curvas de calibração no cromatógrafo. O número de mols de H₂ na amostra foi determinado através da equação dos gases ideais (Equação 12):

$$PV = nRT$$
 Eq. (12)

Em que:

- P pressão atmosférica (atm);
- V volume de gás injetado (50 µL);
- n número de mols;
- R constante universal dos gases ideais (0,082 atm.L/mol.K);
- T temperatura absoluta (K).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme descrito previamente no Capítulo Material e Métodos, dois reatores de leito fixo foram operados em modo contínuo e submetidos à variação do TDH de 4h e de 3h durante 46 dias de operação. Finalizada a etapa de fixação da biomassa no meio suporte, através da recirculação do inóculo, iniciou-se a etapa de alimentação do reator.

Neste capítulo, serão discutidos os resultados referentes à produção biológica de hidrogênio a partir de água residuária da indústria de fécula de mandioca e a influência do material suporte na fixação da biomassa.

Para facilitar a leitura do texto, foram utilizadas as siglas "RB" para o reator com meio suporte de hastes de bambu e "RP" para o reator como meio suporte de aparas de polietileno de baixa densidade.

5.1 Degradação de carboidratos

A degradabilidade do substrato e a elevada concentração de carboidratos são requisitos fundamentais na produção biológica de hidrogênio (DAS; VEZIROGLU, 2008). De acordo com Argun *et al.* (2008), o amido presente na água residuária é hidrolisado em glicose e maltose e, em seguida, é convertido a ácidos graxos voláteis e hidrogênio. O percentual de conversão de carboidratos foi de 90 \pm 7% no reator RB e de 90 \pm 8% no reator RP, conforme pode ser observado na Figura 8.



Carga Orgânica Volumétrica Aplicada (g.L⁻¹.d⁻¹)

Figura 8 Percentual de degradação de açúcares em função da carga orgânica volumétrica aplicada para os reatores RB e RP.

Barros *et al.* (2010) obtiveram elevadas eficiências de conversão de glicose de 88,20 a 96,30% em um reator de leito fluidificado operado com TDH de 4 h e argila expandida como meio suporte. De acordo com Gavala, Skiadas e Ahring (2005), a elevada conversão observada no reator com biomassa imobilizada deve-se à alta retenção de sólidos que a configuração proporciona. Logo, a melhora na retenção da biomassa ativa é uma estratégia efetiva para elevar a conversão de substrato e a eficiência na produção de H₂ (SHIDA et al., 2009).

Wu *et al.* (2008), notaram eficiência na conversão de substrato entre 96 e 99% em TDH de 4 h em reatores com biomassa imobilizada. Arooj *et al.* (2008), verificaram maior consumo de amido nos valores de TDH mais elevados em um reator de mistura completa sem utilização de suporte. Os autores constataram redução na eficiência de remoção de açúcares de 96 para 68% quando o TDH diminuiu de 18 para 4 h.

5.2 Variação do pH efluente

De acordo com Lin *et al.* (2012), a melhor faixa de pH para produção biológica de hidrogênio em sistemas contínuos é de 5,5 a 6,0. Em sistemas que utilizam amido como substrato são recomendados valores entre 4,5 e 6,0 (LEE et al., 2006). Como pode ser observado na Figura 9, em duas situações foram verificados valores médios de pH abaixo de 5,0, sendo que a primeira ocorreu durante a aplicação da primeira carga orgânica volumétrica de 28 g.L⁻¹.d⁻¹, em que foram observados valores médios de 4,8 e 4,3 para os reatores RB e RP, respectivamente.



Figura 9 Variação do pH efluente para o reatores RB e RP em função da carga orgânica volumétrica aplicada.

O elevado pH inicial (6,0) torna o ambiente propício à rápida produção de ácidos, acarretando reduções no valor do pH do meio. Essa mudança brusca no ambiente pode causar inibição dos micro-organismos produtores de hidrogênio (KHANAL et al., 2004). Nessa condição, foram notadas as menores produções médias de biogás, de 2,7 L.d⁻¹ para o reator RB e de 0,2 L.d⁻¹ para o reator RP. E também foi observado o menor volume médio de hidrogênio de 0,7 ± 0,5 L.d⁻¹ para o reator RB e de 0,01 ± 0,01 L.d⁻¹ no reator RP.

A segunda situação foi verificada durante a diminuição no TDH de 4 para 3 h e a aplicação da 4^a COV, de 35 g.L⁻¹.d⁻¹. Nessa condição operacional, o valor médio do pH foi de 4,9 e 4,8 para os reatores RB e RP, respectivamente. De acordo com Boe *et al.* (2010), o valor do pH normalmente não indica respostas claras às mudanças de carga hidráulica; no entanto, mudanças no pH são observadas em resposta a aplicação de sobrecargas orgânicas.

Quando o valor médio do pH foi de 4,9 e 4,8 para os reatores RB e RP, foram observados volumes elevados na produção de biogás, de 0,49 L.h⁻¹.L⁻¹ e de 0,45 L.h⁻¹.L⁻¹, respectivamente. *Shida et al.* (2009) obtiveram produção média de biogás de 0,5 L.h⁻¹.L⁻¹ em TDH 4 h e pH inicial em torno de 6,0. Foi verificada variação de 4,4 a 3,5 no pH do efluente.

5.3 Geração de ácidos graxos voláteis (AGV)

A distribuição dos metabólitos solúveis foi caracterizada pela produção dos ácidos butírico, acético, lático e propiônico. Nos dois reatores houve predomínio dos ácidos acético e butírico, com percentuais médios de 72 e 66% do total de ácidos gerados nos reatores RB e RP, respectivamente. De acordo com Li *et al.* (2007), os ácidos acético e butírico são os principais produtos da fermentação em sistemas operados com pH inferior a 5,5 e superior a 6,0. A produção de ácido propiônico é favorecida em valores de pH entre 5,5 e 6,0.

Os maiores percentuais de ácido butírico de 57% no reator RB de 62% no reator RP durante a aplicação da 3ª COV, de 26 g.L⁻¹.d⁻¹, foram observados quando o substrato tinha elevadas concentrações de nitrogênio (relação C:N de 38). Resultados semelhantes foram encontrados por Lin e Lay (2004), que obtiveram percentuais de 51% de ácido butírico com relação C:N de 40. O aumento na relação C:N para 130 ocasionou redução na concentração de ácido butírico para 39%.

A concentração de ácido acético foi favorecida durante a aplicação da 7^a COV, de 27 g.L⁻¹.d⁻¹. Em relação C:N igual a 46, foram obtidos percentuais de ácido acético de 34% em ambos os reatores. Rojas (2010) obteve em média 65% de ácido acético em relações C:N que variaram de 40 a 130.

A concentração média de ácidos graxos voláteis em função da carga orgânica volumétrica aplicada para os reatores RB e RP pode ser observada nas Tabelas 6 e 7, respectivamente.

	COV (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)	HLa (mg.L ⁻¹)	HAc (mg.L ⁻¹)	HPr (mg.L ⁻¹)	HBu (mg.L ⁻¹)	HBu/HAc
_	28	1480 ± 2093	523 ± 82	230 ± 325	305 ± 432	$0,7 \pm 0,9$
	15	99 ± 125	646 ± 229	419 ± 69	786 ± 258	$1,3 \pm 0,3$
	26	118 ± 196	519 ± 85	344 ± 241	1134 ± 360	$2,2 \pm 0,7$
	35	81 ± 37	406 ± 217	339 ± 202	871 ± 515	$2,1 \pm 0,7$
	22	108 ± 124	472 ± 150	302 ± 140	931 ± 310	$2,0 \pm 0,3$
	22	285 ± 443	659 ± 332	406 ± 220	1133 ± 243	1,9 ± 0,6
	27	990 ± 1540	685 ± 177	218 ± 159	656 ± 276	$1,0 \pm 0,4$
	Média	367 ± 824	576 ± 223	334 ± 183	890 ± 368	$1,7 \pm 0,7$

Tabela 6 Concentração média de ácidos graxos voláteis por carga orgânica volumétrica aplicada ao reator RB

Legenda:

COV - Carga Orgânica Volumétrica $(g.L^{-1}.d^{-1});$

HLa - Ácido Lático (mg.L⁻¹);

HPr - Ácido Propiônico (mg.L⁻¹);

HBu - Ácido Butírico (mg.L⁻¹); HAc - Ácido Acético (mg.L⁻¹);

HBu/HAc - Relação entre as concentrações dos ácidos butírico e acético.

Tabela 7	Concentração	média de	ácidos	graxos	voláteis	por	carga	orgânica	volumétrica
aplicada a	ao reator RP			-			-	-	

COV (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)	HLa (mg.L ⁻¹)	HAc (mg.L ⁻¹)	HPr (mg.L ⁻¹)	HBu (mg.L⁻¹)	HBu/HAc
28	3285 ± 1808	456 ± 228	98 ± 139	56 ± 79	$0,2 \pm 0,3$
15	1159 ± 1461	420 ± 119	249 ± 145	446 ± 430	1,0 ± 0,8
26	109 ± 158	425 ± 157	276 ± 269	1341 ± 508	$3,2 \pm 0,9$
35	221 ± 228	680 ± 40	655 ± 71	1177 ± 190	$1,7 \pm 0,4$
22	247 ± 336	538 ± 213	351 ± 266	1096 ± 490	$2,0 \pm 0,7$
22	204 ± 292	727 ± 210	533 ± 165	1068 ± 298	1,6 ± 0,5
27	229 ± 297	788 ± 172	409 ± 294	966 ± 425	1,2 ± 0,3
Média	548 ± 1036	594 ± 216	387 ± 246	941 ± 505	1,6 ± 0,9

Legenda:

COV - Carga Orgânica Volumétrica (g.L⁻¹.d⁻¹);

HLa - Ácido Lático (mg.L⁻¹);

HPr - Ácido Propiônico (mg.L⁻¹);

HBu - Ácido Butírico (mg.L⁻¹); HAc - Ácido Acético (mg.L⁻¹);

HBu/HAc - Relação entre as concentrações dos ácidos butírico e acético.

A distribuição percentual média dos ácidos graxos voláteis em função da carga orgânica volumétrica aplicada para os reatores RB e RP pode ser observada nas Figuras 10 e 11, respectivamente.



Figura 10 Distribuição percentual média dos ácidos graxos voláteis para o reator RB em função da carga orgânica volumétrica aplicada.



Figura 11 Distribuição percentual média dos ácidos graxos voláteis para o reator RP em função da carga orgânica volumétrica aplicada.

Khanal *et al.* (2004), avaliando o efeito do pH inicial sobre a produção fermentativa de hidrogênio em substrato à base de amido, observaram que em pH inicial de 6,0 foram verificadas as maiores concentrações dos ácidos butírico, acético e propiônico. Seus resultados são similares aos resultados obtidos nesse trabalho.

Durante a aplicação da 1^a COV, de 28 g.L⁻¹.d⁻¹, foi verificado predomínio dos ácidos lático e acético em ambos os reatores. Com o aumento do pH para valores superiores a 5,0, foi observada redução na produção de ácido lático e aumento na concentração de ácido butírico. A mesma tendência foi verifica por Perna *et al.* (2012), que observaram que a produção de ácido lático foi favorecida em pH menor que 5,0 durante a operação de um reator anaeróbio com suporte de polietileno de baixa densidade.

As concentrações de ácido lático durante a aplicação da 1^a COV foram elevadas nos dois reatores, chegando a compor 42 e 82% do total de ácidos nos reatores RB e RP, respectivamente. Nessa condição operacional, foram observados os menores valores para produção volumétrica, rendimento e percentual de H₂ no biogás. De acordo com Kim *et al.* (2012), o ácido lático em concentrações elevadas inibe a atividade das bactérias produtoras de hidrogênio, resultando em longos períodos de fase *lag.*

No entanto, assumindo taxa de consumo de ácido acético e de ácido lático na proporção de 1:2, pode-se predizer que a partir dos ácidos acético e lático podem ser produzidos 1 mol de H₂, 2 moles de CO₂ e 1,5 mol de ácido butírico. Logo, com concentrações médias de ácido lático pode haver melhora na produção de hidrogênio (MATSUMOTO; NISHIMURA, 2007). Dessa forma, baixos percentuais de ácido lático de 6% no reator RB e de 8% no reator RP observados na 4^a (35 g.L⁻¹.d⁻¹) e 3^a (26 g.L⁻¹.d⁻¹) COV, respectivamente, podem ter contribuído na melhora das taxas de produção de H₂ verificadas nestas condições operacionais.

Elevados percentuais de ácido propiônico de 20% no reator RB e 24% no reator RP foram observados durante a aplicação da 4ª COV, de 35 g.L⁻¹.d⁻¹. De acordo com Boe *et al.* (2010), a produção de ácido propiônico em reatores anaeróbios reflete condições de sobrecargas orgânicas, devido à sua degradação termodinamicamente desfavorável, causada pelo crescimento lento dos micro-organismos consumidores do respectivo ácido.

Normalmente, a produção de ácido propiônico é associada a menores rendimentos durante a produção fermentativa de hidrogênio, uma vez que sua geração consome 1 mol de H₂ (SHIDA et al., 2009). Com percentuais médios de 16 ± 8% para o reator RB e 17 ± 9% no reator RP, o ácido propiônico esteve entre as menores concentrações observadas dentre os ácidos graxos voláteis analisados. Sua presença pode estar diretamente relacionada à sobrecarga orgânica do sistema, uma vez que a produção de hidrogênio não foi prejudicada nas cargas que apresentaram as maiores concentrações do metabólito.

5.4 Remoção da demanda química de oxigênio (DQO)

Na Figura 12 são apresentadas as eficiências de remoção de DQO em função da aplicação da carga orgânica volumétrica aplicada.



Figura 12 Remoção média de DQO para os reatores RB e RP em função da carga orgânica volumétrica aplicada.

A eficiência média de remoção de DQO foi de $35 \pm 11\%$ para o reator RB e de $32 \pm 11\%$ para o reator RP. Estes valores foram superiores aos indicados pela literatura, na qual é sugerida eficiência de remoção da DQO inferior a 20% durante o processo de produção de hidrogênio (ANTONOPOULOU et al., 2007).

Durante a aplicação da 3^a (26 g.L⁻¹.d⁻¹) e da 4^a (35 g.L⁻¹.d⁻¹) COV, foram verificados os menores percentuais médios de remoção de DQO, de 23 e 20% para o reator RB e de 17 e 21% para o reator RP, respectivamente. Em contrapartida, foram observadas as maiores concentrações de metabólitos solúveis e da relação C:N de 38. De acordo com Sreethawong *et al.* (2010), o excesso de nitrogênio pode alterar o mecanismo de biodegradação do substrato, acarretando aumento na concentração dos ácidos graxos voláteis. Esses autores verificaram que em relações C:N menores que 45 houve diminuição significativa na remoção de DQO.

O reator RP obteve o melhor desempenho na produção volumétrica de biogás durante a aplicação da 4^{a} COV (35 g.L⁻¹.d⁻¹) com percentual médio de remoção de DQO de 21%. No entanto, foi observado baixo percentual de H₂ no gás(13%). Segundo Peixoto (2009), a produção de ácidos voláteis de cadeia longa e compostos mais reduzidos são condizentes com baixos valores de remoção de DQO, conduzindo à redução na produção

de H₂, que é consumido durante a síntese desses compostos, ao invés de ser liberado como gás.

Guo *et al.* (2008), avaliaram TDHs que variaram de 4 a 24 h e concentrações de amido de 0,125 e 1,00 g.L⁻1.h⁻¹ operando um reator de leito expandido com carbono ativado como material suporte. Os autores observaram decréscimo de 31 para 16% na remoção de DQO quando o TDH foi reduzido de 24 para 4 h. Li *et al.* (2007), obtiveram remoções na DQO de 24,3% no período inicial e 9,4% ao término do experimento utilizando melaço diluído como substrato em um reator compartimentado de 24,48 L, TDH de 13,5 h e COV de 9 g.L⁻¹.d⁻¹

Com a aplicação da 5^a COV a remoção média de DQO nos reatores alcançou 53% para o reator RB e de 48% para o reator RP. Nessa condição operacional, a situação inversa foi verificada, uma vez que o aumento na eficiência de remoção de DQO coincide com os baixos valores médios na concentração de metabólitos solúveis e aumento na relação C:N para 59. O-Thong *et al.* (2008) obtiveram eficiência de 45% na remoção de DQO em relação C:N igual a 58, operando um reator alimentado em batelada, com resíduos da indústria de óleo de dendê como substrato.

5.5 Concentração de sólidos suspensos voláteis (SSV) no efluente

Na Figura 13 são apresentadas as concentrações de SSV no efluente dos reatores RB e RP em função da carga orgânica volumétrica aplicada.



Figura 13 Concentração de SSV no efluente dos reatores RB e RP em função da carga orgânica volumétrica aplicada.

A concentração média de SSV no efluente dos reatores foi de 2480 \pm 1065 mg SSV.L⁻¹ no reator RB e de 1577 \pm 861 mg SSV.L⁻¹ no reator RP. A maior concentração de SSV verificada no efluente do reator RB pode ser explicada pela disposição do material suporte, pois como as hastes de bambu foram arranjadas de forma vertical no reator, o fluxo do líquido foi facilitado, acarretando maior arraste de sólidos.

A concentração média de sólidos no efluente dos reatores RB e RP foi superior aos resultados de 1400 mg SSV.L⁻¹ obtidos por Keskin, Giusti e Azbar (2012)e de 1500 mg.L⁻¹ verificados por Perna *et al.* (2012) nas amostras do efluente do reator. Essa elevada concentração no efluente pode indicar lavagem de SSV do material suporte, ocasionada pela aplicação de altas taxas de carregamento orgânico e pelo crescimento excessivo da biomassa (SHOW et al., 2010).

Zhang *et al.* (2008) observaram que a taxa de carregamento orgânico de 40 g.L⁻¹ favoreceu a diminuição do biofilme aderido ao material suporte. Com o aumento na espessura do biofilme, devido ao crescimento celular acelerado, a fixação de microorganismos se tornou menor. Como resultado, a biomassa separou-se do meio suporte, causando fragmentação do biofilme e elevando a concentração de sólidos no efluente do reator.

No reator RB durante a aplicação da 3^a (26 g.L⁻¹.d⁻¹) e da 5^a (22 g.L⁻¹.d⁻¹) cargas orgânicas volumétricas foram observadas as maiores concentrações médias de sólidos suspensos no efluente de 3770 e 3690 mg.L⁻¹, respectivamente. Nestas condições operacionais também foi notada produção de grande volume de biogás de 11 e 10 L.d⁻¹, o que pode ter contribuído para o arraste da biomassa no efluente, elevando a concentração de SSV na saída dos reatores.

Situação semelhante foi observada durante a aplicação da 3^ª carga orgânica volumétrica no reator RP, pois a concentração média de SSV no efluente de 2270 mg.L⁻¹ coincidiu com volume elevado na produção de biogás de 9,0 L.d⁻¹. A liberação de gás, acumulado entre os interstícios do suporte, pode ter contribuído para o arraste da biomassa, levando ao aumento da concentração de SSV no efluente do reator RP.

A quantificação da biomassa aderida ao suporte demonstra que bambu e polietileno de baixa densidade foram matrizes eficazes na fixação dos micro-organismos, pois foram obtidas 445 g de biomassa no reator RB e 440 g de biomassa no reator RP após 46 dias de operação. Perna *et al.* (2012) verificaram acúmulo de 800 g de biomassa aderida ao suporte utilizando soro de leite como substrato em concentrações que variaram de 22 a 37 g.L⁻¹.d⁻¹ ao final de 60 dias de experimento.

5.6 Produção de hidrogênio

5.6.1 Percentual médio de hidrogênio no biogás

Na Figura 14 são apresentados os percentuais médios de H₂ no biogás em função da carga orgânica volumétrica aplicada para os reatores RB e RP.





É possível notar que foram obtidos percentuais médios de H₂ no biogás de 21 ± 6% para o reator RB e 23 ± 11% para o reator RP. O reator RP apresentou maior variação no percentual de H₂ durante o período experimental, com valores entre 4,8% (1^a COV, de 28 g.L⁻¹.d⁻¹) e 29% (2^a COV, de 15 g.L⁻¹.d⁻¹). Em contrapartida, o reator RB se mostrou mais estável, com percentual mínimo de 15% (5^a COV, de 22 g.L⁻¹.d⁻¹) e máximo de 25% (6^a COV, de 22 g.L⁻¹.d⁻¹).

Os resultados obtidos foram similares aos verificados por Shida *et al.* (2009) e por Arooj *et al.* (2008), que obtiveram percentuais de H_2 no biogás de 28 e 30%, respectivamente, em sistemas operados com TDH de 4 h.

A oscilação nos percentuais de hidrogênio pode ser justificada pela instabilidade do sistema. Como a produção de hidrogênio é realizada em uma fase intermediária do processo anaeróbio, a alta velocidade de crescimento microbiano pode provocar alterações nas inter-relações entre os micro-organismos, no metabolismo e na competição por substrato (FERNANDES, 2008).

Apesar do volume elevado de biogás de 10 L.d⁻¹ observado no reator RB durante a aplicação da 5^a COV, de 22 g.L⁻¹.d⁻¹, foi verificado percentual de hidrogênio no gás de 15%.

A mesma tendência para produção de biogás foi observada no reator RP com 11 e 10 L.d⁻¹ durante a aplicação das 4^a (35 g.L⁻¹.d⁻¹) e 5^a (22 g.L⁻¹.d⁻¹) cargas orgânicas volumétricas e percentuais de hidrogênio no gás de 13 e 19%, respectivamente. Grandes volumes de biogás com baixos percentuais de H₂ são indícios de elevadas concentrações de CO₂, resultado da elevada quantidade de biomassa nos reatores (SREETHAWONG et al., 2010).

5.6.2 Produção de hidrogênio por açúcares totais consumidos

A produção média de biogás e de hidrogênio em função dos açúcares totais consumidos e da carga orgânica volumétrica aplicada para os reatores RB e RP é apresentada na Figura 15.



Figura 15 Produção média de biogás e de H_2 por açúcar total consumido em função da carga orgânica volumétrica aplicada para os reatores RB e RP.

O rendimento médio do biogás em função do consumo dos açúcares totais foi de 2,3 ± 1,0 L biogás.g⁻¹açúcar para o reator RB e de 2,0 ± 1,7 L biogás.g⁻¹açúcar para o reator RP. Os valores médios observados para produção de hidrogênio em função do consumo de açúcares totais foi de 0,44 ± 0,2 L H₂.g⁻¹açúcar para o reator RB e de 0,35 ± 0,3 L H₂.g⁻¹açúcarpara o reator RP.

Em média, os resultados obtidos foram semelhantes aos verificados por Keskin, Giusti e Azbar (2012), que obtiveram 363 mL H₂.g⁻¹ de sacarose com TDH de 3 h. Em outros trabalhos que utilizaram água residuária do processamento de mandioca como substrato foram observados rendimentos inferiores aos notados nos reatores RB e RP. Argun *et al.* (2008), obtiveram 281 mL H₂.g⁻¹amido com concentração de 20 g.L⁻¹ e relação C:N igual a 200 em um reator operado em batelada a 37 °C. Zong *et al.* (2009) notaram rendimento de 199 mL H₂.g⁻¹amido, em um reator batelada sequencial operado a 37 °C e com concentração de 18 g.L^{-1.}

No reator RB o maior rendimento, de 0,6 L H₂.g⁻¹açúcar, foi verificado durante a aplicação da 3^a COV, de 26 g.L⁻¹.d⁻¹; simultaneamente foi observada elevada produção de hidrogênio de 2,8 L.d⁻¹. No reator RP, o melhor rendimento de 0,8 L H₂.g⁻¹açúcar foi observado durante a aplicação da 5^a COV, de 22 g.L⁻¹.d⁻¹. Durante a aplicação desta carga foi verificada a maior relação C:N (de 59) dentre as cargas orgânicas volumétricas aplicadas.

Com baixas concentrações de nitrogênio no meio, o consumo de substrato pelos micro-organismos pode ter sido utilizado para produção de hidrogênio ao invés de ser direcionado para o crescimento da biomassa. Resultado semelhante foi observado por Sreethawong *et al.* (2010), que em reator batelada obtiveram rendimento máximo de 432 mL H₂.g⁻¹ amido com relação C:N igual a 45.

5.6.3 Produção de biogás e hidrogênio

Nas Figuras 16 e 17 são apresentadas as variações do volume de biogás e de hidrogênio produzidos em função da carga orgânica aplicada nos reatores RB e RP.



Figura 16 Vazões médias de biogás e de H_2 em função da carga orgânica aplicada para o reator RB.



Figura 17 Vazões médias de biogás e de H_2 em função da carga orgânica aplicada para o reator RP.

O volume médio observado para produção de biogás foi de 7,5 \pm 4,7 L.d⁻¹ para o reator RB e de 6,7 \pm 4,9 L.d⁻¹ para o reator RP. O maior volume de biogás gerado nos reatores RB e RP foi observada durante a aplicação das COV de 26, 35 e 22 g.L⁻¹.d⁻¹ (Figuras 16 e 17, respectivamente). Resultados semelhantes foram observados por Lima e Zaiat (2012), que obtiveram vazões médias de biogás de 5,0 L.d⁻¹ (225,5 mL.h⁻¹) utilizando polietileno de baixa densidade como material suporte em TDH de 2 h.

As maiores vazões de biogás de 12,0 L.d⁻¹ no reator RB e de 11,0 L.d⁻¹ no reator RP, foram observadas durante a aplicação da 4^a COV, de 35 g.L⁻¹.d⁻¹. Aliada à elevada produção de biogás, foi verificado aumento nos percentuais de ácido propiônico, que alcançaram 20 e 24% da concentração total de ácidos nos respectivos reatores.

Esse comportamento foi similar ao verificado por Peixoto *et al.* (2010) que observaram diminuição dos espaços vazios causada pelo crescimento da biomassa, aumento nos níveis de CO₂ no biogás e da concentração de ácido propiônico, favorecido por baixas relações C:N no substrato de 100:1,8 em um reator anaeróbio com polietileno de baixa densidade como meio suporte.

A produção de biogás pode estar diretamente relacionada à baixa relação C:N de 39, que propiciou crescimento rápido da biomassa e pode ter colaborado para o aumento dos níveis de CO₂. Em nenhuma das cargas orgânicas volumétricas aplicadas foi verificada presença de metano no biogás, indicando ausência de atividade metanogênica.

Foram obtidas vazões médias de hidrogênio de 1,8 \pm 1,0 L.d⁻¹ para o reator RB e de 1,0 \pm 0,7 L.d⁻¹ para o reator RP. Elevados volumes de gás hidrogênio de 2,8, e 2,9L.d⁻¹ foram produzidos no reator RB durante a aplicação da 3^a (26 g.L⁻¹.d⁻¹) e 4^a (35 g.L⁻¹.d⁻¹) COV,

respectivamente. A elevada produtividade pode estar relacionada aos percentuais de ácido butírico (53-50%) e acético (25-24%), resultando em relações entre esses ácidos HBu/HAc de 2,2 e 2,1, respectivamente.

É possível notar produção volumétrica de hidrogênio de 2,2, 1,6 e 1,9 L.d⁻¹ para o reator RP durante a aplicação da 3^a (26 g.L⁻¹.d⁻¹), 4^a (35 g.L⁻¹.d⁻¹) e 5^a (22 g.L⁻¹.d⁻¹) cargas orgânicas volumétricas, respectivamente. A 3^a COV foi marcada por elevados percentuais de ácido butírico (62%) e acético (20%), resultando em uma relação HBu/HAc de 3,2

De acordo com Kim *et al.* (2004), relações HBu/HAc entre 2,1 e 2,7 são indicativas de altas taxas de produção de hidrogênio. Chen, Sung e Chen (2009) verificaram que o pH inicial elevado favorece o aumento na relação HBu/HAc. Em reator batelada sequencial operado a 35 °C, com substrato à base de sacarose e concentração de 25 g.L⁻¹, os autores observaram que valores pH iniciais entre 5,7 e 6,7 favoreceram o aumento da relação entre os ácidos butírico e acético, obtendo relações HBu/HAc sempre superiores a 1.

Arooj *et al.* (2008), obtiveram máxima taxa de produção de hidrogênio de 5,59 L.d⁻¹ em TDH 6 h e relação HBu/HAc de 2,7. Os autores verificaram que a produção de hidrogênio foi reduzida para 3,8 L.d⁻¹ e que a relação HBu/HAc diminuiu para 1,5 quando o reator passou a ser operado em TDH 4 h. De acordo com os autores, nos menores TDH avaliados de 6, 4 e 3 h, o fator que mais afetou a produção de hidrogênio foi a diminuição na concentração de butirato.

De acordo com Whang *et al.* (2012), a diminuição do TDH provoca redução nas relações entre HBu/HAc e está relacionada à elevada demanda energética necessária para o crescimento da biomassa. A produção de acetato rende mais ATPs que a produção de butirato, e, dessa forma, direcionar a via metabólica nessa direção aumenta o ganho energético necessário para o rápido crescimento celular observado em baixos valores de TDH.

O uso da relação HBu/HAc é um parâmetro útil para estimar a produção de hidrogênio, no entanto, pode não refletir o desempenho real dos reatores durante a fermentação. De acordo com Cheng *et al.* (2008), a relação entre os ácidos butírico e acético sozinha é insuficiente para justificar a produção de hidrogênio e deve estar atrelada a fatores com pH, TDH e concentração do substrato.

De acordo com Van Ginkel e Logan (2005), durante a produção de fermentativa de hidrogênio maior quantidade de energia é gerada quando o acetato é produzido (4 mol de ATP/mol glicose). Em concentrações elevadas de hidrogênio, o NAD+ só pode ser regenerado se compostos como butirato e etanol são gerados. Quando o butirato é produzido são gerados 3 mol ATP/mol glicose.

Lima e Zaiat (2012) obtiveram taxa de produção de hidrogênio de 2,9 L.d⁻¹ em um reator de leito fixo com polietileno como meio suporte operado em TDH de 2 h. Resultados semelhantes foram obtidos por Keskin, Giusti e Azbar (2012), que observaram produção de

hidrogênio de 2,7 L.d⁻¹ em substrato a base de sacarose e TDH de 3 h; e Show *et al.* (2010), que obtiveram 3,12 L.d⁻¹ de hidrogênio utilizando glicose como substrato em um reator mistura completa em TDH de 3 h.

Wu e Lin (2004) obtiveram taxa de produção de hidrogênio de 2,39 L.d⁻¹ com carga orgânica aplicada de 40 g.L⁻¹, utilizando melaço com substrato. De acordo com Lin *et al.* (2012), a taxa de produção de hidrogênio em sistemas contínuos alimentados com água residuária é dependente da taxa de carregamento orgânico; e o aumento na concentração de substrato leva ao aumento na taxa de produção de hidrogênio.

Perna *et al.* (2012) utilizaram soro de leite como substrato e fixaram as cargas orgânicas aplicadas em 22, 33 e 37 g.L⁻¹ em um reator de leito fixo empregado na produção fermentativa de hidrogênio. Os autores obtiveram taxas médias de produção de 0,06, 0,8 e 1,0 L.d⁻¹ para as respectivas cargas. De acordo com os autores, a produção de hidrogênio foi estimulada pelo aumento na carga aplicada.

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos experimentalmente, pode-se concluir que:

- É possível produzir biogás com percentuais de hidrogênio de até 29% em reatores anaeróbios de leito fixo utilizando água residuária de indústria de fécula de mandioca;
- Bambu e polietileno foram materiais suporte efetivos na fixação dos microorganismos;
- Nos dois reatores o maior volume de hidrogênio foi obtido quando se verificaram elevados percentuais de ácido butírico entre os metabólitos analisados;
- A baixa relação C:N observada na água residuária de indústria de fécula de mandioca propiciou rápido crescimento da biomassa, colaborando para a diminuição do tempo de operação dos reatores;
- Devido à variação na composição do substrato, verificada nas cargas orgânicas volumétricas aplicadas, o sistema não alcançou o estado de equilíbrio dinâmico aparente.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tendo em vista os resultados obtidos experimentalmente, são sugeridos para a condução de futuros trabalhos:

- Avaliar tempos de detenção hidráulica superiores a 4 h na produção biológica de hidrogênio a partir da água residuária de indústria de fécula de mandioca;
- Controlar a variação das cargas orgânicas volumétricas aplicadas;
- Controlar a relação C:N no afluente;
- Avaliar o uso da água residuária de indústria de fécula de mandioca sem correção do pH inicial;
- Avaliar a aplicação das cargas orgânicas volumétricas após o reator atingir o estado de equilíbrio dinâmico aparente.

8 REFERÊNCIAS

ABO-HASHESH, M.; WANG, R.; HALLENBECK, P. C. Metabolic engineering in dark fermentative hydrogen production; theory and practice. **Bioresource Technology**, New York, v.102, p.8414-8422, 2011.

ADAMS, M. W. W.; MORTENSON, L. E.; CHEN, J. S. Hydrogenase. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 594, p. 105-106, 1981.

AKUTSU, Y.; LI, Y. Y.; HARADA, H.; YU, H. Q. Effects of temperature and substrate concentration on biological hydrogen production from starch. **International Journal of Hydrogen Energy**, Amsterdam,v. 34, p.2558-2566, 2009.

ALMEIDA, G. B.; BUENO, G. F.; DEL BIANCHI, V. L. Tratamento da manipueira em sistema anaeróbio de leito fixo. **Revista Raízes e Amidos Tropicais**, Botucatu, v.6, p.192-200, 2010.

ANTONOPOULOU, G.; GAVALA, H. N.; SKIADAS, I. V.; ANGELOPOULOU, K.; LYBERATOS, G. Biofuels generation from sweet sorghum: Fermentative hydrogen production and anaerobic digestion of the remaining biomass. **Bioresource Technology**, New York, 2007.

AQUINO, S. F.; CHERNICHARO, C. A. Acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGV) em reatores anaeróbios sob estresse: causas e estratégias de controle. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro, v.10, p.152-161, 2005.

ARGUN, H.; KARGI, F.; KAPDAN, I. K.; OZTEKIN, R. Biohydrogen production by dark fermentation of wheat powder solution: Effects of C/N and C/P ratio on hydrogen yield and formation rate. **International Journal of Hydrogen Energy**, Amsterdam,v.33, p.1813-1819, 2008.

AROOJ, M. F.; HAN, S. K.; KIM, S. H.; KIM, D. H.; SHIN, H. S. Continuous biohydrogen production in a CSTR using starch as a substrate. **International Journal of Hydrogen Energy**, Amsterdam, v. 33, p. 3289-3294, 2008.

BABU, V. L.; MOHAN, S. V.; SARMA, P. N. Influence of reactor configuration on fermentative hydrogen production during wastewater treatment. **International Journal of Hydrogen Energy**, Amsterdam, v. 34, p. 3305-3312, 2009.

BAGHCHEHSARAEE, B.; NAKHLA, G.; KARAMANEV, D.; MARGARITIS, A. Fermentative hydrogen production by diverse microflora.**International Journal of Hydrogen Energy**, Amsterdam, v. 35, p. 5021-5027, 2010.

BAGHCHEHSARAEE, B.; NAKHLA, G.; KARAMANEV, D.; MARGARITIS, A.; REID, G. The effect of heat pretreatment temperature on fermentative hydrogen production using mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, Amsterdam, v. 33, p. 4064-4073, 2008.

BARANA, A. C. Avaliação de tratamento de manipueira em biodigestores de fase acidogênica e metanogênica.2000. 105 f. Tese (Doutorado em Agronomia). Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2000.

BARROS, A. R. Influência de diferentes materiais suporte na produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fluidificado. 2010. 101 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Escola de Engenharia de São Carlos, São Carlos, 2010.

BARROS, A. R.; AMORIM, E. L. C.; REIS, C. M.; SHIDA, G. M.; SILVA, E. L. Biohydrogen production in anaerobic fluidized bed reactors: Effect of support material and hydraulic retention time. **International Journal of Hydrogen Energy**, Amsterdam, v. 35, p. 3379-3388, 2010.

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

BARTELS, J. R.; PATE, M. B.; OLSON, N. K.An economic survey of hydrogen production from conventional and alternative energy sources.**International Journal of Hydrogen Energy**, Amsterdam, v.35, p.8371-8384, 2010.

BOE, K.; BATSTONE, D. J.; STEYER, J. P.; ANGELIDAKI, I. State indicators for monitoring the anaerobic digestion process. **Water Research**, Oxford, v.44, p. 5973-5980, 2010.

CAPPELLETTI, B. M.; REGINATTO, V.; AMANTE, E. R.; ANTÔNIO, R. V. Fermentative production of hydrogen from cassava processing wastewater by Clostridium acetobutylicum. **Renewable Energy**, v.36, p. 3367-3372, 2011.

CEPEA. Produção de fécula em 2010 é a menor desde 2005; valor da produção é o maior desde 2004. Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada – ESALQ/USP, 2011.

CEREDA, M. P. Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca. São Paulo. Fundação Cargill, 2001, v. 4, Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas.

CERQUEIRA, M. B. R.; DIAS, A. N.; CALDAS, S. S.; SANTANA, F. B.; D'OCA, M. G. M.; PRIMEL, E. G. Validação de método para determinação de ácidos orgânicos voláteis em efluentes de reatores anaeróbios empregando cromatografia líquida. **Química Nova**, São Paulo, v.34, p.156-159, 2011.

CHEN, W. H.; SUNG, S.; CHEN, S, Y. Biological hydrogen production in an anaerobic sequencing batch reactor: pH and cyclic duration effects. **International Journal of Hydrogen Energy**, Amsterdam,v.34, p.227-234, 2009.

CHEN, W. M.; TSENG, Z. J.; LEE, K. S.; CHANG, J. S. Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge. **International Journal of Hydrogen Energy**, Amsterdam,v.30, p.1063-1070, 2005.

CHERNICHARO, C. A. L. **Princípios do tratamento biológico de águas residuárias, Reatores anaeróbios.** 2. ed. Belo Horizonte: Departamento de engenharia sanitária e ambiental, Universidade Federal de Minas Gerais, 2007.

CHONG, M. L.; RAHMAN, N. A.; YEE, P. L.; AZIZ, S. A.; RAHIM, R. A.; SHIRAI, Y.; HASSAN, M. A. Effects of pH, glucose and iron sulfate concentration on the yield of biohydrogen by *Clostridium butyricum* EB6. **International Journal of Hydrogen Energy**, Amsterdam, v.34, p.8859-8865, 2009.

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

DAS, D.; KHANNA, N.; VEZIROGLU, N. T.Recent developments in biological hydrogen production processes. **Chemical Industry & Chemical Engineering Quaterly,** v.14, p. 57-67, 2008.

DAS.D.; VEZIROGLU, T. N. Advances in biological hydrogen production processes. International Journal of Hydrogen Energy, Amsterdam, v. 33, p. 6046 – 6057, 2008.

DEL BIANCHI, V. L. Balanços de massa e energia do processamento de farinha de mandioca em uma empresa de médio porte do Estado de São Paulo. Botucatu, 1998. 107p. Tese (Doutorado em Ciências Agronômicas) - Universidade Estadual Paulista (UNESP).

DONG, L.; ZHENHONG, Y.; YONGMING, S.; XIAOYING, K.; YU, Z. Hydrogen production characteristics of the organic fraction of municipal solid wastes by anaerobic mixed culture fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, Amsterdam, v. 34, p.812-820, 2009.

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

EATON, A. D.; CLESCERI, L. S.; GREENBERG, A. E. **Standard Methods for Examination of Water and Wastewater.**21th. American Public Health Association. 2005. 1600 p.

ELSESHBISHY, E.; HAFEZ, H.; DHAR, B. R.; NAKHLA, G. Single and combined effect of various pretreatment methods for biohydrogen production from food waste.**International Journal of Hydrogen Energy**, Amsterdam, v.36, p.11379-11387, 2011a.

ELSESHBISHY, E.; HAFEZ, H.; NAKHLA, G. Viability of ultrasonication of food waste for hydrogen production.**International Journal of Hydrogen Energy**, Amsterdam, doi:10.1016/j.ijhydene.2011.01.008, 2011b.

FERNANDES, B. S. **Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo**, 2008. 97 f. Tese (Doutorado em Engenharia) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

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**, Amsterdam, v. 31, p. 1164-1175, 2005.

GOLDEMBERG, J. LUCON, O. Energia e meio ambiente no Brasil. **Estudos Avançados**, São Paulo, v.21, n.59, Apr.2007.

GROXKO, M. **Análise da conjuntura agropecuária safra 2010-2011.** Curitiba: Secretaria da Agricultura e do Abastecimento, set. 2010. Disponível em: http://www.seab.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/mandioca_2007_08.doc. Acesso em: 5 maio. 2012.

GUO, X. M.; TRABLY, E.; LATRILLE, E.; CARRÈRE, H.; STEYER, J. P. Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. **International Journal of Hydrogen Energy**, Amsterdam, v. 35, p. 10660-10673, 2010.

HAFEZ, H.; NAKHLA, G.; EL NAGGAR, M. H.; ELBESHBISHY, E.; BAGHCHEHSARAEE, B. Effect of organic loading on a novel hydrogen bioreactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, Amsterdam,v.35, p.81-92, 2010.

HALLENBECK, P. C. Fermentative hydrogen production: Principles, progress and prognosis. **International Journal of Hydrogen Energy**, Amsterdam, v. 34, p. 7379-7389, 2009.

HAWKES, F. R.; HUSSY, I.; KYAZZE, G.; DINSDALE, R.; HAWKES, D. L. Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: Principles and progress. **International Journal of Hydrogen Energy**, Amsterdam, v. 32, p.172-184, 2007.

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

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Estatística da produção agrícola. **Rio de Janeiro: IBGE, 2011**. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/estProdAgr_201109. pdf>.Acesso em: 12 nov. 2012.

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

JUNG, K. W.; KIM, D. H.; KIM, S. H.; SHIN.H. S. Bioreactor design for continuous dark fermentative hydrogen production.**Bioresource Technology**, New York, v.102, p.8612-8620, 2011.

KAEWKANNETRA, P.; CHIWES, W.; CHIU, T. Y. Treatment of cassava mill wastewater and production of electricity through microbial fuel cell technology. **Fuel**,v.90, p. 2746-2750, 2011.

KAPDAN I.K.; KARGI, F. Bio-hydrogen production from waste materials. **Enzyme and Microbial Technology**, Izmir, v. 38, p.569-528, 2006.

KESKIN, T., GIUSTI, L.; AZBAR, N. Continuous biohydrogen production in immobilized biofilmsystem versus suspended cell culture.**International Journal of Hydrogen Energy**, Amsterdam, v. 37, p. 1418-1424, 2012.

KHANAL, S. K.; CHEN, W-H.; LI, L.; SUNG, S. Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products. **International Journal of Hydrogen Energy**, Amsterdam, v. 29, p. 1123-1131, 2004.

KIM, I. S.; HWANG, M. H.; JANG, N. J.; HYUN, S. H. S. H.; LEE, S. T. Effect of low pH on the activity of hydrogen utilizing methanogen in biohydrogen process. **International Journal of Hydrogen Energy**, Amsterdam, v. 29, p. 1133-1140, 2004.

KIM, S. H.; HAN, S. K.; SHIN, H. S. Effect of substrate concentration on hydrogen production and 16 rDNA-based analysis of the microbial community in a continuous fermenter. **Process Biochemistry**, London, v.41, p. 199-207, 2006.

KIM, T. H.; LEE, Y.; CHANG, K. H.; HWANG, S. J. Effects of initial lactic acid concentration, HTRs, and OLRs on bio-hydrogen production from lactate-type fermentation. **Bioresource Technology**, New York, v.103, p.136-141, 2012.

KUNZLER, K. R.; TORRES, D. G. B.; GOMES, S. D.; PÁDUA, A. B.; POLESE, G. **Tratamento anaeróbio da manipueira com utilização de meios suporte: remoção de DBO e produção de biogás**. In: XIII Congresso Brasileiro de Mandioca, julho, 2009. Disponível em: http://www.cerat.unesp.br/compendio/artigos.html. Acesso em: 18 out. 2010.

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

LEITE, J. A. C.; FERNANDES, B. S.; POZZIA, E.; BARBOZA, B. M.; ZAIAT, M. Application of an anaerobic packed-bed bioreactor for the production of hydrogen and organic acids. **International Journal of Hydrogen Energy**, Amsterdam, v. 33, p. 579-586, 2008.

LETTINGA, A. F. M.; VAN VELSEN, S. H.; ZEEUW, W. Feasibility of anaerobic digestion for the direct treatment of, and the energy recovery from urban wastes. **Studies in Environmental Sciences**, v.9, p. 97-108, 1981.

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

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

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

LIN, C. Y.; LAY, C. H. Carbon/nitrogen-ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora. **International Journal of Hydrogen Energy,** Amsterdam,v. 29, p. 41-45, 2004.

LIN, C. Y.; LAY, C. H.; SEN, B.; CHU, C. Y.; KUMAR, G.; CHEN, C. C.; CHANG, J. S. Fermentative hydrogen production from wastewater: review and prognosis. International Journal of Hydrogen Energy, 2012. Disponível em: http://doi:10.1016/j.ijhydene.2012.02.072>. Acesso em: 15 jul. 2012.

LUCON, O.; GOLDEMBERG, J. Crise financeira, energia e sustentabilidade no Brasil. **Estudos Avançados**, São Paulo, v.23, n.65, 2009.

LUO, G.; XIE, L.; ZOU, Z.; ZHOU, Q.; WONG, J. Y. Fermentative hydrogen production from cassava stillage by mixed anaerobic microflora: Effects of temperature and pH. **Applied Energy**, England, v.87, p.3719-3717, 2010.

MADSEN, M.; HOLM-NIELSEN, J. B.; ESBENSEN, K. H. Monitoring of anaerobic digestion processes: A review perspective. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.15, p. 3141-3155, 2011.

MATSUMOTO, M.; NISHIMURA, Y. Hydrogen production by fermentation using acetic acid and lactic acid.**Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v.103, p.236-241, 2007.

MCCARTY, P. L. Anaerobic waste treatment fundamentals – I chemistry and microbiology.Public Works.p.107-112, 1964.

MOHAN, S. V. Harnessing of biohydrogen from wastewater treatment using mixed fermentative consortia: Process evaluation towards optimization. **International Journal of Hydrogen Energy**, Amsterdam, v.34, p.7460-7474, 2009.

MU, Y.; YU, H-Q.; WANG, G. Evaluation of three methods for enriching H2-producing cultures from anaerobic sludge. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.40, p.947-953, 2007.

OH, S. E.; VAN GINKEL, S.; LOGAN, B. E. The relative effectiveness of pH control and heat treatment for enhancing biohydrogen gas production. **Environmental Science Technology**, Pittsburgh, v.37, p.5186-5190, 2003.

O-THONG, S.; HNIMAN, A.; PRASERTSAN, P.; IMAI, P. Biohydrogen production from cassava starch processing wastewater by thermophilic mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, Amsterdam, v.36, p.3409-316, 2011.

PEIXOTO, G. **Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo e fluxo ascendente a partir de água residuária de indústria de refrigerante**, 2008. 96 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

PEIXOTO, G.; SAAVEDRA, N. K.; VARESCHE, M. B. A.; ZAIAT, M. Hydrogen production from soft-drink wastewater in an upflow anaerobic packed-bed reactor.**International Journal of Hydrogen Energy**, Amsterdam, v. 36, p. 8953-8966, 2011.

PERNA,V.; CASTELLÓ, E.; WENZEL, J.; ZAMPOL, C.; LIMA, D. M. F.; BORZACCONI, L.; VARESCHE, M. B.; ZAIAT, M.; EACHEBEHERE, C. Hydrogen production in an upflow anaerobic packed-bed reactor used to treat cheese whey. **International Journal of Hydrogen Energy**, Amsterdam, 2012. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydenc.2012.10.022>. Acesso em: 10 nov. 2012.

PINTO, P. H. M. Tratamento da manipueira de fecularia em biodigestor anaeróbio para a disposição em corpo receptor, rede pública ou uso em fertirrigação. 2008. 101 f. Dissertação (Energia na Agricultura) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2008.

RAJASIMANN, M.; KARTHIKEYAN, C. Aerobic digestion of starch wastewater in a fluidized bed bioreactor with low density biomass support. **Journal of Hazardous Materials**, Tamil Nadu, v.143, p.82-86, 2007.

RIBAS, M. M. F.; CEREDA, M. P.; VILLAS BÔAS, R. L. Use of cassava wastewater treated anaerobically with alkaline agents as fertilizer for maize (*Zea mays L.*). Brazilian Archives of Biology and Technology, Curitiba, v. 35, p.55-62, 2010.

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

SÁNCHEZ, E.; WEILAND, P.; TRAVIESO, L. Effect of the organic volumetric loading rate on soluble COD removal in down flow anaerobic fixed bed reactors.**Bioresource Technology**, New York, v. 47, p. 173-176, 1994.

SHIDA, G. M. **Produção de hidrogênio e ácidos orgânicos por fermentação acidogênica em reator anaeróbio de leito fluidificado**, 2008. 105 f. Dissertação (Hidráulica e Saneamento). Escola de Engenharia de São Carlos, São Carlos, 2008.

SHIDA, G. M.; BARROS, A. R.; REIS, C. M.; AMORIM, E. L. C.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z.; SILVA, E. L. Long-term stability of hydrogen and organic acids production in an anaerobic fluidized-bed reactor using heat treated anaerobic sludge inoculum. **International Journal of Hydrogen Energy**, Amsterdam, v. 34, p. 3679-3688, 2009.

SHOW, K. Y.; ZHANG, Z. P.; TAY, J. H.; LIANG, D. T.; LEE, D. J.; REN, N.; WANG, A. Critical assessment of anaerobic processes for continuous biohydrogen production from organic wastewater. **International Journal of Hydrogen Energy**, Amsterdam, v. 35, p. 13350-13355, 2010.

SILVA, A. J.; HIRASAWA, M. B.; VARESCHE, M. B.; FORESTI, E.; ZAIAT, M. Evaluation of support materials for the immobilization of sulfate-reducing bacteria and methanogenic archea. **Anaerobe**, London, v.12, p.93-98, 2006.

SINHA, P., PANDEY, A. Na evaluative report and challenges for fermentative biohydrogen production.**International Journal of Hydrogen Energy**, Amsterdam, v.36, p.7460-7478, 2011.

SKONIECZNY, M. T.; YARGEAU, V. Biohydrogen production from wastewater by *Clostridium beijerinckii*: Effects of pH and substrate concentration. **International Journal of Hydrogen Energy**, Amsterdam, v. 34, p.3288-3294, 2008.

SOUZA, L. S.; FIALHO, J. F. **Cultivo da mandioca para a região do cerrado**. Embrapa Mandioca e Fruticultura, jan. 2003 [revista eletrônica]. Disponível em: http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mandioca/mandioca_cerrados/index.htm>.Acesso em: 10 out. 2011.

SPEECE, R. E. Anaerobic biotechnology for industrial wastewater treatment. **Environmental Science & Technology**, Pittsburgh, v.17, p.416a-427a, 1983.

SREETHAWONG, T.; CHATSIRIWATANA, S.; RANGSUNVIGIT, P.; CHAVADY, S. Hydrogen production from cassava wastewater using a anaerobic sequencing batch reator: Effects of operational parameters, COD: N ratio, and organic acid composition. **International Journal of Hydrogen Energy**, Amsterdam, v. 35, p. 4092-4102, 2010.

TORRES, D. G. B. **Meios suporte no tratamento anaeróbio da manipueira.** 2009. 54 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2009.

VARDAR-SCHARA, G.; MAEDA, T.; WOOD, T. K. Metabolically engineered bacteria for producing hydrogen via fermentation. **Microbial Biotechnology**, Seoul, v.2, p.107-125, 2008.

SÁ, L. R. V.; OLIVEIRA, T. C.; SANTOS, T. F.; MATOS, A.; CAMMAROTA, M. C.; OLIVEIRA, E. M. M.; FERREIRA-LEITÃO, V. S. Hydrogenase activity monitoring in the fermentative hydrogen production using heat pretreated sludge: A useful approach to evaluate bacterial communities performance. **International Journal of Hydrogen Energy**, Amsterdam, v. 36, p. 7543-7549, 2011.

VASQUEZ, I. V.; VARALDO, H. M. P. Hydrogen production by fermentative consortia. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, p. 1000-1013, 2009.

VRIJE, T.; CLAASSEN, P. A. Dark Hydrogen Fermentations. In: REITH, J. H.; WIJFFELS, R.H.; BARTEN, H.: **Bio-methane & Biohydrogen: Status and perspectives of biological methane and hydrogen production**. Holland: Dutch Biological Hydrogen Foundation: p. 103-123, 2003.

WATTHIER, E. Digestão anaeróbia de água residuária de fecularia em reatores de leito fixo utilizando meio suporte de anéis de bambu e de PVC. 2011. 74 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2009.

WANG, J.; WAN, W. Effect of temperature on fermentative hydrogen production by mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, Amsterdam, v. 33, p. 5392-5397, 2008b.

WANG, J.; WAN, W. Comparison of different pretreatment methods for enriching hydrogenproducing bacteria from digested sludge. **International Journal of Hydrogen Energy**, Amsterdam, v. 33, p. 2934-2941, 2008a.

WANG, J.; WAN, W. Effect of temperature on fermentative hydrogen production by mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, Amsterdam, v. 34, p. 799-811, 2009.

WANG, J.; WAN, W. C. Combined effects of temperature and pH on biohydrogen production by anaerobic digested sludge.**Biomass and Bioenergy**, Oxford, v.35, p.3896-3901, 2011.

WHANG. L. M.; LIN, C. A.; LIU, F. C.; WU, C. W.; CHENG, H. H. Metabolic and energetic aspects of biohydrogen production of *Clostridium tyrobutyricum*: The effects of hydraulic retention time and peptone addition. **International Journal of Hydrogen Energy**, Amsterdam, v. 102, p. 8378-8383, 2011.

WON, S. G.; LAU, A. K. Effects of key operational parameters on biohydrogen production via anaerobic fermentation in a sequencing batch reactor.**Bioresource Technology**, New York,v.102, p.6876-6883, 2011.

WU, J. H.; LIN, C. Y. Biohydrogen production by mesophilic fermentation of food wastewater. **Water Science & Technology**, Oxford, v.49, p.223-228, 2004.

WU, S. Y.; HUNG, C. H.; LIN, C. Y.; LIN, P. L.; LEE, K. S.; LIN, C. N.; CHANG, F. Y.; CHANG, K. S. HRT-dependent hydrogen production and bacterial community structure of mixed anaerobic microflora in suspended, granular and immobilized sludge systems using glucose as the carbon substrate. **International Journal of Hydrogen Energy**, Amsterdam, v.33, p.1542-1549, 2008.

YOUNG, J. C. Factors affecting the design and performance of up flow anaerobic filters. **Water Science and Technology**, Oxford, v. 34, p. 133-155, 1991.

ZHANG, Z. P.; SHOW, K.Y.; LAY, J. H.; LIANG, D. T.; LEE, D. J. Biohydrogen production with anaerobic fluidized bed reactors—A comparison of biofilm-based and granule-based systems. **International Journal of Hydrogen Energy**, Amsterdam, v.33, p.1559-1564, 2008.

ZHENG, X. J.; YU, H. Q. Inhibitory effects of butyrate on biological hydrogen production with mixed anaerobic cultures. **Journal of Environmental Management**, London, v.74, p.65-70, 2005.

ZONG, W.; YU, R.; ZHANG, P.; FAN, M.; ZHOU, Z. Efficient hydrogen gas production from cassava and food waste by a two-step process of dark fermentation and photo-fermentation. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v.33, p. 1458-1463, 2009.

ZHU, H.; BÉLAND, M. Evaluation of alternative methods of preparing hydrogen producing seeds from digested wastewater sludge. **International Journal of Hydrogen Energy**, Amsterdam, v. 31, p. 1980-1988, 2006.