

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

**PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO VIA LACTATO OBTIDO A PARTIR DA
COFERMENTAÇÃO DE ÁGUA RESIDUÁRIA DE FECULARIA DE MANDIOCA E
GLICEROL**

RAFAELA ADAM BAIOCO

Cascavel
Agosto de 2025

RAFAELA ADAM BAIOCO

**PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO VIA LACTATO OBTIDO A PARTIR DA
COFERMENTAÇÃO DE ÁGUA RESIDUÁRIA DE FECULARIA DE MANDIOCA E
GLICEROL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Agrícola, área de concentração Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental.

Orientadora: Dra. Simone Damasceno Gomes.
Coorientadora: Dra. Cristiane Lurdes Andreani

Cascavel
Agosto de 2025

FICHA CATALOGRÁFICA ¹

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Adam Baioco, Rafaela
PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO VIA LACTATO OBTIDO A PARTIR DA
COFERMENTAÇÃO DE ÁGUA RESIDUÁRIA DE FECULARIA DE MANDIOCA E
GLICEROL / Rafaela Adam Baioco; orientadora Simone
Damasceno Gomes; coorientadora Cristiane Lurdes Andreani. --
Cascavel, 2025.
55 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico Campus de Cascavel) --
Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências
Exatas e Tecnológicas, Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Agrícola, 2025.

1. Biohidrogênio. 2. Água Residuária de Fecularia de
Mandioca. 3. Reator Contínuo de Tubos Múltiplos. I. Damasceno
Gomes, Simone , orient. II. Lurdes Andreani, Cristiane ,
coorient. III. Título.

¹ Revisão de português, inglês e de normas realizada por Silvana de Araújo Vaillões, em setembro de 2025.



unioeste

Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Reitoria
CNPJ 78.680.337/0001-84
Rua Universitária, 1619, Jardim Universitário
Tel.: (45) 3220-3000 - www.unioeste.br
CEP: 85819-110 - Cx. P.: 701
Cascavel - PARANÁ



RAFAELA ADAM BAIOCO

PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO VIA LACTATO OBTIDO A PARTIR DA COFERMENTAÇÃO DE ÁGUA RESIDUÁRIA DE FECULARIA DE MANDIOCA E GLICEROL

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, linha de pesquisa Saneamento Ambiental, APROVADO(A) pela seguinte banca examinadora:

Documento assinado digitalmente
 **SIMONE DAMASCENO GOMES**
Data: 13/08/2025 09:38:14-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Orientador(a) - Simone Damasceno Gomes

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)

Documento assinado digitalmente
 **LUCAS TADEU FUESS**
Data: 14/08/2025 17:28:30-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Lucas Tadeu Fuess

Universidade de São Paulo (USP)

Documento assinado digitalmente
 **JACKELINE TATIANE GOTARDO**
Data: 14/08/2025 21:25:37-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Jackeline Tatiane Gotardo

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)

Cascavel, 01 de agosto de 2025.

BIOGRAFIA

Rafaela Adam Baioco, nascida em 08 de abril de 1997, na cidade de La Paloma Del Espíritu Santo, Departamento Canindeyú, Paraguai. Engenheira Agrônoma, formada pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE). Possui especialização em Engenharia e Gestão Ambiental pela Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) e em Economia Rural pela UNIOESTE. Realizou residência técnica no Instituto Água e Terra (IAT) e no Departamento de Economia Rural (Deral) da Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento (SEAB). Atualmente, é discente de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola (PGEAGRI) da UNIOESTE – *Campus* Cascavel (PR), e cursa MBA em Gestão Empresarial pela Fundação Getúlio Vargas (FGV).

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu esposo, Jean, pelo companheirismo, apoio constante e amor em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me sustentar em cada etapa desta caminhada, pela força nos momentos difíceis, pela paz nos dias incertos e por me conceder a graça de concluir mais esta fase da minha vida. Ao Divino Espírito Santo, pela luz, discernimento e inspiração ao longo do percurso; que a presença divina continue guiando meus passos com sabedoria e propósito.

Ao meu esposo, Jean, minha base e maior companheiro nesta trajetória, pelo apoio constante, pela paciência nos momentos desafiadores e por acreditar em mim mesma quando eu duvidava. Obrigada por caminhar ao meu lado com amor, por me impulsionar a crescer e por me ensinar a enxergar cada obstáculo como uma oportunidade de evolução.

Ao nosso filho, Gabriel, que, ainda em gestação, já transforma meus dias com sentido, esperança e amor.

Aos meus pais, Luiz e Cleonice, por todo amor, pelos valores que me ensinaram, pelo exemplo de perseverança, pelo apoio incondicional em todas as fases da minha vida e pelas orações que sempre me sustentaram.

Às minhas irmãs, Raquel e Renata, pela presença constante, pelas palavras de incentivo e por serem fonte de afeto, amizade e força nos momentos em que mais precisei.

Aos meus sogros, Fortunato e Miriam, e cunhados, pelo carinho e incentivo ao longo do caminho.

À minha orientadora, professora Simone Damasceno Gomes, e à minha coorientadora, professora Cristiane Andreani, pelo acompanhamento, pelas orientações e pela dedicação.

Aos colegas do PGEAGRI, em especial, Eliandra e Luana, e orientados da graduação, especialmente à Karina, pela parceria e colaboração na realização deste trabalho.

Aos amigos e colegas da Unioeste, que tornaram esta trajetória mais leve e significativa.

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná, por ser o espaço que acolheu minha formação acadêmica. Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola (PGEAGRI), pela contribuição essencial à minha formação.

E a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste projeto, deixo meu sincero e profundo agradecimento.

Baioco, Rafaela Adam. **Produção de hidrogênio via lactato obtido a partir da cofermentação de água residuária de fecularia de mandioca e glicerol**. Orientadora: Simone Damasceno Gomes; Coorientadora: Cristiane Lurdes Andreani. 2025. 55 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2025.

RESUMO

A crescente demanda por fontes de energia sustentáveis impulsiona o interesse pela produção biológica de hidrogênio, que se destaca como alternativa limpa e eficiente. Este estudo investigou a viabilidade da produção de bioH_2 utilizando, como substrato, um meio rico em ácido lático, obtido a partir da cofermentação de água residuária de fecularia de mandioca (ARF) e glicerol. O processo foi dividido em duas etapas: (i) produção de fermentado rico em ácido lático (FLa) em reator anaeróbio operado em bateladas sequenciais (ASBR), a partir da cofermentação de ARF e glicerol (1,5% v/v), e (ii) conversão do FLA em bioH_2 em reator contínuo de tubos múltiplos (RCTM). A operação do RCTM contemplou a realização de três ensaios com cargas orgânicas volumétricas (COV) crescentes: 48, 72 e 96 g DQO $\text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$. Os resultados demonstraram que a etapa de fermentação láctica gerou um substrato homogêneo, rico em ácido lático (41%) e glicerina (52%). No RCTM, as maiores taxas de produção volumétrica de hidrogênio ($\text{PVH} = 1.960,3 \text{ mL H}_2 \text{ L}^{-1} \text{d}^{-1}$) e de vazão de biogás ($\text{VBG} = 9.360,9 \text{ mL d}^{-1}$) foram obtidas com a aplicação da maior COV aplicada. Em contrapartida, o maior rendimento de hidrogênio ($\text{RH} = 14,1 \text{ mmol H}_2 \text{ g DQO}^{-1}$) e maior conversão de ácido lático (95%) e de glicerol (65%) foram obtidos em COV intermediária. A análise dos metabólitos solúveis indicou a predominância da via butírica no ensaio E2, associada à maior estabilidade e à menor formação de compostos, como etanol e ácido propiônico, que desviam carbono e reduzem a produção de H_2 . Embora a via acética seja mais eficiente na geração de hidrogênio, a via butírica tende a ser favorecida em sistemas reais pela maior robustez operacional. Conclui-se que a integração da cofermentação da ARF com glicerol e da produção prévia de ácido lático, com posterior aplicação no RCTM para geração de H_2 , constitui uma abordagem promissora para a valorização de resíduos agroindustriais e a produção sustentável de bioH_2 .

Palavras-chave: bioH_2 ; ARF; RCTM; cofermentação anaeróbia; fermentação láctica.

Baioco, Rafaela Adam. **Hydrogen production via lactate obtained from the co-fermentation of wastewater from cassava starch production and glycerol**. Advisor: Simone Damasceno Gomes; Co-advisor: Cristiane Lurdes Andreani. 2025. 55 p. Dissertation (Master's Degree in Agricultural Engineering) - Graduate Program in Agricultural Engineering, Western Paraná State University (UNIOESTE), Cascavel, 2025.

ABSTRACT

The rising demand for sustainable energy sources is increasing interest in the biological production of hydrogen, which is a clean and efficient alternative to traditional energy sources. This study explored the possibility of producing bioH₂ using a medium rich in lactic acid as a substrate, obtained from the co-fermentation of cassava starch factory wastewater (CSW) and glycerol. The process was divided into two stages: (i) producing lactic acid-rich fermentate (FLa) in an anaerobic sequential batch reactor (ASBR) from co-fermentation of CSW and glycerol (1.5% v/v), and (ii) converting FLA to bioH₂ in a continuous multi-tube reactor (CMTR). The CMTR was tested with three increasing volumetric organic loads (VOL): 48, 72, and 96 g COD L⁻¹ d⁻¹. Results showed that the lactic fermentation stage produced a uniform substrate high in lactic acid (41%) and glycerin (52%). In the CMTR, the highest volumetric hydrogen production rates (VHP = 1,960.3 mL H₂ L⁻¹ d⁻¹) and biogas flow rates (BGF = 9,360.9 mL d⁻¹) occurred with the highest VOC applied. Conversely, the highest hydrogen yield (HY = 14.1 mmol H₂ g COD⁻¹) and the greatest conversion of lactic acid (95%) and glycerol (65%) occurred at intermediate COV levels. Soluble metabolite analysis suggested the predominance of the butyric pathway in the E2 test, associated with better stability and less formation of compounds like ethanol and propionic acid that divert carbon and decrease H₂ production. Although the acetic pathway is more efficient for hydrogen generation, the butyric pathway tends to be favored in real systems due to its greater operational stability. It is concluded that combining CSW co-fermentation with glycerol and prior lactic acid production, followed by application in CMTR for H₂ generation, is a promising strategy for valorizing agro-industrial waste and sustainably producing bioH₂.

Keywords: bioH₂; CSW; CMTR; anaerobic co-fermentation; lactic fermentation.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
3.1 Hidrogênio	17
3.1.1 Produção de hidrogênio	18
3.1.2 Produção biológica de H ₂	19
3.1.3 Desafios na produção biológica de H ₂	21
3.2 Produção de H ₂ a partir de ARF	22
3.3 Reator contínuo de tubos múltiplos	26
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1 Substratos.....	29
4.2 Etapa I – Produção de fermentado rico em ácido láctico	30
4.2.1 Reator anaeróbico operado em bateladas sequenciais.....	30
4.3 Etapa II – Produção de hidrogênio	31
4.3.1 Reator contínuo de tubos múltiplos	31
4.3.2 Inoculação do RCTM	33
4.3.3 Condições experimentais	33
4.4 Avaliação do desempenho do reator: métodos analíticos	34
4.5 Indicadores de Desempenho do reator RCTM	35
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1 Produção de fermentado rico em ácido láctico em ASBR (Etapa I).....	37
5.2 Desempenho do RCTM na produção de biohidrogênio	37
5.2.1 Distribuição dos metabólitos solúveis	43
6 CONCLUSÕES	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Caracterização físico-química dos lotes de ARF coletados.	29
Tabela 2 Condições de operação no RCTM para a produção de bioH ₂ a partir do fermentado rico em ácido láctico (ensaio E1 a E3).	34
Tabela 3 Parâmetros monitorados e frequência de coleta das amostras no RCTM.	34
Tabela 4 Caracterização físico-química dos lotes de FLA.	37
Tabela 5 Desempenho do RCTM nos ensaios E1, E2 e E3.	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Fluxograma do processo de digestão anaeróbia.....	20
Figura 2 Dimensões e aspectos construtivos do reator contínuo de tubos múltiplos.	31
Figura 3 Representação das ranhuras inseridas nas paredes internas dos tubos, no formato rosca sem fim.	32
Figura 4 Representação esquemática do aparato experimental do reator contínuo de tubos múltiplos.	33
Figura 5 Desempenho do RCTM na produção de bioH ₂ nos ensaios E1 (-●-; -○-) (48 g DQO L-1 d-1), E2 (-▲-; -Δ-) (72 g DQO L-1 d-1) e E3 (-■-; -□-) (96 g DQO L-1 d-1): (a) pH de saída do reator, (b) eficiência de remoção de DQO total (ER _{DQO}), (c) composição do biogás (hidrogênio, -●-; -◆-; -■-) e rendimento de hidrogênio (RH, -○-; -Δ-; -□-), (d) produção volumétrica de hidrogênio (PVH, -●-; -▲-; -■-) e vazão de biogás (VBG, -○-; -Δ-; -□-).	41
Figura 6 Distribuição percentual dos metabolitos da fermentação no afluente e efluente do RCTM.	43
Figura 7 Conversão percentual do ácido láctico e glicerina.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

ARF -	Água residuária de fecularia de mandioca
ASBR - sequenciais)	<i>Anaerobic Sequential Batch Reactor</i> (reator anaeróbio operado em bateladas
BAL -	Bactérias ácido lácticas
BioH ₂ -	Biohidrogênio
COV -	Carga orgânica volumétrica
ERDQO -	Eficiência de remoção de demanda química de oxigênio
DQO -	Demanda química de oxigênio
FLa -	Fermentado rico em ácido láctico
pH -	Potencial Hidrogeniônico
PVH -	Produção volumétrica de hidrogênio
RCTM -	Reator contínuo de tubos múltiplos
RH -	Rendimento de hidrogênio
SSV -	Sólidos suspensos voláteis
ST -	Sólidos totais
STV -	Sólidos totais voláteis
TDH -	Tempo de Detenção Hidráulica
VBG -	Vazão de biogás

1 INTRODUÇÃO

Em decorrência do esgotamento dos combustíveis fósseis, dos impactos ambientais associados à sua queima, em especial, à emissão de gases de efeito estufa, e do aumento da demanda energética mundial, nos últimos anos, tem crescido a busca por fontes de energia sustentáveis que conciliem alta eficiência energética e baixos impactos ambientais. Nesse contexto, o hidrogênio desponta como um carreador energético promissor, por ser capaz de armazenar energia e liberá-la sem emissões de carbono, tendo vapor de água como único subproduto da combustão (Megia *et al.*, 2021).

Apesar de seu potencial como carreador energético livre de emissões, mais de 95% do hidrogênio produzido mundialmente ainda provém de fontes fósseis, obtidas principalmente por meio da reforma a vapor do gás natural, um processo que emite entre 9 e 12 kg de CO₂ para cada kg de H₂ produzido (IEA, 2024). A substituição dos métodos tradicionais por rotas mais sustentáveis é essencial para viabilizar o papel do hidrogênio na transição energética. Entre essas rotas, a produção biológica de hidrogênio, a partir de resíduos orgânicos, como efluentes agroindustriais, tem demonstrado potencial promissor em estudos laboratoriais e de escala piloto, alinhando-se aos princípios da economia circular (Uddin *et al.*, 2021).

Dentre os processos biológicos, a fermentação escura (*dark fermentation*) tem se destacado por sua capacidade de converter substratos orgânicos de baixo custo em hidrogênio (Talapko *et al.*, 2023). A água residuária de fecularia de mandioca (ARF) é considerada um substrato promissor para os processos biotecnológicos devido à sua elevada concentração de carboidratos, que pode variar entre 4.000 e 25.000 mg L⁻¹ de DQO, a depender da variedade da mandioca, do tempo de armazenamento da raiz e do processo industrial adotado. No entanto, sua relação carbono: nitrogênio (C/N), geralmente entre 20:1 e 50:1, é considerada baixa para a produção de hidrogênio, favorecendo o crescimento de microrganismos não produtores de hidrogênio (Zhang *et al.*, 2021). Como forma de contornar esse desafio, tem sido proposta a utilização de cossustratos com alta relação C/N, como o glicerol, subproduto da produção de biodiesel, que contribui para o equilíbrio nutricional do meio, podendo favorecer a atividade microbiana desejada, o que melhora a estabilidade operacional do sistema (Andreani *et al.*, 2022; Meier *et al.*, 2020).

A produção fermentativa de bio-hidrogênio (bioH₂) ocorre, em geral, a partir da conversão de carboidratos. No entanto, o uso direto desses compostos pode favorecer a proliferação de microrganismos que não produzem hidrogênio, comprometendo a eficiência e a estabilidade do processo em razão da competição metabólica. Nesse contexto, o ácido lático surge como um intermediário estratégico, uma vez que sua utilização pode minimizar a

competição por substrato. A exploração da fermentação natural via lactato representa, portanto, uma alternativa promissora para ampliar a estabilidade e a eficiência da produção de hidrogênio (García-Depraect *et al.*, 2021), especialmente em efluentes ricos em bactérias produtoras de ácido láctico, como os de origem agroindustrial.

Contudo, a manutenção de um processo biológico contínuo e eficiente exige não apenas substratos adequados, mas também estratégias para direcionar a dinâmica microbiana, reconhecendo que seu controle direto é limitado. O crescimento acelerado da biomassa e seu consequente acúmulo no leito reacional são problemas recorrentes em reatores anaeróbios, frequentemente agravados por baixas relações C/N. Variações na carga orgânica ou na microbiota do reator podem comprometer o desempenho do sistema, seja pelo acúmulo excessivo de biomassa, seja por sua lavagem prematura. Nesse contexto, o reator contínuo de tubos múltiplos (RCTM) surge como uma solução inovadora, ao permitir o descarte controlado da biomassa, proporcionando equilíbrio entre crescimento e fixação da biomassa no leito do reator (Trevisan *et al.*, 2024).

Embora a ARF tenha apresentado potencial como substrato para a produção de hidrogênio, sua aplicação em sistemas contínuos ainda enfrenta muitos desafios, dentre eles, a estabilidade (Souza, 2020; Rossi, 2023). Assim, o presente trabalho propõe, como estratégias: i) a produção de ácido láctico a partir da cofermentação da ARF e do glicerol, como alternativa à fermentação clássica de carboidratos; e ii) a aplicação do RCTM para superar limitações operacionais, explorando a via metabólica do lactato e promovendo o enriquecimento seletivo de microrganismos produtores de hidrogênio.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a produção de hidrogênio em reator contínuo de tubos múltiplos utilizando substrato rico em ácido láctico, obtido a partir da cofermentação de água residuária de fecularia de mandioca e glicerol.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a produção do ácido láctico a partir da fermentação da ARF e glicerol em reator anaeróbio operado em bateladas sequenciais (*Anaerobic Sequencing Batch Reactor*);
- Avaliar o efeito da carga orgânica volumétrica (48; 72 e 96 g DQO L⁻¹d⁻¹) na produção de bioH₂ a partir do fermentado rico em ácido láctico no RCTM; e
- Analisar os metabólitos gerados durante a produção de bioH₂, correlacionando-os com as principais vias fermentativas ativas no sistema.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta seção, são apresentados os fundamentos teóricos necessários para a compreensão deste trabalho, com foco nos seguintes tópicos: (i) o hidrogênio como vetor energético e suas principais rotas de produção; (ii) a produção biológica de H_2 , com ênfase na fermentação escura; (iii) o uso da água residuária de feculária de mandioca (ARF) como substrato; e (iv) as características do reator contínuo de tubos múltiplos (RCTM).

3.1 Hidrogênio

O desenvolvimento tecnológico experienciado pela humanidade fomenta o aumento do consumo energético. Para suprir essa demanda crescente, a matriz energética de diversos países ainda se fundamenta largamente em fontes não renováveis, sobretudo devido ao seu menor custo de produção. Porém, essas fontes eventualmente irão se esgotar, além de apresentar significativos impactos ambientais, devido principalmente à emissão de gases que contribuem para o efeito estufa (Diaz *et al.*, 2020).

O hidrogênio é um elemento abundante na natureza, sendo encontrado na forma de água ou hidrocarbonetos. Em sua forma gasosa, o H_2 , é considerado uma excelente alternativa energética, pois possui poder calorífico de 120 MJ/kg (até 2,5 vezes o valor energético dos hidrocarbonetos) e libera apenas vapor d'água em sua combustão. Entretanto, na forma de gás, o hidrogênio é pouco encontrado no ambiente, e, para a sua utilização em larga escala na matriz energética, é necessário que se utilizem outras fontes de energia para a sua produção (Olabi *et al.*, 2021).

Nesse contexto, o hidrogênio não é considerado uma fonte primária de energia, mas sim um vetor ou carreador energético. Para sua produção, utiliza-se eletricidade, preferencialmente proveniente de fontes renováveis, como solar ou eólica, por meio de processos termoquímicos ou biológicos. Em seguida, o hidrogênio é armazenado e transportado para ser utilizado como forma de energia. Quando produzido a partir de fontes limpas, cuja combustão não gera gases de efeito estufa, o hidrogênio é considerado como uma alternativa ecologicamente sustentável (Osman *et al.*, 2021).

Uma das principais contribuições do hidrogênio, nesse cenário, é sua capacidade de funcionar como solução para a intermitência das fontes renováveis. Fontes, como a solar e a eólica, são dependentes de condições ambientais específicas — a exemplo da incidência de luz durante o dia ou a presença constante de ventos —, o que limita sua geração contínua. Até mesmo a energia hidrelétrica pode ser impactada por variações sazonais, como a pluviometria. Nesse contexto, as tecnologias de armazenamento de energia, a saber, a

conversão em hidrogênio, permitem armazenar a eletricidade excedente, gerada em momentos de baixa demanda para utilizar posteriormente, equilibrando oferta e demanda. Essa abordagem contribui para a integração eficiente de fontes renováveis e para uma gestão mais inteligente dos recursos energéticos (Mayyas *et al.*, 2020). Assim, o hidrogênio, ao atuar como carreador energético, representa uma alternativa viável para mitigar os efeitos da intermitência energética.

Dentre as aplicações, o gás hidrogênio é utilizado em refinarias de petróleo para remover impurezas e melhorar a qualidade dos produtos derivados, em indústrias químicas, além de ter potencial energético para o setor de transportes, na indústria e na geração de eletricidade (Qazi, 2022).

3.1.1 Produção de hidrogênio

Dentre os diversos processos disponíveis para a produção de hidrogênio, destacam-se a eletrólise da água, a reforma a vapor de metano (gás natural), a oxidação parcial de hidrocarbonetos, a fotólise da água e a fermentação escura (Soo Kim *et al.*, 2020). Outras rotas incluem ainda processos fotofermentativos, sistemas bioeletroquímicos, como as células eletrolíticas microbianas, entre outros em desenvolvimento.

Na eletrólise, as moléculas da água (H_2O) são dissociadas em gás oxigênio (O_2) e gás hidrogênio (H_2), por meio da aplicação de uma corrente elétrica contínua entre dois eletrodos (ânodo e cátodo) imersos em uma solução eletrolítica. Se a energia elétrica utilizada nessa geração for renovável, o hidrogênio produzido também é considerado limpo, não havendo emissões de carbono em sua geração (Panigrahy *et al.*, 2022).

Atualmente, a reforma a vapor do gás natural é o método mais econômico e comum empregado na produção de hidrogênio, no qual, em altas temperaturas, o metano (CH_4) reage com o vapor d'água resultando em hidrogênio (H_2) e dióxido de carbono (CO_2). Esse dióxido de carbono deve, então, ser capturado e armazenado, para manter a sustentabilidade do processo (Masoudi Soltani *et al.*, 2021).

A oxidação parcial de hidrocarbonetos, como o nome sugere, utiliza hidrocarbonetos, como o carvão ou o petróleo, que são parcialmente oxidados por uma quantidade limitada de oxigênio, produzindo hidrogênio (H_2) e monóxido de carbono (CO). Adicionalmente, a reação do CO com vapor d'água, conhecida como reação de deslocamento água-gás, permite a recuperação de mais hidrogênio, com a formação de dióxido de carbono (CO_2). Tal procedimento pode ser conduzido com uma variedade de combustíveis fósseis, mas emite CO_2 e requer etapas adicionais para a purificação do hidrogênio (Onwuemezie *et al.*, 2024).

A fotólise da água consiste no processo em que a luz solar é utilizada para decompor a água em hidrogênio e oxigênio, sendo catalisado por materiais semicondutores ou algas em células fotoeletroquímicas. É um método de produção de hidrogênio sem emissões de gases de efeito estufa, porém, ainda possui baixa eficiência, havendo a necessidade de maior progresso tecnológico para sua viabilidade (Hassan *et al.*, 2024).

A *dark fermentation* ou fermentação escura é um processo biotecnológico no qual bactérias anaeróbias convertem substratos orgânicos em bio-hidrogênio, sendo uma opção atrativa devido à capacidade de converter resíduos orgânicos em energia renovável, ao mesmo tempo em que auxilia a gestão desses resíduos. Além de bio-hidrogênio, outros subprodutos, como ácidos orgânicos e álcoois, são gerados, dependendo das condições e dos microrganismos envolvidos no processo (Ahmad *et al.*, 2024). O desempenho da fermentação escura é influenciado por diversos fatores ambientais, que podem ser divididos em abióticos (pH, temperatura, concentração de substrato, presença de inibidores) e bióticos (interações entre diferentes espécies microbianas, competição por substrato, consumo de hidrogênio). Esses fatores afetam a taxa de produção de bio-hidrogênio e a estabilidade do processo (García-Depraect *et al.*, 2021).

3.1.2 Produção biológica de H₂

A produção de H₂ ocorre predominantemente durante a fase de acidogênese da digestão anaeróbia. Para que o hidrogênio gerado seja efetivamente acumulado e capturado, é necessário inibir a ação das arqueias metanogênicas, responsáveis por converter H₂ em metano (CH₄). Essa inibição pode ser realizada por meio de diferentes pré-tratamentos aplicados ao lodo anaeróbio, como tratamento térmico, ácido, alcalino ou uso de inibidores químicos seletivos. Tais métodos exploram o fato de que as arqueias não possuem capacidade de formar esporos e, portanto, são mais suscetíveis a condições adversas, ao contrário das bactérias produtoras de hidrogênio, como as do gênero *Clostridium*, que resistem por meio da esporulação (Aboudi *et al.*, 2021).

A digestão anaeróbia ocorre em quatro etapas principais: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese (Figura 1).

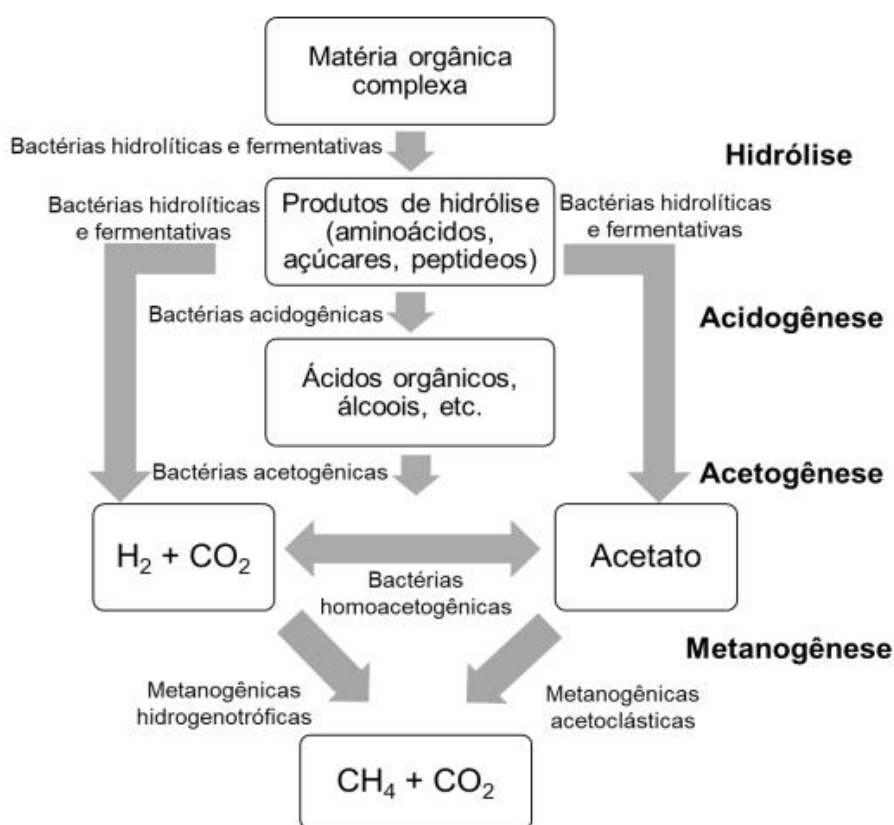


Figura 1 Fluxograma do processo de digestão anaeróbia.

Fonte: Adaptado de Sá *et al.* (2014).

Na primeira etapa, a hidrólise, as bactérias hidrolíticas e fermentativas degradam a matéria orgânica complexa, como carboidratos, proteínas e lipídios, em compostos mais simples, a exemplo dos aminoácidos, açúcares e peptídeos. Esse processo facilita a assimilação desses compostos pelos microrganismos nas etapas subsequentes (Meier *et al.*, 2020).

Na segunda etapa, a acidogênese, os produtos resultantes da hidrólise são convertidos em compostos ainda mais simples, como ácidos orgânicos voláteis, álcoois, dióxido de carbono (CO₂) e hidrogênio (H₂), por um grupo diverso de bactérias fermentativas. Esses compostos servem como substratos para as próximas etapas do processo (García-Depraect *et al.*, 2022).

Na terceira fase, acetogênese, as bactérias acetogênicas processam os produtos da acidogênese, para formar principalmente o ácido acético, além de CO₂ e H₂. Essa etapa é fundamental para a conversão dos intermediários em produtos que servirão como substrato para a etapa final da digestão anaeróbia. Nessa etapa do processo, as bactérias homoacetogênicas também podem converter o H₂ e CO₂ diretamente em ácido acético, aumentando a eficiência do processo (Rawoof *et al.*, 2020).

Na última etapa do processo, a metanogênese, as arqueias metanogênicas convertem os produtos da acetogênese, como ácido acético, CO_2 e H_2 , em metano (CH_4). Na via acetoclástica, o ácido acético é convertido em CH_4 e CO_2 , enquanto, na via hidrogenotrófica, o CO_2 é consumido na presença de H_2 , formando metano. Esse estágio é fundamental para a produção de energia renovável a partir de resíduos orgânicos (Yan *et al.*, 2020).

Durante a acidogênese, fase intermediária da digestão anaeróbia, a produção de hidrogênio pode ser significativamente potencializada por meio da fermentação escura. Esse processo é caracterizado por ocorrer sem a necessidade de luz, o que o diferencia da fotossíntese e de outros mecanismos foto-dependentes (Bastidas-Oyanedel *et al.*, 2015).

A produção de bio-hidrogênio (bioH_2) via fermentação escura constitui um caminho alternativo promissor à produção convencional de hidrogênio, superando limitações de outros métodos biológicos, pois não há inibição pela ausência de iluminação. Além disso, uma das principais vantagens desse processo é sua capacidade de converter resíduos orgânicos, como resíduos agrícolas, subprodutos industriais e águas residuárias ricas em matéria orgânica, em hidrogênio, que pode ser utilizado para a geração de energia (Trevisan, 2020).

A eficiência da fermentação escura depende de fatores como o tipo de biomassa utilizada, as condições de pH, temperatura, catalisadores – a exemplo de enzimas específicas produzidas pelos microrganismos envolvidos no processo de fermentação, além da composição microbiana envolvida no processo. A variada gama de fatores oferece diversas possibilidades de melhorias de eficiência, ao testar diferentes combinações. A otimização do processo de produção biológica de hidrogênio permite aumentar sua eficiência e contribui para a valorização de resíduos orgânicos, por meio do reaproveitamento parcial de sua carga orgânica para geração de energia limpa (Yan *et al.*, 2020).

3.1.3 Desafios na produção biológica de H_2

Apesar dos avanços já alcançados, desafios ainda são enfrentados em relação à produção estável e contínua de hidrogênio por longos períodos, especialmente utilizando efluentes reais como substrato. Segundo Castelló *et al.* (2020), as principais limitações da fermentação escura, que dificultam a implementação de sistemas em escala plena, são a falta de estabilidade do processo e a eficiência relativamente baixa, em relação ao potencial máximo teórico de produção de hidrogênio, o que restringe a operação a longo prazo.

Portanto, é essencial entender quais são as causas de instabilidade e encontrar possíveis soluções para que sistemas de produção de bioH_2 possam ser instalados em escala real. As causas bióticas da instabilidade podem estar associadas à presença de organismos que consomem H_2 , à presença de organismos que competem pelo substrato e inibição por

produtos de fermentação (Castelló *et al.*, 2020). O crescimento excessivo de microrganismos reduz significativamente a carga orgânica específica, parâmetro que expressa a quantidade de substrato disponível por unidade de biomassa (relação alimento/microrganismo, A/M). Quando a biomassa se acumula excessivamente no leito do reator, há menor disponibilidade de substrato por célula ativa, o que pode ocasionar a perda de desempenho do processo. Além disso, o acúmulo de sólidos altera o padrão de fluxo, favorecendo a ocorrência de curtos-circuitos hidráulicos e a formação de zonas mortas (Anzola-Rojas *et al.*, 2015).

A variação na composição dos resíduos, a presença de compostos tóxicos no substrato ou gerados durante a fermentação e as condições operacionais do processo são fatores que podem comprometer significativamente a atividade microbiana e, consequentemente, a produção de hidrogênio. Compostos inibidores, como ácidos graxos voláteis em concentrações elevadas, etanol, fenóis e sulfetos, podem afetar a integridade celular ou interferir no metabolismo energético das bactérias hidrogenogênicas. Além disso, flutuações na concentração de nutrientes, pH e temperatura podem desestabilizar a comunidade microbiana, favorecendo grupos menos eficientes ou não produtores de H₂, como bactérias homoacetogênicas ou ácido-láticas. A eficiência de conversão dos substratos em bioH₂ também é impactada pela complexidade da matriz orgânica presente no efluente, que pode dificultar a hidrólise e o acesso microbiano aos compostos fermentescíveis. Por fim, a eficácia do processo depende diretamente da predominância de cepas hidrogenogênicas competitivas e adaptadas às condições impostas, o que nem sempre é garantido em sistemas com elevada variabilidade de carga ou toxicidade (Ahmed *et al.*, 2022).

Além disso, a separação eficiente do hidrogênio produzido e dos outros gases, a melhoria das tecnologias de produção, a redução dos custos operacionais e de investimento, bem como normas e legislações que fomentem as práticas de produção de biohidrogênio são todas fundamentais para viabilizar a implementação do processo (Xu *et al.*, 2022).

3.2 Produção de H₂ a partir de ARF

Um aspecto crucial na produção de bio-hidrogênio via processos fermentativos é a seleção dos substratos, ou fontes de carbono, sendo os carboidratos a principal opção. A composição dos substratos, especialmente no caso de águas residuárias, influencia diretamente o rendimento e a taxa de produção de hidrogênio (Baeyens *et al.*, 2020). Os carboidratos puros permitem um controle mais refinado do processo em estudos teóricos, porém, é necessário utilizar fontes renováveis e de baixo custo para manter a sustentabilidade do procedimento para a produção em larga escala (Sivaranjani *et al.*, 2023).

O processo industrial de extração da fécula de mandioca gera água residuária de fecularia de mandioca (ARF) em grande quantidade. Estima-se que o processamento de 1 tonelada de mandioca fresca gere pelo menos 0,60 m³ de efluente, valor que pode chegar a 2,40 m³ por tonelada de amido de mandioca produzido. Em razão disso, esse resíduo tem sido avaliado em diversos estudos para a produção de metano, metabólitos de valor agregado e como substrato para a produção biológica de hidrogênio (Sreethawong *et al.*, 2010). A utilização da ARF em processos biológicos pode contribuir para a mitigação dos impactos ambientais relacionados ao seu descarte inadequado, conservando recursos hídricos e oferecendo uma rota para a geração de energia renovável. Esses fatores contribuem para uma economia circular e sustentável, convertendo resíduos em recursos valiosos (Cruz *et al.*, 2021).

Ao se trabalhar com águas residuárias reais, coletadas em indústrias, deve-se considerar as variações em sua composição. A ARF, especificamente, apresenta oscilações em termos de nutrientes, carboidratos e matéria orgânica, podendo ser em decorrência da variedade da mandioca, idade da raiz, época do ano, tempo entre a colheita e o processamento (Schmidt *et al.*, 2022). Segundo Andreani *et al.* (2015) e Corbari *et al.* (2019), a relação entre carbono e nitrogênio (C/N) da ARF apresenta grande variação, de 37:1 a 95:1, quando expressa com base na razão entre demanda química de oxigênio (DQO) e nitrogênio total Kjeldahl (NTK). Esses valores estão, em geral, abaixo do recomendado para a produção eficiente de hidrogênio, cuja faixa ideal varia entre 100:1 e 150:1, dependendo do microrganismo e das condições operacionais. Anzola-Rojas *et al.* (2015) e Peixoto *et al.* (2011) recomendaram relações C/N de 137 e 125, respectivamente. Os autores verificaram que baixas relações C/N favoreceram a produção de biomassa microbiana em detrimento da produção de hidrogênio, promovendo o acúmulo de sólidos no reator.

A fim de reduzir a instabilidade na produção biológica de hidrogênio em reatores anaeróbios, devem ser considerados tanto o carregamento orgânico quanto as relações nutricionais (Wang e Wan, 2009). Visto que a concentração dos nutrientes é característica intrínseca ao resíduo, o equilíbrio nas relações nutricionais pode ser alcançado por meio da adição de cossustratos (Rosa *et al.*, 2014). A cofermentação anaeróbia é uma variação do processo de digestão anaeróbia, que, por diferencial, envolve a mistura de dois ou mais tipos de substratos orgânicos com características complementares, melhorando, assim, as relações nutricionais e proporcionando maior produção de biogás (Song *et al.*, 2021). Esse processo é eficaz, pois pode otimizar a fermentação escura, melhorando as relações entre carbono e nitrogênio, além de outros nutrientes essenciais, a fim de aproveitar os recursos disponíveis (Kainthola *et al.*, 2020).

Um resíduo que tem se destacado como cossustrato na cofermentação é o glicerol, subproduto da produção do biodiesel, pois apresenta relação C/N elevada, geralmente entre

200:1 e 500:1, favorecendo o balanceamento nutricional quando combinado a substratos com elevado teor de nitrogênio, como a ARF (Alves *et al.*, 2020). O glicerol apresenta características que são complementares às da ARF, mantendo a relação C/N em valores adequados, sendo, assim, interessante para garantir o sucesso dessa reação de cofermentação anaeróbia (Rodríguez-Abalde *et al.*, 2017).

Normalmente, o glicerol tem sido empregado como cosubstrato em: i) reatores de fase única para a produção de CH₄ (Larsen *et al.*, 2013); (Takeda *et al.*, 2022); (Castro de *et al.*, 2021); ii) reatores acidogênicos para a produção de bioH₂ (Lovato *et al.*, 2016); (Meier *et al.*, 2020); e iii) sistemas de duas fases, acidogênica e metanogênica, para a obtenção de H₂ e CH₄ (Lovato *et al.*, 2020). Nesses estudos, o glicerol demonstrou contribuir para o aumento da produção de biogás rico em energia.

Um outro aspecto de importância que influencia a estabilidade e a manutenção da produção biológica de hidrogênio por longos períodos é a presença de bactérias lácticas nos reatores. De acordo com Castelló *et al.* (2020), a presença de bactérias ácido lácticas (BAL) é especialmente significativa em sistemas de fermentação escura, sendo considerada uma das principais causas da inibição da produção de hidrogênio. Os três principais mecanismos influenciados pela atividade das BAL, que foram associados à diminuição na produção de hidrogênio, incluem a competição por substrato, a liberação de compostos antimicrobianos e a acidificação excessiva do ambiente de cultura. Este último é causado pela baixa capacidade de dissociação do lactato produzido (Gomes *et al.*, 2016; Noike *et al.*, 2002).

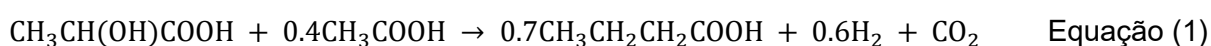
A fermentação láctica envolve a decomposição de açúcares, como a glicose, em piruvato, por meio da glicólise, uma via metabólica fundamental para as BAL durante os processos de fermentação (Gunkova *et al.*, 2021; Costa *et al.*, 2020). As BAL, como as espécies de *Lactobacillus*, usam a glicólise para converter açúcares em ácido láctico, um componente chave em vários alimentos fermentados. Além disso, as BAL têm a capacidade de metabolizar uma ampla gama de carboidratos, contando com rotas metabólicas específicas, como as vias da fosfo-β-glicosidase, que desempenham um papel significativo na fermentação de alimentos à base de plantas (Acin-Albiac *et al.*, 2021).

A capacidade das BAL em metabolizar várias fontes de carboidratos viabiliza o seu crescimento em inúmeros tipos de matérias-primas orgânicas e, consequentemente, nos diversos resíduos gerados nas unidades de transformação, como indústria de leite e derivados, conservas vegetais, álcool, fécula de mandioca, dentre outras mais. Devido ao fato de estar naturalmente presentes nessas matrizes, as BAL são consideradas microrganismos autóctones ou indígenas. Um exemplo disso é o que é enfrentado na indústria de etanol combustível, em que o crescimento de BAL é uma das principais dificuldades devido à contaminação microbiana (Rich *et al.*, 2018).

Em face dos relatos de instabilidade na produção de bioH₂ em decorrência da ação de bactérias láticas, alguns estudos foram dedicados à inativação ou diminuição da atividade das BAL por meio de tratamentos prévios do substrato ou do inóculo. Cabrol *et al.* (2017) relatam tentativas de controle das BAL, via tratamento ácido ou térmico do substrato ou do lodo anaeróbio, no entanto, muitas vezes, os resultados se mostraram ineficazes. Nesse contexto, em reatores biológicos operados em escala plena e alimentados com efluente real, o controle das BAL torna-se inviável por motivos técnicos e financeiros.

As dificuldades de evitar ou controlar a presença das BAL em reatores produtores de bioH₂ têm levado os pesquisadores a tentar entender o papel desses microrganismos nesses sistemas, sua influência na produção de H₂ e, até mesmo, aproveitar a sua presença para melhorar a produção de H₂. Fuess *et al.* (2018), em estudo realizado com o objetivo de elucidar as vias metabólicas, bem como o papel dos diferentes grupos microbianos em um reator produtor de bioH₂ alimentado com vinhaça de cana-de-açúcar, observaram que o lactato foi a principal fonte alternativa de carbono em condições de escassez de carboidratos. Andreani *et al.* (2019) quantificaram as concentrações de lactato e acetato alcançando até 4,1 g L⁻¹ e 0,7 g L⁻¹, respectivamente. De acordo com García-Depraect *et al.* (2021), a produção de hidrogênio a partir de lactato pode configurar uma alternativa viável para resolver as questões técnicas associadas ao crescimento descontrolado de BAL nos processos de fermentação escura.

O consumo de lactato e acetato resulta na produção de hidrogênio, butirato e dióxido de carbono, conforme mostrado pela estequiometria geral da reação na Equação 1, gerando 0,3 moléculas de ATP por mol de lactato consumido (Diez-Gonzalez *et al.*, 1995).



García-Depraect *et al.* (2021) observaram que as relações estequiométricas da reação do lactato com o acetato variam conforme as condições ambientais, incluindo pH e carga orgânica, e com os microrganismos envolvidos na fermentação. Esses autores comentam ainda que, embora os resíduos orgânicos e as águas residuárias sejam compostos complexos, suas propriedades físico-químicas e biológicas parecem influenciar a produção de hidrogênio a partir da via do lactato, sendo essa via muito comum em substratos que possuem uma população microbiana natural com BAL e que, geralmente, têm níveis significativos de lactato e acetato.

García-Depraect *et al.* (2020) avaliaram um processo inovador em três fases, com a produção de lactato, hidrogênio e metano a partir da vinhaça de tequila. Nesse estudo, conduzido em reatores distintos, os autores enfatizaram que a utilização do lactato como precursor resultou em produção elevada e estável de hidrogênio. Na primeira fase, o ácido láctico correspondeu a 89% dos ácidos orgânicos produzidos; na segunda fase, a produção de hidrogênio apresentou-se estável com variação menor que 10%, indicando que a produção

de H_2 a partir da via do lactato, em detrimento do uso de carboidratos, tem potencial para contornar o problema da instabilidade na fermentação escura.

Estudos sobre fermentação escura usando o lactato como substrato indicam que o tempo ideal de detenção hidráulica para maximizar a produção de hidrogênio varia de 1 a 12 horas. Em alguns casos específicos, períodos de detenção hidráulica mais curtos foram mais propícios para o crescimento de BAL, enquanto tempos mais longos, como 48 horas, favoreceram o crescimento de *Clostridium* sp. (Santiago *et al.*, 2019). É importante observar que períodos de detenção hidráulica curtos, geralmente inferiores a 6 horas, têm sido aplicados apenas em reatores de biofilme/crescimento aderido (García-Depraect *et al.*, 2021).

3.3 Reator contínuo de tubos múltiplos

O excesso de biomassa pode acarretar problemas operacionais, como obstruções em reatores com crescimento aderido, prejudicando a mistura e a liberação eficiente dos gases. Esse acúmulo pode ocasionar o aumento da pressão parcial de hidrogênio no reator, o que, por sua vez, provoca inibição termodinâmica da produção de H_2 , comprometendo o desempenho do processo. Além disso, o crescimento excessivo de biomassa pode gerar condições de escassez de substrato, proliferação de bactérias indesejáveis, como homoacetogênicas e redutoras de sulfato, e a predominância de vias metabólicas desfavoráveis (García-Depraect *et al.*, 2021).

Nesse contexto, Gomes *et al.* (2015) sugeriram o uso do reator contínuo de tubos múltiplos (RCTM) como uma alternativa aos reatores de leito fixo. O RCTM é composto por diversos tubos de pequeno diâmetro dispostos em paralelo, por onde o fluxo escoia com maior velocidade, favorecendo a lavagem controlada da biomassa e a taxa de transferência de massa gás-líquido, facilitando a liberação do $bioH_2$ produzido. Um dos objetivos da configuração é melhorar a relação alimento/microrganismo (ou carga orgânica volumétrica específica - COVe).

A carga orgânica volumétrica específica (COVe) é crucial por se tratar da relação entre a quantidade de substrato e a biomassa no reator, o que influencia diretamente a eficiência do processo de produção de hidrogênio. A faixa de valores para COVe de 4,4 a 6,4 g DQO g⁻¹ SSV d⁻¹ foi indicada como adequada para a produção de $bioH_2$ (Hafez *et al.*, 2010; Anzola-Rojas *et al.*, 2015).

No estudo realizado por Gomes *et al.* (2015), o RCTM foi alimentado com substrato sintético à base de sacarose. Nessa primeira avaliação do RCTM, os autores não obtiveram elevada produção de H_2 , atribuindo esses resultados à lavagem exagerada da biomassa do

reator, o que configura uma condição de falta de biomassa e excesso de substrato (valores elevados de COVe).

A fim de melhorar a retenção e promover a lavagem controlada da biomassa, Trevisan *et al.* (2023) inseriram, nos tubos do RCTM, ranhuras no formato de rosca sem fim. O estudo foi realizado utilizando substrato sintético à base de sacarose e promoveu a produção de bioH₂ por longos períodos, superiores a 100 dias. Valores adequados de COVe (próximos de 4,9 g DQO g⁻¹ SSV d⁻¹) foram observados quando aplicadas cargas orgânicas de até 48 g DQO L⁻¹d⁻¹, nas quais a produção de bioH₂ foi maximizada. Os autores consideraram que essa configuração de reator se mostrou promissora, já que promoveu, naturalmente, a lavagem controlada da biomassa do sistema.

Souza (2020) operou um RCTM utilizando água residuária de fecularia de mandioca como substrato. O autor avaliou o efeito do inóculo (autofermentação e lodo anaeróbio tratado termicamente) e do número de tubos (12 e 16 tubos) no desempenho do reator. A ARF foi utilizada sem diluição; o pH foi corrigido para 6,0 e o reator foi operado com tempo de detenção hidráulica (TDH) de 4 h. A COV aplicada durante a operação do RCTM variou de 25 a 75 g DQO L⁻¹ d⁻¹, devido à variação na composição dos lotes de ARF coletados na indústria. Os maiores valores de produção volumétrica de hidrogênio (85,05 ± 153,1 mLH₂ L⁻¹ d⁻¹) e rendimento (43,64 ± 74,3 mmolH₂.mol⁻¹glic-consumido) foram registrados para os valores de COV entre 40 e 50 g DQO L⁻¹ d⁻¹. A produção de bioH₂ foi verificada por longos períodos (>70 dias), sem a presença de metano no biogás, apesar da grande instabilidade. Próximo ao fim dos ensaios, foi observado acúmulo de biomassa no reator, resultando em COVe abaixo do indicado pela literatura (0,5 a 2,5 gcarboidratos g⁻¹SSV d⁻¹), o que reduziu a produção de bioH₂. O autor sugere que a variação da concentração de carboidratos e de DQO na composição do efluente real (ARF) pode ter interferido negativamente no desempenho do reator.

Rossi (2023) avaliou o efeito da adição de glicerol (1,5 e 3,0%) e da carga orgânica volumétrica (39,1 e 74,6 g L⁻¹ d⁻¹) sobre a produção de bioH₂ em um RCTM alimentado com ARF. A maior produção volumétrica de hidrogênio média (161,33 mL H₂ L⁻¹ d⁻¹) foi alcançada na condição de 1,5% de glicerol e COV de 74,6 g DQO L⁻¹ d⁻¹. Nas condições, utilizando 3% de glicerol, a produção de hidrogênio foi insignificante, o que resultou na detecção de metano no gás ao final do processo.

O uso do RCTM tem se mostrado promissor para a produção contínua de H₂ (Trevisan *et al.*, 2023), porém, a instabilidade ainda é um desafio recorrente nesses sistemas. Nesse contexto, a aplicação de uma etapa prévia de fermentação láctica surge como uma alternativa estratégica, capaz de direcionar a seleção microbiana para consórcios produtores de hidrogênio. Ao favorecer a conversão inicial dos substratos em lactato, por bactérias do ácido láctico, a abordagem possibilita que, em uma segunda etapa, microrganismos especializados,

como as bactérias hidrogenogênicas, o utilizem como substrato principal para geração de bioH_2 . Avaliar a etapa de pré-fermentação láctica, utilizando ARF suplementada com glicerol como cossustratos, bem como o desempenho do RCTM, representa uma estratégia concreta para reduzir a instabilidade da produção de hidrogênio em sistemas contínuos e melhorar a eficiência global do processo. Essa abordagem combina o aproveitamento de resíduos orgânicos com o redirecionamento metabólico via lactato, buscando maior controle sobre a microbiota e estabilidade operacional.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Para a avaliar a produção de bioH_2 a partir do substrato rico em ácido láctico, o experimento foi dividido em duas etapas, que são:

- I. Produção de fermentado rico em ácido láctico (FLa) em reator anaeróbio operado em bateladas sequenciais (*Anaerobic Sequential Batch Reactor* - ASBR), tendo como substrato ARF e glicerol; e
- II. Produção de hidrogênio em reator contínuo de tubos múltiplos (RCTM) utilizando como substrato o FLa produzido na etapa I.

4.1 Substratos

O experimento e o monitoramento analítico foram conduzidos no Laboratório de Reatores Biológicos (LAREB) e no Laboratório de Saneamento Ambiental (LASAM), ambos localizados na Universidade Estadual do Oeste do Paraná, campus de Cascavel.

Foram utilizados dois substratos: ARF e glicerol. A ARF, subproduto do processo de extração da fécula de mandioca, foi coletada em uma indústria localizada na região Oeste do Paraná, Brasil. Três diferentes lotes de ARF foram coletados em intervalos distintos ao longo do experimento. Após a coleta e o transporte ao laboratório, a ARF foi decantada para remoção de sólidos grosseiros, homogeneizada e armazenada em garrafas de politereftalato de etileno (PET) de 2 litros, permanecendo congelada a $-10\text{ }^\circ\text{C}$ até sua utilização.

Considerando que a composição do substrato afeta diretamente o desempenho microbiano e a eficiência dos processos fermentativos, foi realizada a caracterização físico-química dos três lotes de ARF utilizados no experimento (Tabela 1).

Tabela 1 Caracterização físico-química dos lotes de ARF coletados.

Parâmetro	pH	DQOt	ST	STF	STV	Relação STV/ST
Unidade	-	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	%
Lote 1	4,5	11.622,1	14.518,0	3.852,7	10.665,3	73,5
Lote 2	4,9	15.419,4	15.634,0	4.368,7	11.265,3	72,1
Lote 3	5,3	10.816,6	14.610,7	3.748,0	10.862,7	76,2
Média	4,9	12.619,3	14.920,9	3.989,8	10.931,1	73,9
DV	0,4	2.458,1	619,3	332,3	305,8	2,1

Legenda: pH = potencial hidrogeniônico; DQOt = demanda química de oxigênio total; ST = sólidos totais; STF = sólidos totais fixos; e STV = sólidos totais voláteis.

Embora o lote 2 tenha apresentado valor de DQO superior em relação aos demais, a relação STV/ST permaneceu próxima entre os lotes. Isso indica que, no geral, a fração orgânica dos substratos foi bastante parecida, o que ajuda a garantir condições semelhantes

para os ensaios. Como o Fla foi diluído antes da alimentação do reator, essas diferenças não comprometeram a comparação entre os resultados.

Para evitar a variabilidade na composição e a presença de compostos inibitórios comumente encontrados no glicerol bruto, proveniente da produção de biodiesel (Chatzifragkou & Papanikolaou, 2012), foi utilizado glicerol sintético com pureza analítica ($\geq 99\%$) e densidade de $1,26 \text{ g/cm}^3$. Essa escolha proporcionou maior controle das condições experimentais durante sua aplicação como cossubstrato.

4.2 Etapa I – Produção de fermentado rico em ácido láctico

4.2.1 Reator anaeróbio operado em bateladas sequenciais

O inóculo do ASBR foi obtido por meio da autofermentação da ARF durante 96 horas a 36°C (Corbari *et al.*, 2019). Ao se utilizar a ARF como meio para a autofermentação, observou-se a seleção de bactérias ácido-láticas (Andreani *et al.*, 2019). Esses microrganismos, naturalmente presentes nas raízes de mandioca, fermentam carboidratos para produzir ácidos láctico e acético (Gomes *et al.*, 2016).

Para a obtenção do FLA, foi realizada a fermentação da ARF suplementada com glicerol (1,5 % v/v), em um ASBR de 40 L, operado em temperatura ambiente. O substrato utilizado foi composto por 98,5 % de ARF e 1,5 % de glicerol, sem diluição adicional. O substrato e o inóculo foram adicionados separadamente no reator e, em seguida, submetidos a uma breve agitação manual para homogeneização inicial, sendo o sistema mantido sem agitação ao longo do restante do ciclo.

O ASBR foi alimentado com 20 L da mistura (ARF + glicerol), sendo mantido 20 L de volume residual, respeitando uma proporção de 1:1 entre alimentação e volume retido. O sistema foi operado em ciclos de 12 horas, compostos por três etapas: (i) alimentação do reator com os substratos; (ii) fase de reação, durante a qual ocorrem as biotransformações; e (iii) descarga, com a retirada de 20 L de efluente ao final de cada ciclo. A concentração orgânica do substrato, expressa em termos de DQO, não foi fixada previamente, variando de acordo com o lote de ARF utilizado (10.816 a 15.419 mg L^{-1}).

Após a descarga do ASBR, o substrato fermentado rico em ácido láctico foi coletado, caracterizado e armazenado sob refrigeração para, posteriormente, ser diluído e empregado como substrato na produção de hidrogênio no RCTM. Para avaliar a etapa de fermentação, foram determinadas, no afluente e no efluente do ASBR, os seguintes parâmetros: pH, demanda química de oxigênio total (DQOt), sólidos totais (ST), sólidos totais fixos (STF) e

sólidos totais voláteis (STV). Esses parâmetros serviram de base para o cálculo dos indicadores de desempenho.

4.3 Etapa II – Produção de hidrogênio

4.3.1 Reator contínuo de tubos múltiplos

Para avaliar a produção de hidrogênio a partir do fermentado rico em ácido láctico, foi empregado um reator contínuo de tubos múltiplos (RCTM), conforme descrito previamente por Gomes *et al.* (2015) e, posteriormente, modificado por Trevisan *et al.* (2019).

O RCTM é composto por três partes: (1) câmara de entrada, construída em nylon; (2) região intermediária, constituída por 12 tubos de poliamida com 12 mm de diâmetro interno; e (3) câmara de saída, confeccionada em acrílico. Construído com 680 mm de altura e 80 mm de diâmetro interno, o RCTM possui volume total de 1065,5 mL, sendo distribuído entre a base do reator (80 mL), a região intermediária dos tubos (545,5 mL) e a câmara de saída (440 mL) (Figura 2). O reator foi mantido em câmara climatizada à temperatura controlada de 36 °C.

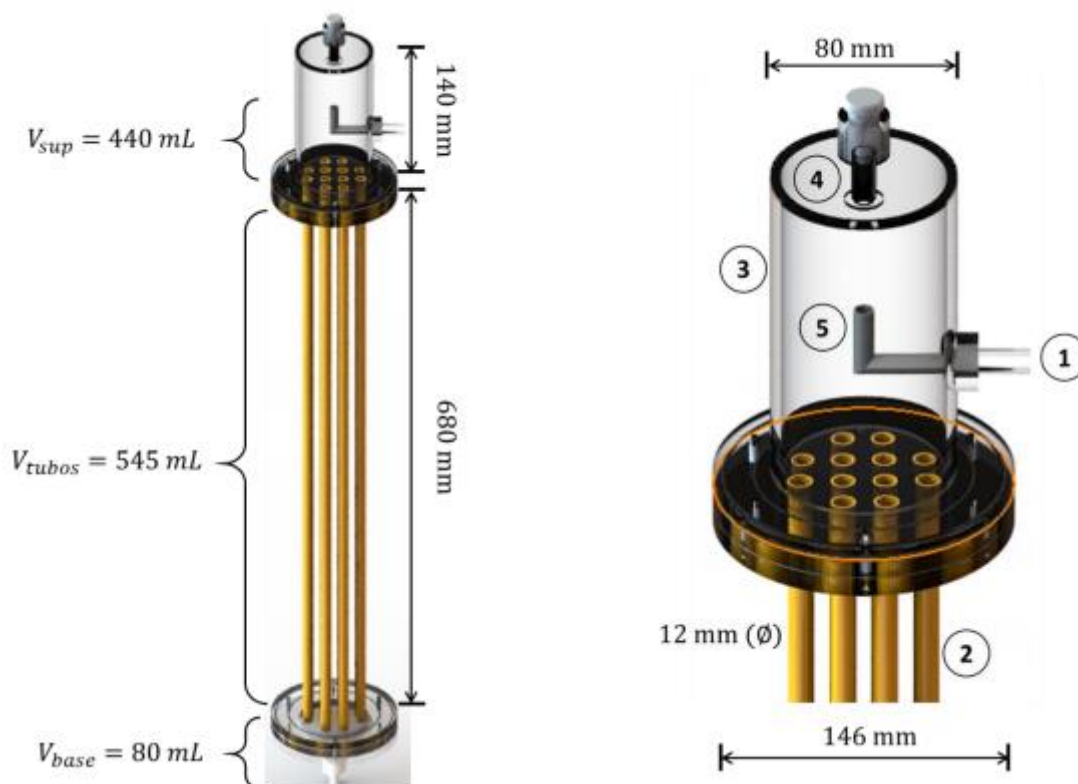


Figura 2 Dimensões e aspectos construtivos do reator contínuo de tubos múltiplos.
Fonte: Trevisan (2020).

Para melhorar a adesão da biomassa no reator, Trevisan (2020) inseriu ranhuras com espaçamento de aproximadamente 0,5 cm e 0,1 mm de profundidade na superfície interna dos tubos, no formato de rosca sem fim (Figura 3).

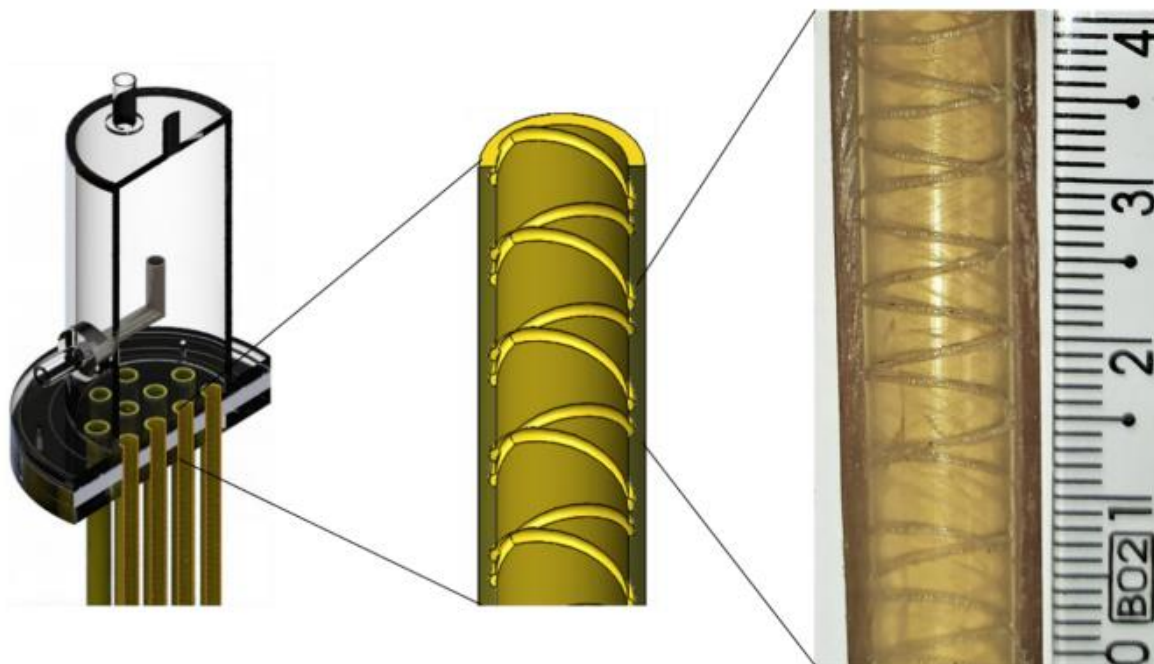


Figura 3 Representação das ranhuras inseridas nas paredes internas dos tubos, no formato rosca sem fim.

Fonte: Trevisan (2020)

O aparato experimental (Figura 4) foi composto de: (1) sistema de alimentação afluyente; (2) bomba peristáltica (Grundfos®, 100-240 V, 50/60 Hz, com pressão de 10 bar e vazão máxima de 6 L h^{-1}); (3) reator contínuo de tubos múltiplos (RCTM); (4) saída do reator; e (5) sistema de medição volumétrica de biogás.

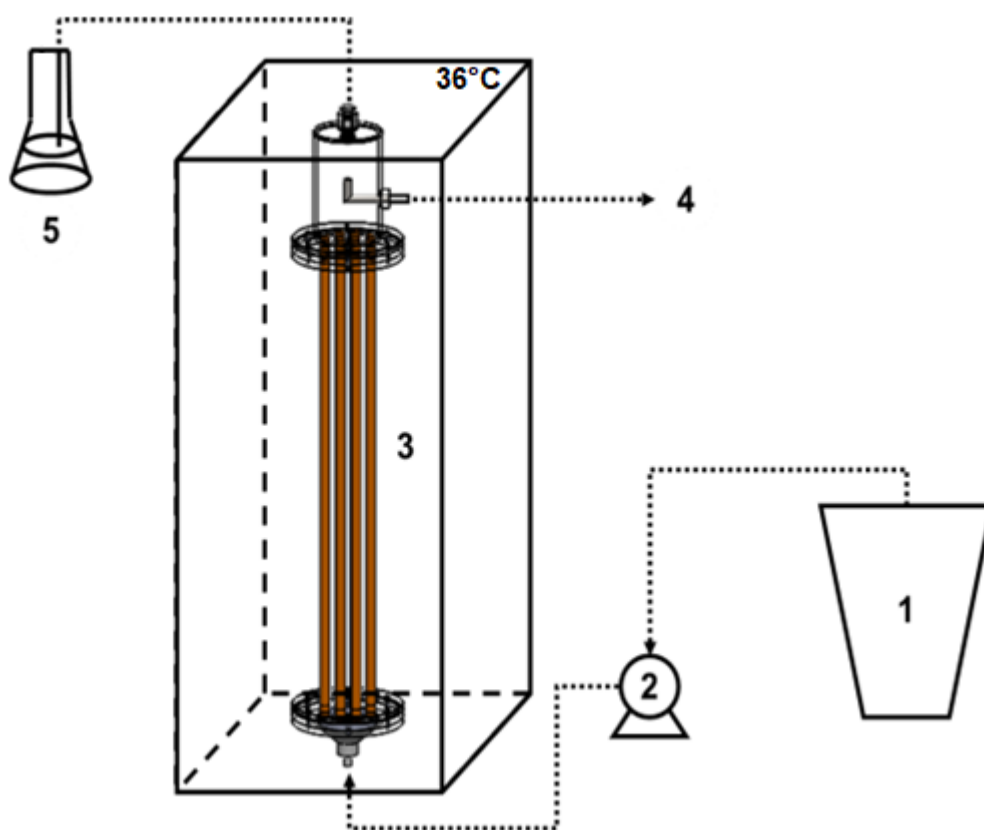


Figura 4 Representação esquemática do aparato experimental do reator contínuo de tubos múltiplos.
Fonte: Adaptado de Trevisan (2020)

4.3.2 Inoculação do RCTM

Na inoculação do RCTM, foi utilizado lodo anaeróbico previamente submetido a pré-tratamento térmico, que consistiu no aquecimento a 95 °C por 15 minutos, visando à inativação de microrganismos consumidores de hidrogênio (Sreethawong *et al.*, 2010). O lodo anaeróbico foi diluído no FLA, com concentração de 5.000 mgDQO L⁻¹, em proporções variáveis entre os ensaios: 1:19 no E1, 1:27,7 no E2 e 1:27,3 no E3 (lodo:substrato, v/v). A mistura foi recirculada por sete dias no RCTM para favorecer a adesão da biomassa às paredes dos tubos.

4.3.3 Condições experimentais

A produção de hidrogênio foi avaliada por meio da realização de três ensaios no RCTM (Tabela 2), nos quais o aumento da carga orgânica volumétrica (48; 72 e 96 g DQO L⁻¹d⁻¹) foi implementado por meio da variação na concentração afluenta (8; 12 e 16 g DQO L⁻¹). O tempo

de retenção hidráulica (TDH) foi fixado em 4 h. O pH afluente foi corrigido para 6,0 com bicarbonato de sódio (NaHCO_3).

Tabela 2 Condições de operação no RCTM para a produção de bioH_2 a partir do fermentado rico em ácido láctico (ensaios E1 a E3).

Ensaio	TDH (h)	COV (g DQO $\text{L}^{-1}\text{d}^{-1}$)	Concentração afluente (g DQO L^{-1})	Ácido Láctico	
				Concentração afluente (mg DQO L^{-1})	Proporção do metabólito (%)*
E1	4	48	8	$1.603,8 \pm 317,8$	$39,8 \pm 6,3$
E2	4	72	12	$3.250,1 \pm 1.314,0$	$41,8 \pm 12,9$
E3	4	96	16	$4.830,5 \pm 1.495,1$	$42,1 \pm 5,6$

*Nota: A proporção de ácido láctico entre os metabólitos (%) refere-se à porcentagem de ácido láctico em relação ao total de DQO dos metabólitos solúveis (ácidos láctico, acético e butírico) e do glicerol presentes no afluente.

O monitoramento do RCTM foi realizado por meio da coleta de amostras líquidas do afluente e efluente do reator e amostras gasosas, sendo, então, determinados os parâmetros apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 Parâmetros monitorados e frequência de coleta das amostras no RCTM.

Parâmetro	Coleta de amostras	Frequência (por semana)
pH	Afluente e efluente	3 vezes
DQO (mg L^{-1})	Afluente e efluente	3 vezes
Série de sólidos (mg L^{-1})	Afluente e efluente	2 vezes
Metabólitos solúveis (mg DQO L^{-1})	Afluente e efluente	2 vezes
Volume de biogás (L)	Saída de gás	3 vezes
Composição do biogás (H_2 , CH_4 , CO_2)	Saída de gás	2 vezes

4.4 Avaliação do desempenho do reator: métodos analíticos

As medidas de pH foram realizadas em pHmetro de bancada. A DQO, os sólidos totais (ST), sólidos voláteis (SV), sólidos suspensos totais (SST) e sólidos suspensos voláteis (SSV) foram determinados de acordo com o Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2005).

O biogás gerado durante a operação do RCTM foi quantificado por sistema de medição por deslocamento de líquido com frasco Mariotte contendo água, sendo os volumes corrigidos para as condições normais de temperatura e pressão (273,15 K e 1 atm). Para a análise qualitativa, alíquotas foram coletadas diretamente da mangueira que conecta a saída do reator ao Mariotte. A composição do biogás (H_2 , CO_2 e CH_4) foi determinada por cromatografia gasosa em GC-2010 (Shimadzu®), equipado com coluna capilar Carboxen® 1010 Plot (30 m $\times$ 0,53 mm $\times$ 30 μm) e detector de condutividade térmica (TCD), utilizando argônio como gás

de arraste (8 mL min^{-1}). As temperaturas do injetor e do detector foram de 200°C e 230°C , respectivamente, com rampa de aquecimento do forno de 130°C a 135°C ($46^\circ\text{C min}^{-1}$) e tempo de corrida de aproximadamente seis minutos.

A determinação dos metabólitos intermediários (ácidos láctico, fórmico, acético, propiônico e butírico), além de glicerol e 1,3-propanodiol, foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em sistema Shimadzu® com coluna Aminex® HPX-87H ($300 \text{ mm} \times 7,8 \text{ mm}$, Bio-Rad), forno CTO-20A a 64°C , bomba LC-20AT, controlador CBM-20A e detector UV SPD-20A (208 nm). A fase móvel consistiu em água ultrapura Milli-Q acidificada com H_2SO_4 $0,005 \text{ M}$, à vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ e volume de injeção de $20 \mu\text{L}$. As amostras foram previamente filtradas em membrana de acetato de celulose ($0,2 \mu\text{m}$) e acidificadas com solução de H_2SO_4 2 M , conforme metodologias de Lazaro *et al.* (2012) e Penteado *et al.* (2013).

4.5 Indicadores de Desempenho do reator RCTM

Os indicadores de desempenho do RCTM foram determinados conforme descrito por Trevisan (2020). A vazão da ARF alimentada no RCTM (Q), em L h^{-1} , foi calculada conforme a Equação 2, em que V_u corresponde ao volume útil do reator e TDH, ao tempo de detenção hidráulico (4 h).

$$Q_{af} = \frac{V_u}{TDH} \quad \text{Equação (2)}$$

A eficiência de remoção de DQO (ER_{DQO}), em %, foi calculada conforme Equação 3, em que DQO_{af} e DQO_{ef} correspondem, respectivamente, à DQO afluente e efluente (mg L^{-1}) do RCTM.

$$ER_{DQO} = \left(\frac{DQO_{af} - DQO_{ef}}{DQO_{af}} \right) \times 100 \quad \text{Equação (3)}$$

A vazão de biogás (VBG), em mL d^{-1} , foi calculada conforme a Equação 4, em que V e t correspondem, respectivamente, ao volume de gás medido (em mL) por deslocamento de líquido no sistema de medição e ao tempo de medição, em horas.

$$VBG = \frac{V}{t} \quad \text{Equação (4)}$$

A composição percentual de hidrogênio ($\%\text{H}_2$), de dióxido de carbono ($\%\text{CO}_2$) e de metano ($\%\text{CH}_4$) no biogás foram calculados conforme Equações 5, 6 e 7, respectivamente,

em que n_{H_2} é o número de mols de H_2 , n_{CO_2} é o número de mols de CO_2 , n_{CH_4} é o número de mols de CH_4 e n é o número de mols totais ($n = n_{H_2} + n_{CO_2} + n_{CH_4}$) na amostra de gás injetado.

$$\%H_2 = \frac{n_{H_2}}{n} \quad \text{Equação (5)}$$

$$\%CO_2 = \frac{n_{CO_2}}{n} \quad \text{Equação (6)}$$

$$\%CH_4 = \frac{n_{CH_4}}{n} \quad \text{Equação (7)}$$

O rendimento de hidrogênio (RH), em mmol H_2 g DQO⁻¹, foi calculado conforme Equação 8, em que $\dot{m}_{H_2}$, em mmol H_2 d⁻¹, é a vazão molar de hidrogênio.

$$RH = \frac{\dot{m}_{H_2}}{\left(\frac{DQO_{af} - DQO_{ef}}{DQO_{af}} \right)} \times 1.000 \quad \text{Equação (8)}$$

A produção volumétrica de hidrogênio (PVH), em mL H_2 L⁻¹ d⁻¹, foi calculada conforme Equação 9, na qual VBG, % H_2 e V_u correspondem, respectivamente, à vazão de biogás (mL d⁻¹), o conteúdo de hidrogênio no biogás (%) e o volume útil do RCTM (L).

$$PVH = \frac{VBG \times \%H_2}{V_u} \quad \text{Equação (9)}$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Produção de fermentado rico em ácido láctico em ASBR (Etapa I)

Um total de 14 lotes de FLA foi produzido por meio da fermentação da ARF suplementada com glicerol (1,5% v/v), sem ajuste de pH, em um reator operado em bateladas sequenciais. Após a fermentação, foram realizados testes para caracterização físico-química dos lotes de FLA. Posteriormente, esses lotes foram utilizados na alimentação do RCTM para a produção de bioH₂ (Etapa II). A Tabela 4 apresenta os resultados médios obtidos para os diferentes lotes de FLA.

Tabela 4 Caracterização físico-química dos lotes de FLA.

Parâmetro	Resultados médios
pH	3,8 ± 0,1
DQOt (mg L ⁻¹)	33.125,7 ± 4.859,1
ST (mg L ⁻¹)	20.772,0 ± 4.379,3
STF (mg L ⁻¹)	3.620,7 ± 1.219,7
STV (mg L ⁻¹)	17.151,3 ± 4.745,9
Relação STV/ST (%)	81,6 ± 8,9

Legenda: pH = potencial hidrogeniônico; DQOt = demanda química de oxigênio total; ST = sólidos totais; STF = sólidos totais fixos; e STV = sólidos totais voláteis. Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão (n = 14).

Os resultados médios e os baixos desvios padrão observados para parâmetros, como pH e STV/ST, indicam uma composição relativamente homogênea do substrato. Os demais parâmetros apresentaram maior variabilidade entre os lotes. Ainda assim, considerando que esse efluente foi posteriormente diluído para aplicação no RCTM, tais diferenças tendem a se tornar menos significativas devido ao efeito da diluição.

5.2 Desempenho do RCTM na produção de bio-hidrogênio

Nos ensaios realizados no RCTM, que avaliaram o efeito do aumento da carga orgânica volumétrica sobre a produção de bioH₂, o substrato oriundo da fermentação láctica foi diluído para atingir uma concentração afluenta de 8.000, 12.000 e 16.000 mg DQO L⁻¹, correspondendo às cargas orgânicas volumétricas de 48.000, 72.000 e 96.000 g DQO L⁻¹ d⁻¹, respectivamente.

O ensaio E1 foi operado por 22 dias, sendo a operação interrompida após a detecção de queda no teor de hidrogênio do biogás, identificada por análise cromatográfica. Os ensaios E2 e E3 permaneceram ativos por 37 e 44 dias, respectivamente. Ao final desses períodos,

ainda se observava atividade fermentativa e produção de hidrogênio, indicando que o sistema se manteve funcional até o encerramento. Vale destacar que há poucos relatos na literatura de sistemas acidogênicos que mantêm estabilidade operacional por mais de 30 dias (Trevisan, 2020).

A Tabela 5 apresenta os resultados referentes ao desempenho do RCTM na produção de bioH₂ a partir de substrato rico em ácido láctico.

Tabela 5 Desempenho do RCTM nos ensaios E1, E2 e E3.

Variável-resposta	Ensaio		
	E1	E2	E3
	48 g DQO L ⁻¹ d ⁻¹	72 g DQO L ⁻¹ d ⁻¹	96 g DQO L ⁻¹ d ⁻¹
pH	5,0 ± 0,3 5,6 (09)	5,5 ± 0,5 6,9 (19)	5,6 ± 0,5 7,1 (24)
ER _{DQO} (%)	23,7 ± 14,7 55,4 (09)	39,2 ± 21,1 75,9 (15)	41,8 ± 20,0 75,1 (19)
SSV efluente (g L ⁻¹)	0,2 ± 0,05 0,3 (09)	0,6 ± 0,3 1,3 (18)	0,6 ± 0,4 1,5 (21)
H ₂ (%)	30,3 ± 25,6 64,4 (11)	14,4 ± 4,5 24,0 (16)	24,8 ± 12,3 61,9 (20)
VBG (mL d ⁻¹)	3.118,1 ± 1.808,9 6.314,4 (11)	7.653,7 ± 3.596,0 14.410,1 (19)	9.360,9 ± 4.468,4 23.044,2 (24)
PVH (mL H ₂ L ⁻¹ d ⁻¹)	794,3 ± 656,5 1.810,1 (11)	1.181,0 ± 743,2 3.214,3 (16)	1.960,3 ± 1.297,1 4.605,0 (20)
RH (mmol H ₂ g ⁻¹ DQO ⁻¹)	8,0 ± 9,3 68,1 (7)	8,4 ± 7,9 26,3 (11)	5,2 ± 4,1 15,0 (13)

Nota: Valores em *itálico* indicam os máximos registrados no período. Valores entre parênteses indicam o número de amostras utilizadas para o cálculo da média.

Legenda: pH = potencial hidrogeniônico do efluente; ER_{DQO} = eficiência de remoção de DQO total; SSV efluente = concentração de sólidos suspensos voláteis no efluente; H₂ = proporção de hidrogênio no biogás; VBG = vazão de biogás; PVH = produção volumétrica de hidrogênio; RH = rendimento de hidrogênio.

Os ensaios com maiores cargas orgânicas (E2 e E3) apresentaram valores de pH médio próximos e maiores que E1, os quais se aproximam da faixa ótima para a produção de H₂ que é de 6,0. Resultado semelhante foi relatado por Souza (2020), que também utilizou um RCTM alimentado com ARF. O ensaio foi conduzido com TDH real de aproximadamente 4,6 horas e carga orgânica volumétrica aplicada (COVa) de até 59,3 g DQO L⁻¹ d⁻¹; o pH do efluente variou entre 5,1 e 6,5, com média geral de 5,6 entre os quatro lotes de substratos testados. Nesses casos, um pH mais próximo de 6,0 favorece a via fermentativa butírica, na qual o fermentado rico em ácido láctico é convertido em ácido butírico, CO₂ e H₂, uma das rotas mais eficientes para a produção de bioH₂. Essa comparação reforça a relevância do pH como fator determinante na seleção das vias metabólicas durante a

fermentação acidogênica. Essa preferência metabólica é consistente com os achados de Fuess *et al.* (2019), que demonstraram que o controle do pH é uma estratégia operacional chave para direcionar as rotas metabólicas durante a fermentação escura da vinhaça de cana-de-açúcar: com $\text{pH} < 5,0$ favorecendo a fermentação láctica; pH entre 5,0 e 5,5 favorecendo a produção de butirato e bioH_2 ; e $\text{pH} > 6,0$ induzindo vias redutoras de sulfato.

A concentração de SSV no efluente também acompanhou o aumento da carga orgânica volumétrica, com os ensaios E2 e E3 apresentando concentrações médias próximas e mais elevadas que E1. Resultados semelhantes foram observados por Trevisan *et al.* (2023), que também verificaram aumento nas concentrações de SSV nos ensaios com maior carga orgânica. Os autores atribuíram esse comportamento ao aumento da concentração do substrato, sugerindo que a maior disponibilidade de matéria orgânica favorece o crescimento microbiano e, conseqüentemente, arraste da biomassa em excesso.

Da mesma forma, a ER_{DQO} , a VBG e a produção e a PVH apresentaram tendência de aumento com o incremento das COVs. Ao comparar o presente estudo com Trevisan (2020), que operou um RCTM com TDH de 4 horas e substrato sintético à base de sacarose, observa-se que, em seu trabalho, os valores de PVH, VBG e remoção de DQO foram mais elevados quando o RCTM foi operado com cargas orgânicas mais baixas. Por exemplo, com COV de $24 \text{ g DQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (ensaio E5), Trevisan relatou PVH de $958,2 \pm 407,9 \text{ mL H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, VBG de $1.716,5 \pm 917,3 \text{ mL d}^{-1}$ e eficiência de remoção de DQO de $23,2 \pm 16,1\%$. Em contraste, na maior COV aplicada ($96 \text{ g DQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, ensaio E8), a PVH caiu para $209,3 \pm 130,6 \text{ mL H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (redução de quase 78%), a VBG para $471,6 \pm 230,7 \text{ mL d}^{-1}$ e a remoção de DQO para $13,4 \pm 11,4\%$. Esses resultados indicam um efeito inibitório causado pelo excesso de substrato, comprometendo o desempenho microbiano e a produtividade de hidrogênio. Portanto, embora cargas orgânicas mais altas aumentem a disponibilidade de substrato, elas também podem ocasionar o acúmulo de metabólitos intermediários ou a inibição por substrato, comprometendo o desempenho do sistema.

Quanto às condições operacionais, o melhor desempenho observado nas maiores cargas pode ser atribuído à maior oferta de substrato, que favoreceu a atividade acidogênica e, conseqüentemente, a conversão da matéria orgânica. Por outro lado, a menor carga no ensaio E1 pode ter limitado o fornecimento de energia aos microrganismos, reduzindo o desempenho geral do reator. O maior valor médio de ER_{DQO} relatado por Rossi (2023), em um RCTM alimentado com ARF e 1,5% de glicerol, foi de 25,3% em COV aplicada de $39,1 \text{ g DQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Esse valor, embora superior ao reportado por Trevisan *et al.* (2023) na COV de $96,0 \text{ g DQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (21,9%), ainda está abaixo das eficiências máximas de remoção de DQO comumente relatadas para RCTMs, operando próximos à faixa ideal de carga, o que indica que pode ter ocorrido sobrecarga de substrato ou presença de outras condições inibitórias.

O teor de hidrogênio no biogás não aumentou proporcionalmente com o aumento da COV. Embora o ensaio E3 tenha apresentado as maiores PVH e VBG, a concentração média de hidrogênio no biogás foi inferior à observada em E1. Como consequência, o RH em E3 também foi o menor entre os ensaios. Esse resultado sugere que, quando há grande disponibilidade de substrato, parte da matéria orgânica pode ser desviada para vias metabólicas menos favoráveis à produção de hidrogênio, comprometendo a eficiência de conversão. Em contrapartida, o ensaio E2, conduzido com COV intermediária de 72 g DQO L⁻¹ d⁻¹, destacou-se por alcançar o maior RH (14,1 mmol H₂ g⁻¹ DQO), juntamente com altas taxas de conversão de ácido láctico (95%) e glicerina (65%), indicando um melhor equilíbrio entre oferta de substrato e seletividade metabólica.

Em comparação com outros estudos, os resultados obtidos reforçam a importância do ácido láctico como substrato estratégico e os benefícios da etapa de pré-fermentação. Rossi (2023), utilizando água residuária de fecularia de mandioca (ARF), suplementada com 1,5% de glicerol, mas sem a etapa de pré-fermentação láctica, relatou um teor médio de hidrogênio no biogás de 14,7% com COV aplicada de 74,6 g DQO L⁻¹ d⁻¹ — valor inferior aos observados em E1 (30,3%) e E3 (24,8%). Já García-Depraect *et al.* (2020) relataram um RH de apenas 1,1 mmol H₂ g⁻¹ DQO em condições semelhantes (TDH = 4 h; COV=42g DQO L⁻¹ d⁻¹) às do ensaio E1, no qual foi alcançado um RH de 8,0 mmol H₂ g⁻¹ DQO.

Em resumo, o E3 (96 g DQO L⁻¹ d⁻¹) apresentou o melhor desempenho, com maior vazão média de biogás (9.360,9 mL d⁻¹), maior produção média de H₂ (1.960,3 mL H₂ L⁻¹ d⁻¹) e maior eficiência média de remoção de DQO (41,8%). O E2 (72 g DQO L⁻¹ d⁻¹) teve desempenho intermediário, destacando-se pelo maior rendimento médio de hidrogênio (14,1 mmol H₂ g⁻¹ DQO⁻¹). Já o E1 (48 g DQO L⁻¹ d⁻¹), obteve os menores valores para a maioria dos parâmetros, mas apresentou a maior proporção média de H₂ no biogás (30,3%).

A comparação com outros estudos sugere que as condições adotadas neste trabalho, especialmente a utilização de um fermentado rico em ácido láctico, proveniente da cofermentação de água residuária de fecularia de mandioca com glicerol, favoreceram um melhor desempenho. Além de proporcionar maior seletividade microbiana, a etapa de pré-fermentação promoveu uma composição mais homogênea do substrato, o que pode ter contribuído para a estabilidade e a eficiência das rotas hydrogenogênicas.

A Figura 5 ilustra a evolução temporal dos ensaios com base nos parâmetros: potencial hidrogeniônico (pH) do efluente; eficiência de remoção de DQO total (ER_{DQO}); proporção de hidrogênio no biogás (H₂); rendimento de hidrogênio (RH); produção volumétrica de hidrogênio (PVH); e vazão de biogás (VBG).

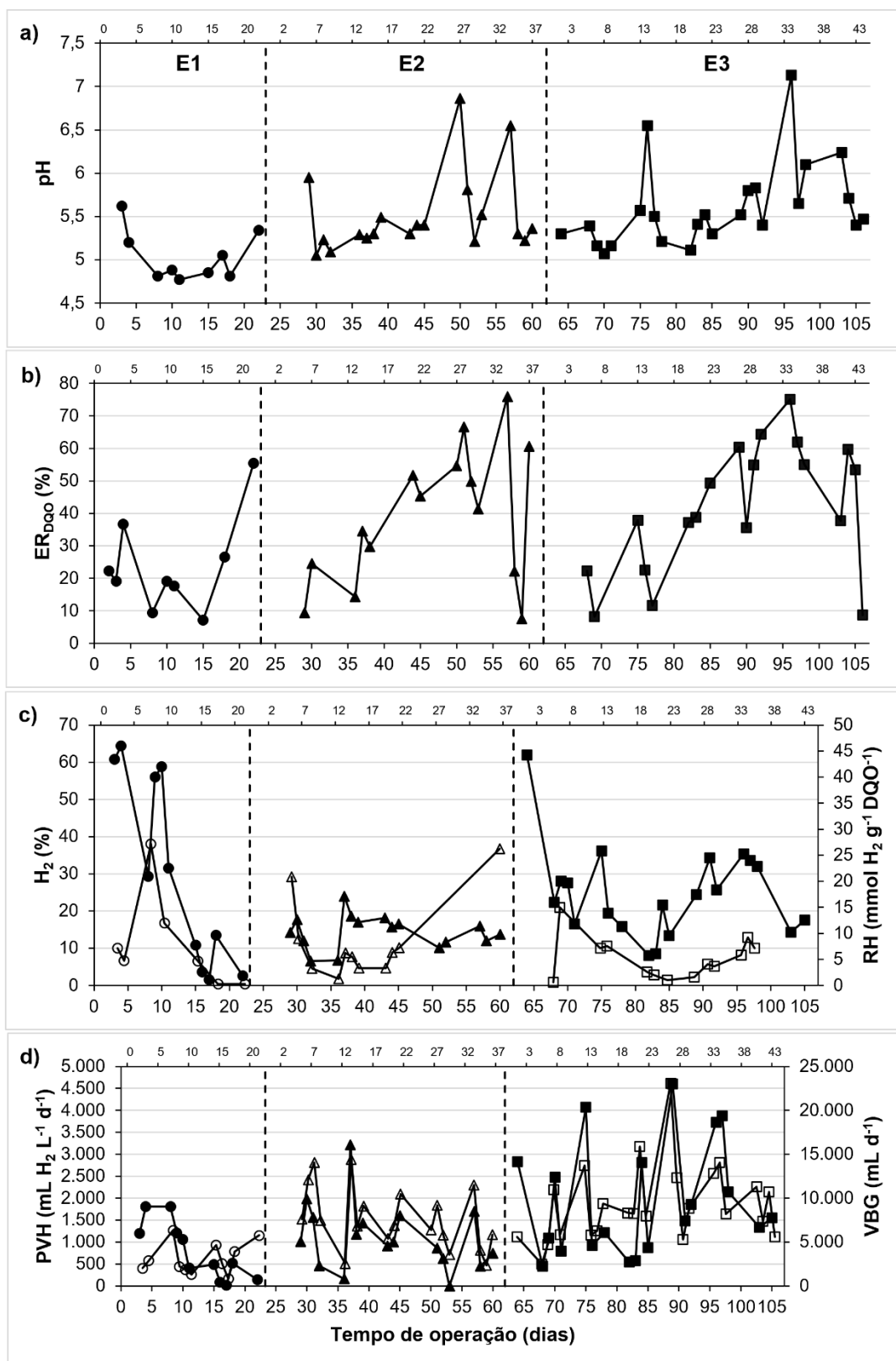


Figura 5 Desempenho do RCTM na produção de bio H_2 nos ensaios E1 (-●-; -○-) (48 g DQO L⁻¹ d⁻¹), E2 (-▲-; -Δ-) (72 g DQO L⁻¹ d⁻¹) e E3 (-■-; -□-) (96 g DQO L⁻¹ d⁻¹): (a) pH de saída do reator, (b) eficiência de remoção de DQO total (ER_{DQO}), (c) teor de hidrogênio no biogás (-●-; -◆-; -■-) e rendimento de hidrogênio (RH , -○-; -Δ-; -□-), (d) produção volumétrica de hidrogênio (PVH , -●-; -▲-; -■-) e vazão de biogás (VBG , -○-; -Δ-; -□-).

Ao comparar os ensaios de Trevisan (2020), conduzidos com cargas orgânicas de 48, 72 e 96 g DQO L⁻¹ d⁻¹ e com TDH de 4 horas, com os ensaios E1, E2 e E3 do presente estudo, que adotaram as mesmas cargas, foram observadas diferenças no comportamento temporal do pH e da ER_{DQO}. Em Trevisan (2020), o pH manteve-se consistentemente abaixo de 5,0 durante quase todo o período operacional. Já neste estudo, os valores de pH foram mais elevados e apresentaram maior estabilidade.

Em relação à ER_{DQO}, os ensaios de Trevisan (2020) mostraram comportamento irregular, com picos pontuais, mas sem tendência de crescimento. Em contrapartida, no presente estudo, em especial no E3, a ER_{DQO} aumentou progressivamente, com desempenho mais consistente e alinhado ao avanço da operação.

Apesar das elevadas concentrações de H₂ no biogás registradas nos primeiros dias de operação do E1, foi verificada queda acentuada desse indicador nos 15 dias subsequentes, indicando perda de estabilidade no sistema. Enquanto o E3, embora com valor médio inferior ao observado em E1, manteve desempenho expressivo, com oscilações distribuídas ao longo do período e picos acima de 35%, em diferentes fases da operação, em E2, o percentual de H₂ no biogás manteve-se abaixo de 20% ao longo de grande parte do ensaio, sugerindo uma possível intensificação de vias metabólicas alternativas desfavoráveis à geração de hidrogênio ou maior atividade de bactérias consumidoras de H₂.

Com suplementação da ARF com 1,5% (v/v) de glicerol e carga orgânica de 74,6 g DQO L⁻¹ d⁻¹, Rossi (2023), ao avaliar o teor de hidrogênio no biogás, observou uma tendência semelhante à do ensaio E1: um pico inicial de 32% de H₂, seguido por um declínio gradual. Embora essa tenha sido a condição mais favorável no trabalho de Rossi (2023), o desempenho foi inferior ao do ensaio E3, que, na COV de 96 g DQO L⁻¹ d⁻¹, atingiu teor médio de hidrogênio de 24,8% e manteve níveis significativos de H₂ ao longo de toda a operação, com flutuações bem distribuídas e picos acima de 35%.

A PVH e a VBG foram mais elevadas no ensaio E3, apresentando vários picos ao longo da operação e desempenho constante. O E2 teve desempenho intermediário, mantendo-se ao longo do tempo, sem quedas acentuadas. Já o E1, apresentou as menores médias, com declínio rápido após os primeiros dias. Esses resultados indicam que o E3 atingiu elevada PVH principalmente em função da maior vazão de biogás, o que compensou os baixos teores de H₂ no biogás, destacando-se ainda pela maior geração total de biogás (VBG).

Ao comparar o comportamento temporal da PVH e da VBG entre os ensaios conduzidos por Trevisan (2020) e os do presente estudo (E1, E2 e E3), todos conduzidos com cargas orgânicas volumétricas de 48, 72 e 96 g DQO L⁻¹ d⁻¹ e com TDH fixo de 4 horas, observaram-se tendências semelhantes em relação à dinâmica da PVH. Trevisan (2020) obteve picos de PVH superiores a 2.700 mL H₂ L⁻¹ d⁻¹ e valores elevados de VBG na COV de

48 g DQO L⁻¹ d⁻¹; em ambos os indicadores, a produção foi irregular, com oscilações intensas e queda abrupta na transição para cargas de 72 e 96 g DQO L⁻¹ d⁻¹. Já os ensaios E1, E2 e E3, demonstraram aumento progressivo tanto da PVH quanto da VBG, consistente com aumento da carga orgânica, especialmente no E3 (96 g DQO L⁻¹ d⁻¹), em que foram mantidos valores elevados e frequentes ao longo de toda a operação.

5.2.1 Distribuição dos metabólitos solúveis

A Figura 5 apresenta a distribuição percentual dos principais metabólitos presentes no afluente e no efluente dos ensaios E1, E2 e E3, conduzidos no RCTM, com o objetivo de avaliar a influência da COV na conversão do substrato e nas vias fermentativas predominantes. A análise concentrou-se em metabólitos, como os ácidos láctico, acético, propiônico e butírico, além da glicerina.

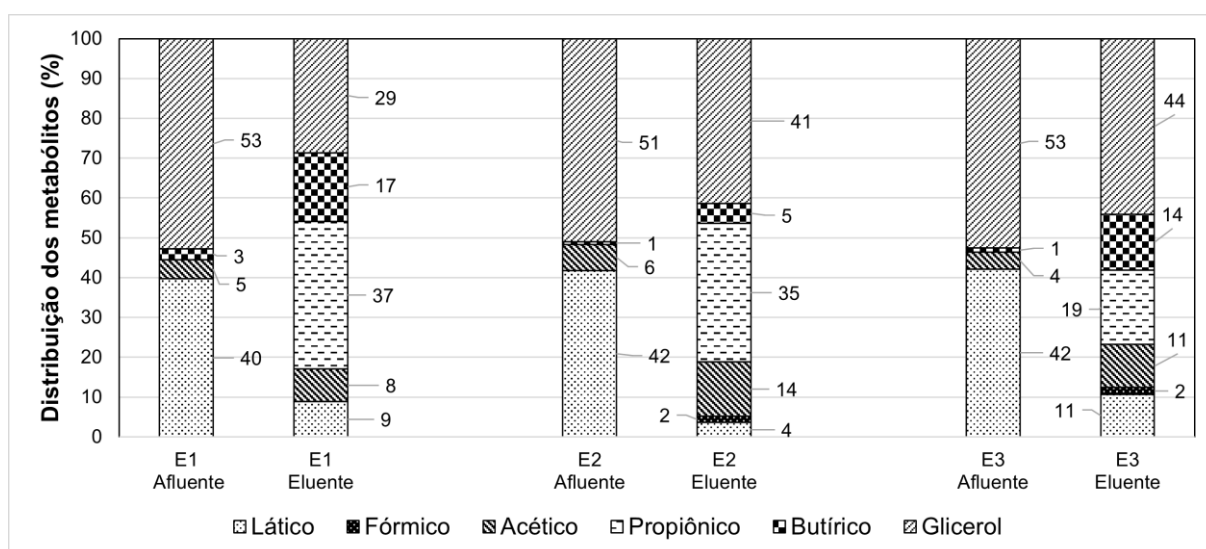


Figura 6 Distribuição percentual dos metabólitos solúveis no afluente e efluente do RCTM.

Os dados indicam que o afluente dos três reatores apresentou concentrações de ácido láctico e glicerina com valores próximos entre si: o ácido láctico variou de 40 a 42 %, e a glicerina de 51 a 53 %. Outros ácidos orgânicos, como os ácidos acético e butírico, estavam presentes em baixas concentrações, variando de 4% a 6% e de 1% a 3%, respectivamente. Essa composição inicial, rica em compostos fermentáveis, é comumente associada a substratos adequados às vias acidogênicas.

No efluente, observou-se uma redução significativa do ácido láctico em todos os reatores, com destaque para E2, que atingiu o menor valor (4%), indicando maior conversão. Esse comportamento é coerente com os estudos de Dreschke *et al.* (2015), que observaram

elevada conversão de ácido láctico em fermentações com microbiota adaptada. A presença crescente de ácidos orgânicos no efluente também está de acordo com García-Depraect *et al.* (2020), que destacam o papel do ácido láctico como intermediário na formação de butirato, H_2 e CO_2 , a partir da conversão conjunta de ácido láctico e acético em processos de cofermentação sob condições anaeróbias. Esse comportamento também é descrito por Braga & Lens (2023), que observaram consumo sequencial de ácido láctico com posterior aumento na produção de hidrogênio. Tais achados sugerem que, além de atuar como substrato inicial, o ácido láctico cumpre função estratégica na indução da rota butírica.

O ácido propiônico foi o metabólito verificado em maior concentração no efluente de E1 e E2, atingindo 37 e 35%, respectivamente, enquanto, em E3, o valor foi inferior (19%). Dentre os fatores que podem ter influenciado a diferença entre os reatores, Fuentes-Santiago *et al.* (2023) e Fuess *et al.* (2018) associam-na à presença de populações do gênero *Clostridium* e à influência do perfil ácido inicial, além das condições operacionais sobre a seleção microbiana e a dinâmica metabólica.

A concentração de ácido acético no efluente foi maior em E2 (14%), seguido de E3 (11 %) e E1 (8%). Já o ácido butírico, apresentou maior produção em E1 (17%), intermediário em E3 (14%) e menor em E2 (5%). Essa diferença sugere que o E2 apresentou uma condição mais oxidativa, favorecendo a formação de ácidos de cadeia curta (como o acético), enquanto E1 tendeu a rotas mais redutivas, com maior formação de butirato — resultado que se aproxima do observado por García-Depraect *et al.* (2019) e reforça a importância da relação entre substrato disponível e a seletividade da microbiota. García-Depraect *et al.* (2020) confirmam que o predomínio da rota butírica está diretamente associado à produção de hidrogênio, o que reforça o potencial observado em E1 em termos de rendimento. Esse comportamento também pode ser associado à capacidade tampão do sistema e ao equilíbrio redox, como sugerido por estudos de sistemas com alta carga orgânica, nos quais a estabilidade operacional depende fortemente do acoplamento entre os fluxos de elétrons e os destinos metabólicos finais. A produção de ácido fórmico, detectada apenas em E2 e E3 (2%), também é mencionada por Gu *et al.* (2018) como um indicativo de fermentações secundárias e pode estar associada à atividade de bactérias facultativas.

A Figura 7 apresenta as eficiências de conversão de ácido láctico e glicerina em cada um dos reatores. De maneira geral, todos os reatores mostraram elevada remoção de ácido láctico, com destaque para E2, que atingiu 95% de conversão, seguido por E1 (82%) e E3 (79%). Esse resultado reforça a eficácia dos três sistemas na degradação do ácido láctico. Segundo Aranda-Jaramillo *et al.* (2023), valores de conversão superiores a 90% indicam alta seletividade da microbiota e apontam para estabilidade operacional. Vale destacar que esse desempenho pode ser reflexo não apenas da configuração do reator, mas também de uma adaptação microbiana favorecida por parâmetros operacionais, como TDH, pH inicial e razão

substrato/microrganismo, fatores que são amplamente discutidos na literatura como críticos para o sucesso da fermentação acidogênica.

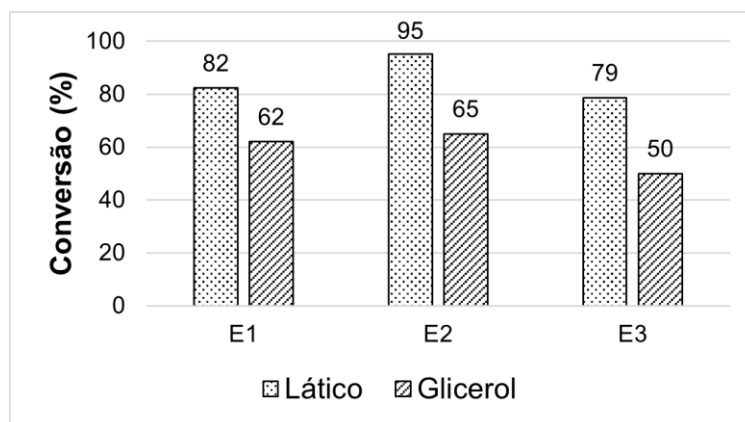


Figura 7 Eficiência de Conversão percentual do ácido láctico e glicerina.

Quanto à glicerina, observa-se que as conversões variaram de 50% (E3) a 65 % (E2). O E2 destaca-se com o melhor desempenho. O E1 apresentou conversão intermediária (62%), enquanto o E3 mostrou desempenho inferior (50%). A maior eficiência de conversão, no E2, para ambos os compostos, sugere um equilíbrio mais adequado entre as comunidades microbianas e as condições do processo, sendo esse reator o mais promissor em termos de degradação simultânea de ácido láctico e glicerina, além de indicar maior potencial para produção de bio-hidrogênio, conforme também sugerido por Fuess *et al.* (2018) e García-Depraect *et al.* (2020).

Segundo Trevisan (2020), em ensaios conduzidos em RCTM com sacarose sintética, as concentrações de todos os metabólitos foram crescentes com aumento da COV. Essa correlação direta entre COV, perfis metabólicos e rotas fermentativas foi também evidenciada por Fuentes-Santiago *et al.* (2023), que demonstraram a influência da razão carboidrato/ácido láctico sobre a dinâmica dos produtos e sua implicação na rota de produção de H_2 . Esse achado endossa a necessidade de um controle rigoroso da carga aplicada em sistemas de cofermentação complexa, especialmente quando se busca maximizar o rendimento energético e minimizar rotas desviantes.

De modo geral, os resultados sugerem que o reator E2, operado sob carga orgânica intermediária, apresentou melhor conversão dos substratos, mas essa conversão não se refletiu em maior produção de H_2 , resultando em menor proporção de H_2 na fase gasosa. Esse comportamento está em consonância com as observações de Dreschke *et al.* (2015), Gu *et al.* (2018) e García-Depraect *et al.* (2020), reforçando o papel da carga orgânica como fator determinante no direcionamento metabólico. Em síntese, a integração dos resultados experimentais, análises comparativas e evidências da literatura confirmam que a operação

otimizada sob cargas intermediárias se traduziu em melhor conversão do substrato em metabólitos acidogênicos relacionados à produção de H_2 , sustentando a rota lactato-butirato como estratégia promissora para a produção de bio-hidrogênio a partir de resíduos agroindustriais complexos.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo demonstram a viabilidade técnica do uso da água residuária de fecularia de mandioca (ARF) suplementada com glicerol como substrato para a produção de bioH_2 , por meio de um processo em duas etapas distintas, envolvendo a fermentação láctica em reator anaeróbio, operado em bateladas sequenciais, e a fermentação acidogênica, em reator contínuo de tubos múltiplos (RCTM). A produção do fermentado rico em ácido láctico (FLa) apresentou elevada homogeneidade entre os lotes e uma composição favorável à conversão energética, fornecendo uma base estável para a etapa seguinte. Durante a operação do RCTM, os ensaios conduzidos sob maiores cargas orgânicas mostraram aumentos significativos em indicadores-chave de desempenho, como vazão de biogás (VBG), produção volumétrica de hidrogênio (PVH) e eficiência de remoção de DQO (ER_{DQO}), especialmente no ensaio E3 ($96 \text{ g DQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), demonstrando que a maior disponibilidade de substrato influencia positivamente o desempenho geral do sistema.

Por outro lado, o ensaio E2, operado com carga orgânica intermediária ($72 \text{ g DQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), destacou-se por alcançar o maior rendimento de hidrogênio (RH) e as maiores taxas de conversão de ácido láctico e glicerina, indicando um equilíbrio mais favorável entre as vias metabólicas hidrogenogênicas. Esses achados são consistentes com a literatura e confirmam que a carga orgânica aplicada é um fator determinante tanto para o direcionamento metabólico quanto para a eficiência operacional em sistemas de fermentação anaeróbia, sendo as cargas intermediárias as mais promissoras para maximizar a produção de bioH_2 .

Portanto, a estratégia de cofermentação, utilizando um substrato rico em ácido láctico, conforme proposta neste trabalho, mostra-se uma abordagem viável e estratégica para a valorização de resíduos agroindustriais na forma de biocombustíveis renováveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOUDI, K. *et al.* Biogas, biohydrogen, and polyhydroxyalkanoates production from organic waste in the circular economy context. **Sustainable Biofuels: Opportunities and Challenges**, p. 305-343, jan. 2021.
- ACIN-ALBIAC, M. *et al.* Role of Lactic Acid Bacteria Phospho- β -Glucosidases during the Fermentation of Cereal by-Products. **Foods**, v. 10, n. 1, p. 97, jan. 2021.
- AHMAD, A. *et al.* Biohydrogen production through dark fermentation: Recent trends and advances in transition to a circular bioeconomy. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 52, p. 335-357, jan. 2024.
- AHMED, S. F. *et al.* Biohydrogen production from wastewater-based microalgae: Progresses and challenges. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 47, n. 88, p. 37321-37342, out. 2022.
- AIE. **Perspectivas energéticas mundiais 2019** – análise. Disponível em: <https://www.iea.org/reports/world-energy-outlook-2019>. Acesso em: 26 jun. 2025.
- ALVES, I. R. F. S. *et al.* Assessing the use of crude glycerol from biodiesel production as an alternative to boost methane generation by anaerobic co-digestion of sewage sludge. **Biomass and Bioenergy**, v. 143, p. 105831, dez. 2020.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; WATER ENVIRONMENT FEDERATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. Disponível em: <https://www.standardmethods.org/doi/book/10.2105/SMWW.2882>. Acesso em: 26 jun. 2025.
- ANDREANI, C. L. *et al.* Hydrogen production from cassava processing wastewater in an anaerobic fixed bed reactor with bamboo as a support material. **Engenharia Agrícola**, v. 35, n. 3, p. 578-587, 2015.
- ANDREANI, C. L. *et al.* . Impact of operational conditions on development of the hydrogen-producing microbial consortium in an AnSBBR from cassava wastewater rich in lactic acid. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, n. 3, p. 1474-1482, jan. 2019a.
- ANDREANI, C. L. *et al.* Impact of operational conditions on development of the hydrogen-producing microbial consortium in an AnSBBR from cassava wastewater rich in lactic acid. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, n. 3, p. 1474-1482, jan. 2019b.
- ANDREANI, C. L. *et al.* . Impact of operational conditions on development of the hydrogen-producing microbial consortium in an AnSBBR from cassava wastewater rich in lactic acid. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, n. 3, p. 1474-1482, jan. 2019c.
- ANDREANI, C. L. *et al.* . Compositional variability as a major hindering factor in continuous biohydrogen production from cassava starch wastewater: Possible solutions for complex substrates. **International Journal of Energy Research**, v. 46, n. 9, p. 12722-12736, jul. 2022a.
- ANDREANI, C. L. *et al.* . Compositional variability as a major hindering factor in continuous biohydrogen production from cassava starch wastewater: Possible solutions for complex

substrates. **International Journal of Energy Research**, v. 46, n. 9, p. 12722-12736, jul. 2022b.

ARANDA-JARAMILLO, B. *et al.* Feasibility Study of Biohydrogen Production from Acid Cheese Whey via Lactate-Driven Dark Fermentation. **Fermentation** **2023**, v. 9, n. 7, p. 644, 9 jul. 2023.

BAEYENS, J. *et al.* Reviewing the potential of bio-hydrogen production by fermentation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 131, p. 110023, out. 2020.

BASTIDAS-OYANEDEL, J. R. *et al.* Dark fermentation biorefinery in the present and future (bio)chemical industry. **Reviews in Environmental Science and Bio/technology**, v. 14, n. 3, p. 473-498, jul. 2015.

BRAGA, A. F. M.; LENS, P. N. L. Pretreatment optimisation of *Ulva* spp. for production of bioH₂ and lactic acid as added-value product. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 48, n. 86, p. 33466-33482, 2023.

CABROL, L. *et al.* Microbial ecology of fermentative hydrogen producing bioprocesses: Useful insights for driving the ecosystem function. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n. 2, p. 158-181, mar. 2017.

CASTELLÓ, E. *et al.* Stability problems in the hydrogen production by dark fermentation: Possible causes and solutions. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 119, p. 109602, mar. 2020a.

CASTELLÓ, E. *et al.* . Stability problems in the hydrogen production by dark fermentation: possible causes and solutions. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 119, p. 1-16, mar. 2020b.

CASTRO, T. M. DE *et al.* Anaerobic co-digestion of industrial waste landfill leachate and glycerin in a continuous anaerobic bioreactor with a fixed-structured bed (ABFSB): Effects of volumetric organic loading rate and alkaline supplementation. **Renewable Energy**, v. 164, p. 1436-1446, fev. 2021.

CHATZIFRAGKOU, A.; PAPANIKOLAOU, S. Effect of impurities in biodiesel-derived waste glycerol on the performance and feasibility of biotechnological processes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 95, n. 1, p. 13-27, mai. 2012.

CORBARI, S. D. M. L. *et al.* Strategies to improve the biohydrogen production from cassava wastewater in fixed-bed reactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, n. 32, p. 17214-17223, jun. 2019a.

CORBARI, S. D. M. L. *et al.* Strategies to improve the biohydrogen production from cassava wastewater in fixed-bed reactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, n. 32, p. 17214-17223, jun. 2019b.

CORBARI, S. D. M. L. *et al.* Strategies to improve the biohydrogen production from cassava wastewater in fixed-bed reactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, n. 32, p. 17214-17223, jun. 2019c.

COSTA, S. *et al.* Fermentation as a Strategy for Bio-Transforming Waste into Resources: Lactic Acid Production from Agri-Food Residues. **Fermentation**, v. 7, n. 1, p. 3, dez. 2020.

CRUZ, I. A. *et al.* Valorization of cassava residues for biogas production in Brazil based on the circular economy: An updated and comprehensive review. **Cleaner Engineering and**

Technology, v. 4, p. 100196, out. 2021.

DIAZ, G.; MUÑOZ, F. D.; MORENO, R. Renewable and Nonrenewable Energy Consumption, Economic Growth, and Emissions. **International Evidence**, v. 41, n. 2, p. 93-122, mar. 2020.

DIEZ-GONZALEZ, F.; RUSSELL, J. B.; HUNTER, J. B. The role of an NAD-independent lactate dehydrogenase and acetate in the utilization of lactate by *Clostridium acetobutylicum* strain P262. **Archives of Microbiology**, v. 164, n. 1, p. 36-42, jul. 1995.

DRESCHKE, G. *et al.* Lactic acid and methane: Improved exploitation of biowaste potential. **Bioresource Technology**, v. 176, n. 2015, p. 47-55, 2015.

FUENTES-SANTIAGO, V. *et al.* Carbohydrates/acid ratios drives microbial communities and metabolic pathways during biohydrogen production from fermented agro-industrial wastewater. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 11, n. 3, 2023.

FUESS, L. T. *et al.* Temporal dynamics and metabolic correlation between lactate-producing and hydrogen-producing bacteria in sugarcane vinasse dark fermentation: The key role of lactate. **Bioresource Technology**, v. 247, n. September 2017, p. 426-433, 2018a.

FUESS, L. T. *et al.* Temporal dynamics and metabolic correlation between lactate-producing and hydrogen-producing bacteria in sugarcane vinasse dark fermentation: The key role of lactate. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 426-433, jan. 2018b.

FUESS, L. T. *et al.* Temporal dynamics and metabolic correlation between lactate-producing and hydrogen-producing bacteria in sugarcane vinasse dark fermentation: The key role of lactate. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 426-433, jan. 2018c.

GARCÍA-DEPRAECT, O. *et al.* Lactate- and acetate-based biohydrogen production through dark co-fermentation of tequila vinasse and nixtamalization wastewater: Metabolic and microbial community dynamics. **Bioresource Technology**, v. 282, n. February, p. 236-244, 2019.

GARCÍA-DEPRAECT, O. *et al.* Three-stage process for tequila vinasse valorization through sequential lactate, biohydrogen and methane production. **Bioresource Technology**, v. 307, n. January, 2020.

GARCÍA-DEPRAECT, O. *et al.* A review on the factors influencing biohydrogen production from lactate: The key to unlocking enhanced dark fermentative processes. **Bioresource Technology**, v. 324, p. 124595, mar. 2021a.

GARCÍA-DEPRAECT, O. *et al.* A review on the factors influencing biohydrogen production from lactate: The key to unlocking enhanced dark fermentative processes. **Bioresource Technology**, v. 324, p. 124595, mar. 2021b.

GARCÍA-DEPRAECT, O. *et al.* A review on the factors influencing biohydrogen production from lactate: The key to unlocking enhanced dark fermentative processes. **Bioresource Technology**, v. 324, p. 124595, mar. 2021c.

GARCÍA-DEPRAECT, O. *et al.* A review on the factors influencing biohydrogen production from lactate: The key to unlocking enhanced dark fermentative processes. **Bioresource Technology**, v. 324, mar. 2021d.

GARCÍA-DEPRAECT, O. *et al.* Two-stage anaerobic digestion of food waste: Enhanced bioenergy production rate by steering lactate-type fermentation during hydrolysis-acidogenesis. **Bioresource Technology**, v. 358, p. 127358, ago. 2022.

GOMES, S. D. *et al.* The application of an innovative continuous multiple tube reactor as a strategy to control the specific organic loading rate for biohydrogen production by dark fermentation. **Bioresource Technology**, v. 197, p. 201-207, dez. 2015a.

GOMES, S. D. *et al.* The application of an innovative continuous multiple tube reactor as a strategy to control the specific organic loading rate for biohydrogen production by dark fermentation. **Bioresource Technology**, v. 197, p. 201-207, dez. 2015b.

GOMES, S. D. *et al.* Bacteriocins of lactic acid bacteria as a hindering factor for biohydrogen production from cassava flour wastewater in a continuous multiple tube reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 19, p. 8120-8131, mai. 2016a.

GOMES, S. D. *et al.* Bacteriocins of lactic acid bacteria as a hindering factor for biohydrogen production from cassava flour wastewater in a continuous multiple tube reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 19, p. 8120-8131, mai. 2016b.

GOMES, S. D. *et al.* . Bacteriocins of lactic acid bacteria as a hindering factor for biohydrogen production from cassava flour wastewater in a continuous multiple tube reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 19, p. 8120-8131, 25 mai. 2016c.

GU, X. Y.; LIU, J. Z.; WONG, J. W. C. Control of lactic acid production during hydrolysis and acidogenesis of food waste. **Bioresource Technology**, v. 247, n. September 2017, p. 711–715, 2018.

GUNKOVA, P. I. *et al.* Carbohydrate Fermentation Test of Lactic Acid Starter Cultures. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 852, n. 1, p. 012035, set. 2021.

HAFEZ, H. *et al.* Effect of organic loading on a novel hydrogen bioreactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, n. 1, p. 81-92, jan. 2010.

HASSAN, Q. *et al.* A review of green hydrogen production based on solar energy; techniques and methods. **Energy Harvesting and Systems**, v. 11, n. 1, jan. 2024.

KAINTHOLA, J.; KALAMDHAD, A. S.; GOUD, V. V. Optimization of process parameters for accelerated methane yield from anaerobic co-digestion of rice straw and food waste. **Renewable Energy**, v. 149, p. 1352-1359, abr. 2020.

LARSEN, A. C. *et al.* Anaerobic co-digestion of crude glycerin and starch industry effluent. **Engenharia Agrícola**, v. 33, n. 2, p. 341-352, 2013.

LAZARO, C. Z. *et al.* Hydrogen production and consumption of organic acids by a phototrophic microbial consortium. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 16, p. 11691-11700, ago. 2012.

LOVATO, G. *et al.* Co-digestion of Whey with Glycerin in an AnSBBR for Biomethane Production. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 178, n. 1, p. 126-143, jan. 2016.

LOVATO, G. *et al.* Energetic feasibility of a two-stage anaerobic digestion system compared to a single-stage system treating whey and glycerin. **Biochemical Engineering Journal**, v. 161, p. 107653, set. 2020.

MASOUDI SOLTANI, S. *et al.* Sorption-enhanced Steam Methane Reforming for Combined

CO₂ Capture and Hydrogen Production: A State-of-the-Art Review. **Carbon Capture Science & Technology**, v. 1, p. 100003, dez. 2021.

MAYYAS, A.; WEI, M.; LEVIS, G. Hydrogen as a long-term, large-scale energy storage solution when coupled with renewable energy sources or grids with dynamic electricity pricing schemes. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 45, n. 33, p. 16311-16325, jun. 2020.

MEGIA, P. J. *et al.* Hydrogen Production Technologies: From Fossil Fuels toward Renewable Sources. A Mini Review. **Energy and Fuels**, v. 35, n. 20, p. 16403-16415, out. 2021a.

MEGIA, P. J. *et al.* . Hydrogen Production Technologies: From Fossil Fuels toward Renewable Sources. A Mini Review. **Energy and Fuels**, v. 35, n. 20, p. 16403-16415, out. 2021b.

MEIER, T. R. W. *et al.* Production of biohydrogen by an anaerobic digestion process using the residual glycerol from biodiesel production as additive to cassava wastewater. **Journal of Cleaner Production**, v. 258, p. 120833, jun. 2020a.

MEIER, T. R. W. *et al.* . Production of biohydrogen by an anaerobic digestion process using the residual glycerol from biodiesel production as additive to cassava wastewater. **Journal of Cleaner Production**, v. 258, jun. 2020b.

NOIKE, T. *et al.* Inhibition of hydrogen fermentation of organic wastes by lactic acid bacteria. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 27, n. 11-12, p. 1367-1371, nov. 2002.

OLABI, A. G. *et al.* Large-vs scale hydrogen production and storage technologies: Current status and future directions. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 46, n. 45, p. 23498-23528, jul. 2021.

OLIVEIRA SCHMIDT, V. K. DE *et al.* Cassava wastewater valorization for the production of biosurfactants: surfactin, rhamnolipids, and mannosileritritol lipids. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 39, n. 2, p. 65, dez. 2022.

ONWUEMEZIE, L.; GOHARI DARABKHANI, H.; MONTAZERI-GH, M. Pathways for low carbon hydrogen production from integrated hydrocarbon reforming and water electrolysis for oil and gas exporting countries. **Sustainable Energy Technologies and Assessments**, v. 61, p. 103598, jan. 2024.

OSMAN, A. I. *et al.* Hydrogen production, storage, utilisation and environmental impacts: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 20, n. 1, p. 153-188, out. 2021.

PANIGRAHY, B.; NARAYAN, K.; RAMACHANDRA RAO, B. Green hydrogen production by water electrolysis: A renewable energy perspective. **Materials Today: Proceedings**, v. 67, p. 1310-1314, jan. 2022.

PEIXOTO, G. *et al.* Hydrogen production from soft-drink wastewater in an upflow anaerobic packed-bed reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 15, p. 8953-8966, jul. 2011.

PENTEADO, E. D. *et al.* Influence of seed sludge and pretreatment method on hydrogen production in packed-bed anaerobic reactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 14, p. 6137-6145, mai. 2013.

PILAR ANZOLA-ROJAS, M. DEL *et al.* The use of the carbon/nitrogen ratio and specific

organic loading rate as tools for improving biohydrogen production in fixed-bed reactors. **Biotechnology Reports**, v. 5, n. 1, p. 46-54, mar. 2015a.

PILAR ANZOLA-ROJAS, M. DEL *et al.* . The use of the carbon/nitrogen ratio and specific organic loading rate as tools for improving biohydrogen production in fixed-bed reactors. **Biotechnology Reports**, v. 5, n. 1, p. 46-54, mar. 2015b.

PILAR ANZOLA-ROJAS, M. DEL *et al.* The use of the carbon/nitrogen ratio and specific organic loading rate as tools for improving biohydrogen production in fixed-bed reactors. **Biotechnology Reports**, v. 5, n. 1, p. 46-54, mar. 2015c.

QAZI, U. Y. Future of Hydrogen as an Alternative Fuel for Next-Generation Industrial Applications; Challenges and Expected Opportunities. **Energies** **2022**, v. 15, n. 13, p. 4741, jun. 2022.

RAWOOF, S. A. A. *et al.* Sequential production of hydrogen and methane by anaerobic digestion of organic wastes: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 19, n. 2, p. 1043-1063, out. 2020.

RICH, J. O. *et al.* Resolving bacterial contamination of fuel ethanol fermentations with beneficial bacteria – An alternative to antibiotic treatment. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 357-362, jan. 2018.

RODRÍGUEZ-ABALDE, Á.; FLOTATS, X.; FERNÁNDEZ, B. Optimization of the anaerobic codigestion of pasteurized slaughterhouse waste, pig slurry and glycerine. **Waste Management**, v. 61, p. 521-528, mar. 2017.

ROSA, P. R. F. *et al.* The effects of seed sludge and hydraulic retention time on the production of hydrogen from a cassava processing wastewater and glucose mixture in an anaerobic fluidized bed reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 25, p. 13118-13127, ago. 2014.

ROSSI, L. C. C. L. **Codigestão de água residuária de fecularia de mandioca em reator contínuo de tubos múltiplos: efeito do percentual de glicerol sobre a produção de BioH₂**. : Prof.^a Dr.^a Simone Damasceno Gomes. 2023. 41 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, Unioeste, Cascavel, 2023.

SÁ, L. R. V. DE; CAMMAROTA, M. C.; FERREIRA-LEITÃO, V. S. Produção de hidrogênio via fermentação anaeróbia - aspectos gerais e possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais brasileiros. **Química Nova**, v. 37, n. 5, p. 857-867, 2014.

SANTIAGO, S. G. *et al.* The hydraulic retention time influences the abundance of Enterobacter, Clostridium and Lactobacillus during the hydrogen production from food waste. **Letters in applied microbiology**, v. 69, n. 3, p. 138-147, 2019.

SIVARANJANI, R. *et al.* A comprehensive review on biohydrogen production pilot scale reactor technologies: Sustainable development and future prospects. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 48, n. 62, p. 23785-23820, jul. 2023.

SONG, Y.-J. *et al.* Characteristics of Biogas Production from Organic Wastes Mixed at Optimal Ratios in an Anaerobic Co-Digestion Reactor. **Energies** **2021**, v. 14, n. 20, p. 6812, out. 2021.

SOO KIM, M. *et al.* Hydrogen Production: State of Technology. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 544, n. 1, p. 012011, jul. 2020.

SOUZA, W. G. de. **Produção de biohidrogênio com água residuária de fecularia de mandioca em reator contínuo de tubos múltiplos**. Orientadora: Prof.^a Dr.^a Simone Damasceno Gomes. 2020. 128 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola – Área de concentração em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2020. Disponível em: https://tede.unioeste.br/bitstream/tede/5142/5/Willyan_Souza2020.pdf. Acesso em: 26 jun. 2025.

SREETHAWONG, T. *et al.* Hydrogen production from cassava wastewater using an anaerobic sequencing batch reactor: Effects of operational parameters, COD:N ratio, and organic acid composition. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, n. 9, p. 4092-4102, mai. 2010.

TAKEDA, P. Y.; GOTARDO, J. T.; GOMES, S. D. Anaerobic co-digestion of leachate and glycerol for renewable energy generation. **Environmental Technology**, v. 43, n. 8, p. 1118-1128, abr. 2022.

TALAPKO, D. *et al.* Biological Hydrogen Production from Biowaste Using Dark Fermentation, Storage and Transportation. **Energies**, v. 16, n. 8, abr. 2023a.

TALAPKO, D. *et al.* Biological Hydrogen Production from Biowaste Using Dark Fermentation, Storage and Transportation. **Energies** **2023**, v. 16, n. 8, p. 3321, abr. 2023b.

TREVISAN, A. P. *et al.* Continuous multiple tube reactor in the hydrogen production using sucrose. **Chemical Engineering Transactions**, v. 74, n. April 2018, p. 181-186, 2019.

TREVISAN, A. P. *et al.* Reaching the operating limit of the continuous multiple tube reactor: Still a promising technology for maximizing fermentative biohydrogen production? **Biochemical Engineering Journal**, v. 200, p. 109083, nov. 2023.

TREVISAN, A. P. *et al.* Improving the Continuous Multiple Tube Reactor: an Innovative Bioreactor Configuration with Great Potential for Dark Fermentation Processes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 196, n. 1, p. 457-477, jan. 2024.

TREVISAN, A. P. **Atributos do reator anaeróbio contínuo de tubos múltiplos no controle da carga orgânica volumétrica específica na fase acidogênica visando à produção de hidrogênio**. Orientadora: Prof.^a Dr.^a Simone Damasceno Gomes. 2020. 101f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola – Área de concentração em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2020. Disponível em: https://tede.unioeste.br/bitstream/tede/5016/5/Ana_Trevisan2020.pdf. Acesso em: 26 jun. 2025.

UDDIN, M. N. *et al.* Prospects of Bioenergy Production From Organic Waste Using Anaerobic Digestion Technology: A Mini Review. **Frontiers in Energy Research**, v. 9, p. 627093, fev. 2021a.

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

XU, X.; ZHOU, Q.; YU, D. The future of hydrogen energy: Bio-hydrogen production technology. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 47, n. 79, p. 33677-33698, set. 2022.

YAN, B. H.; SELVAM, A.; WONG, J. W. C. Bio-hydrogen and methane production from twophase anaerobic digestion of food waste under the scheme of acidogenic off-gas reuse. **Bioresource Technology**, v. 297, p. 122400, fev. 2020.

ZHANG, X. *et al.* Enhancement of the biohydrogen production performance from mixed substrate by photo-fermentation: Effects of initial pH and inoculation volume ratio. **Bioresource Technology**, v. 319, jan. 2021.