

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
ENGENHARIA AMBIENTAL**

FELIPE CANHETTI DE OLIVEIRA

**FORMAÇÃO DE BIOMASSA ACIDOGÊNICA E PRODUÇÃO BIOLÓGICA DE
HIDROGÊNIO A PARTIR DE VINHAÇA DE CANA- DE-AÇÚCAR EM
TERMOFILIA EXTREMA**

SÃO CARLOS

2019

FELIPE CANHETTI DE OLIVEIRA

**FORMAÇÃO DE BIOMASSA ACIDOGÊNICA E PRODUÇÃO BIOLÓGICA DE
HIDROGÊNIO A PARTIR DE VINHAÇA DE CANA- DE-AÇÚCAR EM
TERMOFILIA EXTREMA**

Monografia apresentada ao curso de
graduação em Engenharia Ambiental da
Escola de Engenharia de São Carlos da
Universidade de São Paulo.

Orientadora: Dra. Mirian Yasmine
Krauspenhar Niz

SÃO CARLOS

2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues
Fontes da EESC/USP

O48f Oliveira, Felipe Canhetti de
Formação de biomassa acidogênica e produção biológica de hidrogênio a partir de vinhaça de cana-de-açúcar em termofilia extrema / Felipe Canhetti de Oliveira; orientadora Mirian Yasmine Krauspenhar Niz. -- São Carlos, 2019.

Monografia (Graduação em Engenharia Ambiental) -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2019.

1. Vinhaça. 2. Biohidrogênio. 3. Acidogênese. 4. pH. 5. Hipertermofilia. I. Título.

Elaborado por Elena Luzia Palloni Gonçalves – CRB 8/4464

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato(a): **Felipe Canhetti de Oliveira**

Data da Defesa: 28/10/2019

Comissão Julgadora:

Resultado:

Dra. Mirian Yasmine Krauspenhar Niz (Orientador(a))

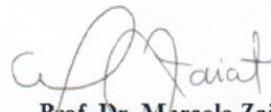
Aprovado

Dr. Lucas Tadeu Fuess

Aprovado

Dra. Adriana Ferreira maluf Braga

Aprovado



Prof. Dr. Marcelo Zaiat

Coordenador da Disciplina 1800091- Trabalho de Graduação

*Ao meu pai Silvio, à minha mãe
Cristiane, à minha irmã Carolina e
aos meus avós Nancy e Aparecida,
Odircio e Silvio por toda confiança,
compreensão, fé e apoio dedicados
a mim durante a graduação.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado essa oportunidade de estudos e por ter me trazido forças e guiado meu caminho em toda essa trajetória acadêmica.

Aos meus pais, Cristiane e Silvio, pelo amor incondicional, pelo suporte dado durante minha vida e por todos os conhecimentos que com eles aprendi. Além de toda ajuda e compreensão que tiveram durante minha graduação, acreditando no meu sonho e me incentivando em todos os momentos.

À minha irmã Carolina, pelos momentos que passamos juntos, aprendizados e todo amor que não pode ser descrito em palavras.

Ao meu irmão de coração, André Brabo, por sua amizade que me trouxe muito conhecimento e força sem os quais não concluiria a graduação.

Ao professor Marcelo Zaiat, que me deu a oportunidade de realizar essa pesquisa e a quem devo inúmeros ensinamentos. Sugestão: Acho que tb seria legal agradecer aos membros do Laboratório – daí coloca o nome do lab do seu professor pelo trabalho de equipe e apoio recebido...

À minha querida orientadora Mirian, por toda a parceria e carinho nesses anos de amizade e trabalho conjuntos e por ter contribuído no meu processo de amadurecimento e aprendizado em boa parte da minha jornada acadêmica, em especial, durante a pesquisa realizada para esse TCC.

Aos meninos da amada República Feudo, que contribuíram de maneira incalculável para minha formação como pessoa e me forneceram muitos ensinamentos do dia-a-dia.

Aos meus queridos amigos Murilo, Vinícius, Leo, Gustavo e Marcelo, também da minha república, que sempre estiveram presentes nos momentos em que precisei deles.

À minha amiga Janna Battistella, por toda paciência e parceria nos momentos mais importantes, me trazendo luz, fé e força.

Aos meus amigos de graduação com os quais passei pelos mais diversos momentos e juntos lutamos para nos tornar Engenheiros Ambientais.

À FAPESP por ter financiado este projeto e me auxiliado em minha caminhada como pesquisador.

RESUMO

OLIVEIRA, F. C. **Formação de biomassa acidogênica e produção biológica de hidrogênio a partir de vinhaça de cana-de-açúcar em termofilia extrema.** 2019. 57 f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

O desenvolvimento tecnológico visando a recuperação energética a partir de efluentes industriais em reatores anaeróbios cresce como uma importante ferramenta de tratamento e destinação desses resíduos. A vinhaça, o principal resíduo líquido gerado durante o processo produtivo do etanol, frequentemente utilizada na fertirrigação de canaviais, apresenta forte potencial para produção biológica de hidrogênio e metano. Em estudos anteriores para produção de hidrogênio a partir da vinhaça, melhores resultados de produção e estabilidade foram observados em condição termofílica em relação à condição mesofílica. Esse fato, aliado as altíssimas temperaturas nas quais a vinhaça deixa as colunas de destilação (85°C - 100°C), incentivam a avaliação da produção de hidrogênio em temperaturas superiores à termofilia (>55°C). A presente pesquisa teve por objetivo avaliar aspectos da produção biológica de hidrogênio a partir da vinhaça de cana-de-açúcar sob condição termofílica extrema. Os aspectos avaliados foram: crescimento e aderência de biomassa acidogênica em meio suporte inerte (FASE 1) e pH de fermentação (FASE 2). Na FASE 1, reatores anaeróbicos horizontais de leito fixo diferenciais (RAHLFD) foram utilizados e o crescimento de biomassa foi monitorada por meio de análises periódicas da série de sólidos dos reatores. Na FASE 2, os ensaios foram realizados em batelada em reatores de 500mL. Cinco tentativas foram realizadas com diferentes inóculos, pHs iniciais e diluições da vinhaça. Os resultados obtidos indicam que, na FASE 1, houve crescimento linear de lodo no período operacional, e que a condição extrema de temperatura (70°C) promoveu menor acúmulo de biomassa no leito dos reatores diferenciais, comparativamente à condição termofílica (50°C), a velocidade de acumulação de microorganismos foi de 4,13 dia⁻¹ em termofilia, contra -0,33 dia⁻¹ em termofilia extrema. A menor aderência de biomassa pode ser explicada pela baixa produção de polímeros extracelulares em temperaturas elevadas, os quais tem a função de promover a aderência superficial e formação de flocos. Os ensaios cinéticos para determinação do melhor pH inicial de fermentação para produção de hidrogênio não apresentaram produção de hidrogênio. Acredita-se que os inóculos utilizados não viabilizaram o estabelecimento de uma comunidade microbiana produtora de hidrogênio em termofilia extrema.

Palavras-chave: Vinhaça. Biohidrogênio. Acidogênese. pH. Hipertermofilia.

ABSTRACT

OLIVEIRA, F. C. **Acidogenic biomass formation and biologic hydrogen production from sugar vinasse under extreme thermophilic condition.** 2019. 57 f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

The technological development aiming energy recovery from industrial wastewater in anaerobic reactors has been growing as an important tool for the treatment and destination of these wastes. Stillage or sugarcane vinasse, is the main liquid waste generated during the ethanol production process and has a strong potential for biological hydrogen production, thus representing an alternative for energy generation. In previous studies for hydrogen production from sugarcane vinasse in anaerobic reactors, better production and stability results were observed in thermophilic condition (than in mesophilic condition). Furthermore, the high temperatures in which the vinasse leaves the distillation columns (85°C - 100°C), stimulates the evaluation of biological hydrogen production in extreme thermophilic conditions (> 55°C). The purpose of this research was to evaluate aspects of biological hydrogen production from sugarcane vinasse in extreme thermophilic condition (70°C), such as the growth and adhesion of biomass in inert support material (PHASE 1) and the influence of initial pH in the fermentation broth (PHASE 2). Horizontal Fixed Bed Anaerobic Reactors and solid analysis were used to determine biomass adhesion in PHASE 1. In PHASE 2, batch tests were performed in 500 mL Duran bottles. Five attempts were performed with different inoculum, initial pH and dilution of the vinasse. In PHASE 1, the results indicate that there was a linear growth of biomass in the operational period, and that the extreme temperature condition (70°C) promoted lower accumulation of biomass in the bed of the differential reactors, compared to the operation in thermophilic condition (55°C), the microorganisms accumulation speed was equal to 4.13 day⁻¹ in thermophilic conditions, against -0.33 day⁻¹ in extreme thermophilic conditions. The lower adherence of biomass could be explained by the lower extracellular polymers production in higher temperatures, which main function is to promote superficial adherence and flocculation. Lower biomass accumulation represents a positive aspect for the operation of fixed bed reactors in the production of hydrogen because, as verified in previous studies, one of the main operational problems in these reactors is the excessive growth of biomass that decreases the production of hydrogen. The kinetic tests for the determination of the best initial pH fermentation for hydrogen production did not present hydrogen production. It is believed that the types of inoculation used did not allow the establishment of a hydrogen producing microbiological community.

Key Words: Vinasse. Biohydrogen. Acidogenesis. pH. Hiperthermophilia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema representativo da produção de etanol a partir de cana-de-açúcar.....	25
Figura 2 – Fases experimentais da avaliação da produção biológica de hidrogênio a partir da vinhaça de cana-de-açúcar em condição termofílica extrema	31
Figura 3 - Desenho esquemático do reator diferencial (a); Aparato experimental utilizado na quantificação de biomassa (b). Onde: 1. Reatores diferenciais; 2. Reservatório de vinhaça; 3. Refrigerador; 4. Bomba peristáltica; 5. Câmara termostática; 6. Descarte.....	32
Figura 4 – Polietileno de Baixa Densidade (PEBD) – material usado como meio suporte dos RAHLFD).....	33
Figura 5 – Composição dos meios reacionais utilizados na FASE 2.....	35
Figura 6 - Concentração de sólidos totais voláteis por grama de material suporte durante o período experimental - condição termofílica extrema.....	40
Figura 7 – Dados de massa específica ao longo do tempo em diferentes temperaturas operacionais.....	41
Figura 8 – Dados de massa específica ao longo do tempo em condição termofílica extrema (70°C) e termofílica (55°C).....	43
Figura 9 – Dados referentes às concentrações de lodo por tempo de experimento.....	45
Figura 10 – Perfil temporal da concentração de carboidratos em pH 6,5.....	47
Figura 11 – Perfil temporal da concentração de carboidratos em pH 4,5.....	47
Figura 12 – Concentrações de ácido acético em pH 6,5.....	48
Figura 13 – Concentrações de ácido acético por reator em pH 4,5.....	49
Figura 14 – Concentrações de ácido láctico por reator no ensaio 4.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Ensaio em batelada para determinação de melhor pH inicial de fermentação.....	35
Tabela 2 – Características da vinhaça utilizada.....	38
Tabela 3 – Resultados do Experimento 2 com operação simultânea de RAHLFD em termofilia e termofilia extrema	42

LISTA DE SIGLAS

AGV	–	Ácidos Graxos Voláteis
APBR	–	<i>Anaerobic Packed Bed Reactor</i>
DQO	–	Demanda Química de Oxigênio
IAF	–	Inóculo de Autofermentação
LTM	–	Lodo Termofílico Metanogênico
LPB	–	Laboratório de Processos Biológicos
PEBD	–	Polietileno de Baixa Densidade
RAHLFD	–	Reatores Anaeróbios Horizontais de Leito Fixo Diferenciais
ST	–	Sólidos Totais
STF	–	Sólidos Totais Fixos
STV	–	Sólidos Totais Voláteis

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
2	OBJETIVOS.....	23
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
	3.1 Vinhaça de cana-de-açúcar.....	25
	3.2 Hidrogênio.....	26
	3.3 Produção biológica de hidrogênio a partir da vinhaça	28
	3.4 Influência do pH	29
4	MATERIAIS E MÉTODOS	31
	4.1 Vinhaça	31
	4.2 Análise de aderência de biomassa ao meio suporte (FASE 1).....	31
	4.2.1 RAHLFD	32
	4.2.2 Inóculo	34
	4.2.3 Quantificação de biomassa	34
	4.3 Influência do pH de fermentação em termofilia extrema (FASE 2).....	34
	4.3.1 Reatores em batelada	34
	4.3.2 Inóculo	36
	4.3.3 Análise dos gases.....	36
	4.3.4 Análises físico-químicas	36
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
	5.1 Caracterização da vinhaça.....	37
	5.2 Análise de aderência de lodo ao meio suporte (FASE 1).....	38
	5.2.1 Experimento 1	39
	5.2.2 Experimento 2	42
	5.3 Determinação do melhor pH de fermentação em termofilia extrema (FASE 2).....	46
6	CONCLUSÕES.....	51
7	REFERÊNCIAS.....	52

1 INTRODUÇÃO

A constante instabilidade dos preços, a diminuição da oferta do petróleo e os problemas associados ao uso de combustíveis fósseis levaram vários países a redirecionarem suas políticas energéticas ao uso de biocombustíveis (SOCCOL et al., 2010). Desde a década de 1970, o governo brasileiro incentiva a produção e o consumo de etanol por meio do Programa Nacional do Álcool (Pró-Álcool), visando desenvolver técnicas e aperfeiçoar os insumos para a produção de etanol (ANDRADE; CARVALHO; SOUZA, 2009). O Pró-Álcool determinou que 20 a 25% da composição da gasolina fosse substituída por etanol (NITSCH, 1991), além de incentivar a compra de veículos movidos a álcool, cedendo maiores prazos de financiamento e reduzindo as taxas, estimulando assim a substituição completa dos combustíveis automotores a base de petróleo por etanol (ANDRADE; CARVALHO; SOUZA, 2009).

O aumento da produção de etanol levou a um subsequente aumento da geração de vinhaça, principal resíduo líquido do processo produtivo de etanol. A vinhaça possui alto potencial poluidor (ELIA NETO, 2016), com teor de matéria orgânica, em termos de Demanda Química de Oxigênio (DQO), até 100 vezes superior ao do esgoto doméstico, característica corrosiva e ácida, além de elevadas concentrações de macro e micronutrientes (FUESS; GARCIA, 2014). Outro agravante é o elevado volume de vinhaça produzido, pois para cada litro de etanol produzido, 10 a 15 litros de vinhaça são gerados (ELIA NETO, 2016). Devido à essas características, a vinhaça pode causar grande impacto ambiental se disposta em locais inapropriados e sem tratamento adequado (CHRISTOFOLETTI et al., 2013; FUESS; GARCIA, 2014).

O principal destino dado à vinhaça é a fertirrigação de canaviais, importante técnica que reduz o consumo de água e de fertilizantes minerais e previne o lançamento da vinhaça em corpos hídricos. Contudo, devido ao grande volume gerado e às características físico-químicas da vinhaça, a fertirrigação pode acarretar uma série de problemas, como: formação de zonas anaeróbias, acidificação do solo, contaminação do lençol freático e de corpos d'água vizinhos (FERRAZ JÚNIOR et al., 2016), além da proliferação de insetos vetores de doenças como a mosca de estábulo (CANÇADO et al., 2013).

Evidencia-se, assim, a necessidade de uma alternativa à fertirrigação, que possibilite a correta destinação e disposição desse resíduo. Nesse contexto, a digestão anaeróbia da vinhaça, se mostra como uma promissora alternativa de tratamento (BUITRÓN et al., 2014; INTANOO et al., 2014; ZHU et al., 2011). No processo de digestão anaeróbia, após hidrólise

da matéria orgânica complexa, ocorre a etapa acidogênica, na qual há fermentação da matéria orgânica hidrolisada, com formação de ácidos orgânicos e hidrogênio, o qual pode ser utilizado para recuperação energética.

A produção de hidrogênio se faz importante, pois este gás é considerado um combustível de queima limpa, gerando apenas vapor da água (D'AGOSTO; OLIVEIRA, 2018) e por apresentar elevado poder calorífico (FERRAZ JÚNIOR et al., 2014), sendo por isso uma alternativa interessante aos combustíveis fósseis.

Segundo Hallenbeck (2009), elevadas temperaturas beneficiam tanto a velocidade de produção quanto o rendimento de hidrogênio em processos fermentativos. Em concordância com isso, estudos realizados sobre a produção de hidrogênio a partir da vinhaça têm mostrado melhores resultados em estabilidade, rendimento e produção em condição termofílica em comparação à condição mesofílica (FERRAZ JÚNIOR, 2013).

Esses fatores motivam a verificação dos possíveis efeitos positivos de temperaturas ainda maiores, a condição termofílica extrema ($>55^{\circ}\text{C}$), sobre a produção biológica de hidrogênio a partir da vinhaça, principalmente se considerada a alta temperatura em que a vinhaça é gerada (85°C a 90°C), o que viabiliza a implantação e operação desse tipo de sistema com baixo investimento energético.

Este estudo objetivou avaliar, na primeira fase, o processo de crescimento e aderência de biomassa acidogênica em meio suporte inerte (aparas de polietileno de baixa densidade - PEBD) sob condição termofílica extrema (70°C), na produção biológica de hidrogênio em reatores anaeróbios horizontais de leito fixo diferenciais (RAHLFD). Com o mesmo tipo de meio suporte e reator, estudo prévio fez averiguação da interferência da temperatura (55°C vs 25°C) no crescimento da biomassa acidogênica com vinhaça (KOYAMA, 2013), desta forma, a influência da temperatura extrema no crescimento dos microrganismos pôde ser avaliada de forma comparativa.

Na segunda fase deste estudo, objetivou-se avaliar, por meio de estudos cinéticos, a influência do pH inicial de fermentação na produção biológica de hidrogênio em termofilia extrema a partir da vinhaça.

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo avaliar a influência da termofilia extrema (70°C) na produção de hidrogênio a partir de vinhaça de cana-de-açúcar.

Especificamente, buscou-se:

- Avaliar o processo de adesão de biomassa acidogênica em meio suporte de polietileno de baixa densidade em termofilia extrema (70°C);
- Avaliar o efeito do pH inicial de fermentação para a produção de H₂ a partir da vinhaça de cana-de-açúcar em termofilia extrema (70°C), e;
- Determinar as melhores condições de temperatura e pH para a produção de H₂.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

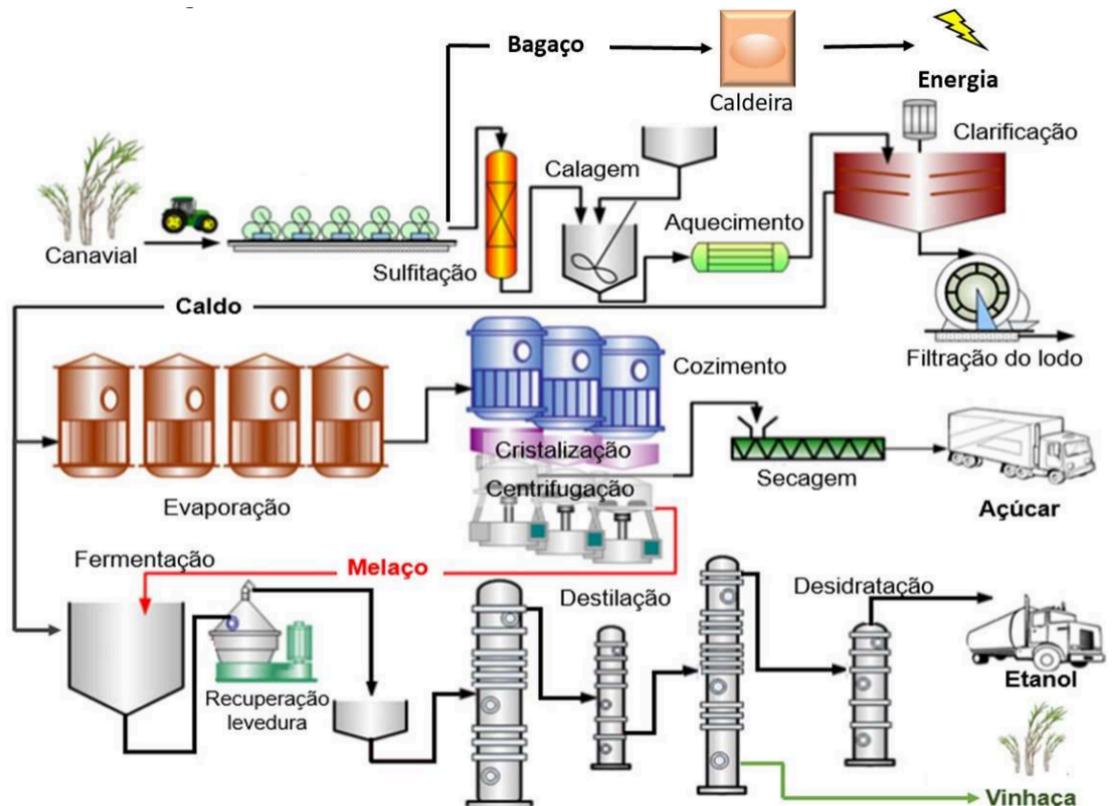
Nesse capítulo aborda-se a relevância da vinhaça de cana-de-açúcar como alternativa energética, a digestão anaeróbia como forma de gerar subprodutos carreadores energéticos, a influencia da temperatura na produção biológica de hidrogênio a partir da fermentação da vinhaça e como o pH influencia na conversão de matéria orgânica em hidrogênio.

3.1 Vinhaça de cana-de-açúcar

A necessidade de substituição dos combustíveis fósseis, incentiva o aumento da produção de etanol, um biocombustível alternativo aos combustíveis de origem não renovável. Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2018), o Brasil é o maior produtor de etanol de cana-de-açúcar do mundo e sua produção deve chegar a 28,2 bilhões na safra de 2018/2019, o que representaria um aumento de 1,4% em comparação a safra anterior. O aumento da produção de etanol resulta no aumento da geração de resíduos do processo produtivo, como o principal resíduo líquido desse processo, a vinhaça.

A vinhaça é gerada nas colunas de destilação do etanol à proporção de 10 a 15 litros de vinhaça por litro de etanol produzido (ELIA NETO, 2016). Esse efluente possui elevado teor de matéria orgânica, característica ácida e corrosiva, além de elevadas concentrações de macro e micronutrientes (FUSS; GARCIA, 2014). Motivo pelo qual atualmente, o principal destino dado à vinhaça no Brasil é a fertirrigação, processo baseado no uso racional dos recursos naturais, que impede o lançamento da vinhaça nos corpos d'água (CHRISTOFOLETTI et al., 2013). A figura abaixo esquematiza a produção de etanol a partir da cana-de-açúcar. A cana é processada e então alimenta as torres de destilação das quais é produzido o etanol e a vinhaça.

Figura 1 – Fluxograma da produção de etanol a partir de cana-de-açúcar.



Fonte: Niz (2019).

Essa técnica, no entanto, pode resultar em danos ambientais como a contaminação e mudança nutricional do solo (SILVA; GRIEBELER; BORGES, 2007), contaminação de corpos d'água superficiais e subterrâneos (FUESS; GARCIA, 2014; LYRA; ROLIM; SILVA, 2003) e proliferação de insetos vetores de doenças, como a mosca do estábulo (CANÇADO et al., 2013). Além disso, devido à possibilidade de produção de carreadores energéticos de elevado potencial calorífico, como hidrogênio e o metano, a partir da digestão anaeróbia da vinhaça, a fertirrigação também é vista como perda de potencial energético (FERRAZ JÚNIOR et al., 2014).

3.2 Digestão anaeróbia

A digestão anaeróbia é o processo em que matéria orgânica é convertida à outros subprodutos sob ausência de oxigênio, ocorrendo em duas etapas: conversão de compostos orgânicos complexos em produtos voláteis, como os ácidos graxos e H_2 , e posteriormente a conversão desses ácidos orgânicos, CO_2 e H_2 em produtos gasosos finais, como CO_2 e CH_4 (CHERNICHARO, 1997).

Fuentes et al. (2008), relata que na primeira etapa compostos orgânicos complexos, como carboidratos, são convertidos durante a digestão anaeróbia, a partir da atuação de bactérias anaeróbias e facultativas. Já, no segundo estágio, bactérias estritamente anaeróbias convertem os ácidos voláteis, CO_2 e H_2 em gases como o metano.

Esse processo já é utilizado para tratamento de resíduos orgânicos, pois como relata Cuetos et al. (2008), a digestão anaeróbia tem se mostrado eficiente no tratamento desses resíduos e tem sua aplicação favorecida por resultar na produção de biogás que pode ser energeticamente reaproveitado.

Desde modo, por a vinhaça ser um resíduo orgânico cujo destino final atualmente pode trazer impactos negativos, como acidificação do solo, e possuir elevada carga orgânica, podendo ser submetido à tratamento com geração de subprodutos de alto potencial energético, é interessante submeter a vinhaça a digestão anaeróbia e verificar os possíveis benefícios do tratamento da vinhaça.

3.3 Hidrogênio

O hidrogênio, carreador energético de alto potencial calorífico (122 kJ/g) (LUO et al., 2011), se mostra como uma alternativa promissora para complementação de uma matriz energética renovável, possuindo diversos benefícios técnicos, socioeconômicos e ambientais sobre os combustíveis fósseis (DAS; VEZIROGLU, 2008), tais como: elevado rendimento energético em massa, cerca de 2,75 vezes maior do que os combustíveis hidrocarbonetos (LUO et al., 2010); liberação centralizada de carbono (CO_2) durante sua geração, e não durante sua utilização (HALLENBECK, 2009); e combustão limpa, que tem como único produto final das células de combustível a água, não havendo, portanto, liberação de poluentes (CHEN; LIN; CHANG, 2001; LUO et al., 2011).

A produção de hidrogênio pode ocorrer através da 1) reforma de gás natural, 2) gaseificação de carvão, 3) eletrólise da água e 4) por métodos biológicos, sendo que as três primeiras incluem elevados gastos energéticos (LUO et al., 2010). A produção biológica de hidrogênio pode ocorrer por meio da fotossíntese e/ou fermentação. No processo de fotossíntese encontram-se dificuldades devido à baixa eficiência e dependência da utilização de luz, enquanto que, na fermentação, o hidrogênio pode ser produzido independente da luz, de maneira mais simples e a partir de vários substratos encontrados, por exemplo, em águas residuárias (WANG; WAN, 2009), sendo assim uma técnica mais atrativa, principalmente

caso a matéria prima para produção do gás seja constituída de resíduos orgânicos (LEITE et al., 2008; WANG; WAN, 2009).

Segundo Hawkes et al. (2002) para uma produção sustentável de hidrogênio a partir da fermentação, o substrato utilizado deve respeitar alguns critérios, como: ser composto majoritariamente por carboidratos, ser proveniente de fontes sustentáveis, apresentar concentração suficiente para que a fermentação seja energeticamente favorável e ter baixo custo de obtenção. A vinhaça de cana-de-açúcar atende a quase todos esses critérios (exceto à ser composta majoritariamente por carboidratos), e assim representa uma ótima alternativa para a produção biológica de hidrogênio por meio do processo fermentativo.

3.4 A produção biológica de hidrogênio a partir da vinhaça

Em estudo comparativo entre materiais suporte para o uso em reatores acidogênicos alimentos com vinhaça, Ferraz Júnior (2013) analisou reatores de leito fixo preenchidos com polietileno de baixa densidade (PEBD), carvão vegetal, argila expandida e cerâmica porosa. Foi observado produção de hidrogênio apenas em PEBD e argila expandida. Após analisar a comunidade microbológica, a conversão de matéria orgânica e os produtos intermediários, constatou-se que o PEBD é o meio suporte mais indicado para produção de hidrogênio a partir de vinhaça em reatores de leito fixo.

Reatores de leito fixo empacotado (*Anaerobic Packed Bed Reactor* – APBR) tem se mostrado uma boa alternativa para a produção de hidrogênio por processo fermentativo, pois apresentam configuração simples e capacidade de aumentar o tempo de retenção celular, resultando em uma maior concentração de lodo no reator (FERRAZ JÚNIOR; ETCHEBEHERE; ZAIAT, 2015a, 2015b; FUESS et al., 2016a). Além disso, os APBR não necessitam de agitação ou recirculação, acarretando em menores custos iniciais (de construção) e operacionais (LEITE et al., 2008; PERNA et al., 2013).

Em reatores APBR, Ferraz Júnior, Etchebehere e Zaiat (2015a) estudaram a produção de hidrogênio a partir da fermentação da vinhaça de cana-de-açúcar em condição mesofílica (25°C). Os autores destacaram que a produção de hidrogênio a partir de vinhaça de cana-de-açúcar em condição mesofílica foi muito instável, com somente 15 dias de produção contínua. Segundo os autores, a instabilidade observada foi causada pelo crescimento excessivo de biomassa acidogênica resultante do desvio da rota metabólica do hidrogênio para assimilação e crescimento celular.

Em condição termofílica (55°C), Ferraz Júnior et al. (2014) observaram produção

contínua de hidrogênio por 30 dias operando reatores APBR e utilizando PEBD como meio suporte. Os melhores resultados obtidos nessa condição, comparativamente ao estudo em mesofilia, foram associados ao menor rendimento de biomassa sob condição termofílica. Contudo, os autores destacaram que, mesmo em termofilia, em uma operação a longo prazo, o crescimento natural da biomassa poderia levar a diminuição da carga orgânica específica, afetando de forma negativa a produção de hidrogênio. Essa hipótese foi confirmada por estudo realizado por Ferraz Júnior, Etchebere e Zaiat (2015b) que na operação de reator APBR preenchido com PEBD como meio suporte e alimentado com vinhaça de cana-de-açúcar em termofilia (55°C) obtiveram produção contínua de hidrogênio por período máximo de 60 dias.

Fuess et al. (2016a) destacaram a dificuldade em manter a produção contínua de hidrogênio em estudo com reator APBR sob condição termofílica (55°C), preenchido com PEBD, alimentado com vinhaça. A produção contínua de hidrogênio por período de 240 dias só foi possível a partir da aplicação de estratégias operacionais, entre elas o descarte periódico de lodo, para evitar colmatção do leito e garantir a manutenção da carga orgânica específica.

Koyama (2013) realizou estudos para avaliar o crescimento e aderência de biomassa acidogênica em reatores RAHLFD, utilizando PEBD como meio suporte e alimentados com vinhaça de cana-de-açúcar em condições mesofílica (25°C) e termofílica (55°C). A autora observou menor crescimento de lodo em condição termofílica, o que implicaria um maior tempo de operação sem a necessidade de descarte de biomassa.

Como pode ser observado dos estudos mencionados acima, maiores temperaturas levam a maior estabilidade na produção de hidrogênio, aparentemente devido ao menor crescimento microbiano sob essas condições. Desta forma a operação de reatores em condição termofílica extrema poderia resultar em taxas de crescimento microbiano ainda menores, e logo à produção mais estável de hidrogênio sem necessidade de descartes de lodo.

Estudos com aplicação de condição extrema de temperatura não são muitos, principalmente devido à demanda energética que seria requerida para operar reatores em tais condições. No entanto, a utilização de vinhaça como substrato possibilitaria o uso de condição termofílica extrema sem grandes demandas energéticas devido à alta temperatura em que esse resíduo é gerado.

3.5 Influência do pH

O sucesso do processo fermentativo para produção biológica de hidrogênio depende de um maior entendimento e controle do processo e suas variáveis, como por exemplo o pH de fermentação, o qual afeta diretamente a rota de formação de hidrogênio e o padrão de produtos solúveis formados (TEMUDO; KLEEREBEZEM; VAN LOOSDRECHT, 2007).

Investigando os produtos gerados a partir da fermentação com cultura mista usando glicose como substrato em diferentes pHs, Temudo, Kleerebezem e Van Loosdrecht (2007) relataram que ocorria uma transição da produção de CO_2/H_2 , em valores baixos de pH (4 a 5,5), para produção de formiato, em valores elevados de pH (10 a 12). Esta mudança foi associada a uma mudança dos produtos catabólicos de butirato e acetato para etanol e acetato.

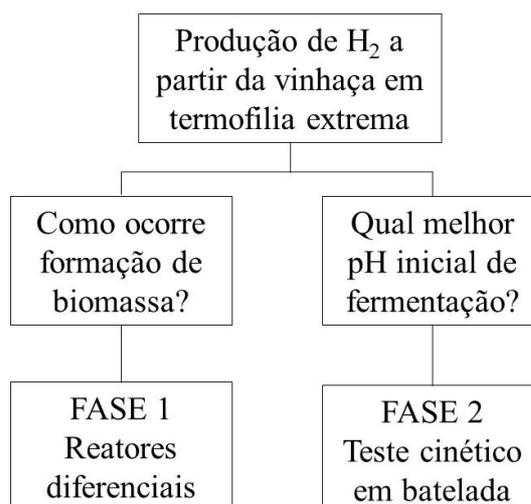
Em estudo com reatores APBR utilizando vinhaça como substrato e operação à 55°C, Fuess et al. (2016a) demonstraram que o pH é um fator chave para a produção contínua de hidrogênio, sendo que os melhores resultados foram observados na faixa de pH entre 5,1 e 5,2. Resultado semelhante ao descrito por Niz et al. (2019) que, com o mesmo substrato e em condição termofílica extrema observaram maior produção de hidrogênio em pH entre 5,2 e 5,1. Nesse estudo, a diminuição do pH de fermentação para 4,9 promoveu diminuição da produção de H_2 que foi relacionada à mudança de rota metabólica que ocasionou menor consumo de ácido láctico. De acordo com Kim et al. (2011), o aumento da produção de ácido láctico em sistemas fermentativos para produção biológica de hidrogênio (favorecido pela operação em pH ácido) pode ocorrer em detrimento da produção de hidrogênio devido ao desvio de rotas metabólicas. Os autores relataram a importância do pH do meio de fermentação nas rotas de produção, nos produtos solúveis formados e no rendimento de hidrogênio em sistemas fermentativos.

Sistemas acidogênicos sujeitos a variações de pH são vulneráveis a perdas de desempenho ligadas estritamente às condições de pH ofertadas aos microorganismos, como a atividade da enzima hidrogenase, caminhos metabólicos a aderência e flocculação celular (ANTONOPOULOU et al., 2010; DAREIOTI; VAVOURAKI; KORNAROS, 2014). Um estudo realizado por Cai et al. (2010) acerca das rotas metabólicas de produção de hidrogênio a partir da fermentação concluiu que o pH possui uma maior influência na produção de hidrogênio do que a concentração inicial de glicose utilizada. Assim, a determinação de um pH ótimo de fermentação é de extrema importância para garantir maior rendimento e produção de hidrogênio.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A avaliação da produção biológica de hidrogênio a partir da vinhaça de cana-de-açúcar em termofilia extrema (70°C) foi realizada em duas fases experimentais de acordo com o fluxograma apresentado na Figura 2.

Figura 2 - Fases experimentais da avaliação da produção biológica de hidrogênio a partir da vinhaça de cana-de-açúcar em condição termofílica extrema



Fonte: Autor (2017).

4.1 Vinhaça

A vinhaça utilizada nos experimentos foi coletada no tanque de equalização da Usina São Martinho, localizada na cidade de Pradópolis (SP) a 90 km da cidade de São Carlos e 285 km da capital. Logo após a coleta, a vinhaça foi armazenada em reservatórios plásticos de polipropileno (10 L), mantida em freezer (-20°C) antes do uso, a fim de preservar as características físico-químicas da mesma.

Para fins de alimentação dos reatores da FASE 1, a vinhaça foi filtrada em papel qualitativo (Nalgon, 80 g.m², porosidade 3 µm) como forma de diminuir a quantidade de sólidos em suspensão do afluente.

4.2 Análise de aderência de biomassa ao meio suporte (FASE 1)

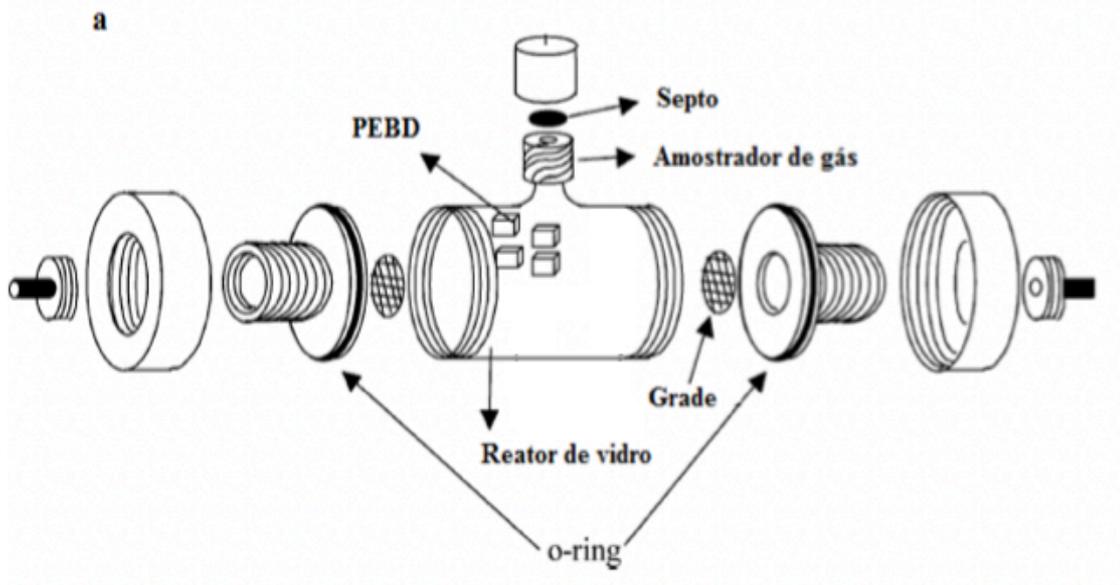
Na FASE 1, para avaliação do crescimento e aderência da biomassa acidogênica ao meio suporte de PEBD sob termofilia extrema dois experimentos foram realizados com os reatores diferenciais RAHLFD. No primeiro (Experimento 1), 5 reatores foram operados a 70°C por 50 dias para averiguação da viabilidade da operação dos reatores em condição

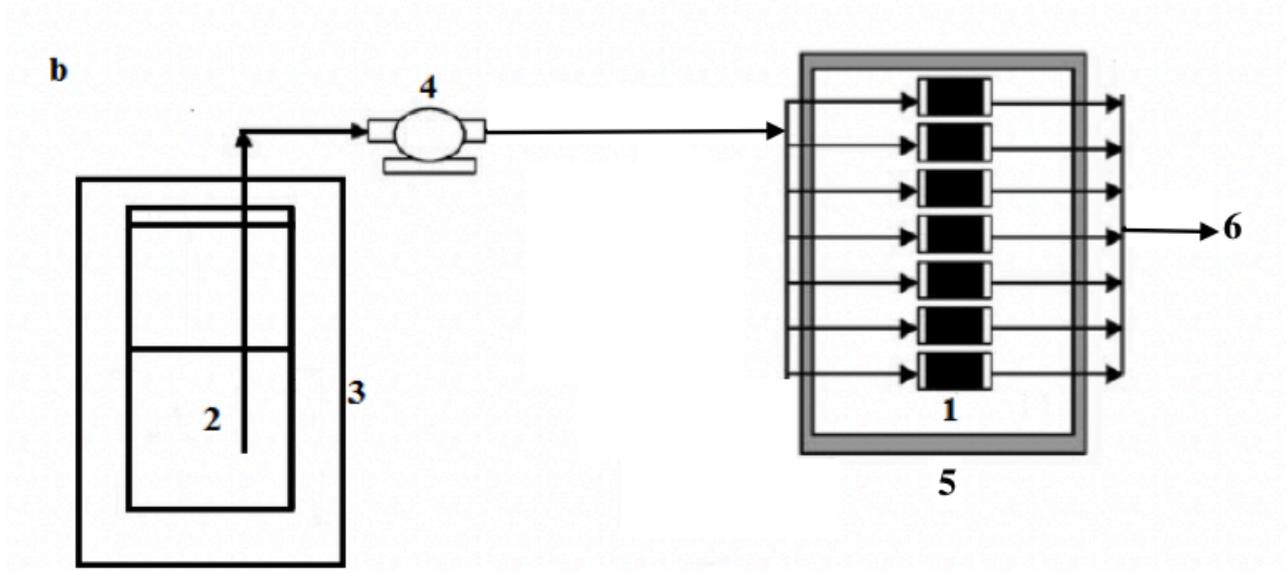
termofílica extrema, acompanhamento do crescimento de biomassa e comparação com dados de estudos prévios (KOYAMA, 2013). Devido à uma incerteza proveniente da comparação dos resultados do Experimento 1, realizou-se um segundo experimento. Esse Experimento 2 teve a finalidade de comparar o crescimento e aderência da biomassa ao meio suporte sob condições termofílica e termofílica extrema, no qual em um único experimento foram utilizados 10 reatores, operados por 25 dias, sendo 5 mantidos à temperaturas de 55°C e os outros 5 à temperatura de 70°C.

4.2.1 RAHLFD

Os reatores diferenciais foram construídos em vidro com volume total de 30 mL, possuindo 3,4 cm de diâmetro e 7,3 cm de comprimento (Figura 3a). A operação dos reatores foi feita em câmara termostática, sob condições termofílica (55°C) e termofílica extrema (70°C), alimentados por meio de bomba peristálticas Gilson modelo Minipuls de 8 canais com vinhaça de cana-de-açúcar filtrada (Figura 3b).

Figura 3 - Desenho esquemático do reator diferencial (a); Aparato experimental utilizado na quantificação de biomassa (b). Onde: 1. Reatores diferenciais; 2. Reservatório de vinhaça; 3. Refrigerador; 4. Bomba peristáltica; 5. Câmara termostática; 6. Descarte





Fonte: Adaptado de Ribeiro et al. (2005).

O material suporte utilizado foi o polietileno de baixa densidade (PEBD) (Figura 4) utilizado anteriormente em estudos sobre a produção de hidrogênio a partir da vinhaça de cana-de-açúcar em condição mesofílica e termofílica (FERRAZ JÚNIOR et al., 2014; FERRAZ JÚNIOR; ETCHEBEHERE; ZAIAT, 2015a, 2015b; FUESS et al., 2016b).

Figura 4 – Polietileno de Baixa Densidade (PEBD) –meio suporte dos RAHLFD



Fonte: Autor (2018).

Nos experimentos 1 e 2 o crescimento e a aderência da biomassa foram monitorados pelo acompanhamento da série de sólidos. Os reatores eram retirados individualmente do sistema com diferentes ciclos de operação, iniciados após o período de inoculação - 14 dias - (Experimento 1: 10°, 20°, 30°, 40° e 50° dia após início da operação e Experimento 2: 5°,

10°, 15°, 20° e 25° dia após o início da operação). Ao fim de cada ciclo, um reator era desmontado e análises referentes a concentração de sólidos aderidos e retidos nos interstícios das partículas de PEDB eram realizadas.

4.2.2 Inóculo e alimentação

A inoculação dos RAHLFD foi feita pelo processo de auto fermentação da vinhaça (LEITE et al., 2008). Dessa maneira, ao longo dos 7 primeiros dias de operação a vinhaça filtrada e fermentada (vinhaça com pH corrigido para 6,5 e mantida em repouso por 7 dias em recipiente aberto câmara a 70°C) foi continuamente recirculada nos reatores (LEITE et al., 2008), visando estabelecer uma comunidade microbiológica fermentativa. Após o período de inoculação os reatores passaram a ser alimentados com vinhaça bruta (não fermentada) de pH 6,5 corrigido com hidróxido de sódio (NaOH 50%, m/v) e iniciou-se a contabilização dos ciclos de operação.

4.2.3 Quantificação de biomassa

A quantificação de biomassa acidogênica foi realizada de acordo com Ribeiro et al. (2005) e *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2012). A série de sólidos analisada contemplava sólidos totais (ST), sólidos totais voláteis (STV) e sólidos totais fixos (STF).

4.3 Influência do pH de fermentação em termofilia extrema (FASE 2)

A avaliação da influência do pH inicial de fermentação na produção biológica de hidrogênio a partir da vinhaça de cana-de-açúcar em termofilia extrema (70°C) foi realizada por meio de ensaios em batelada com monitoramento dos gases produzidos e dos produtos intermediários na fase líquida.

4.3.1 Reatores em batelada

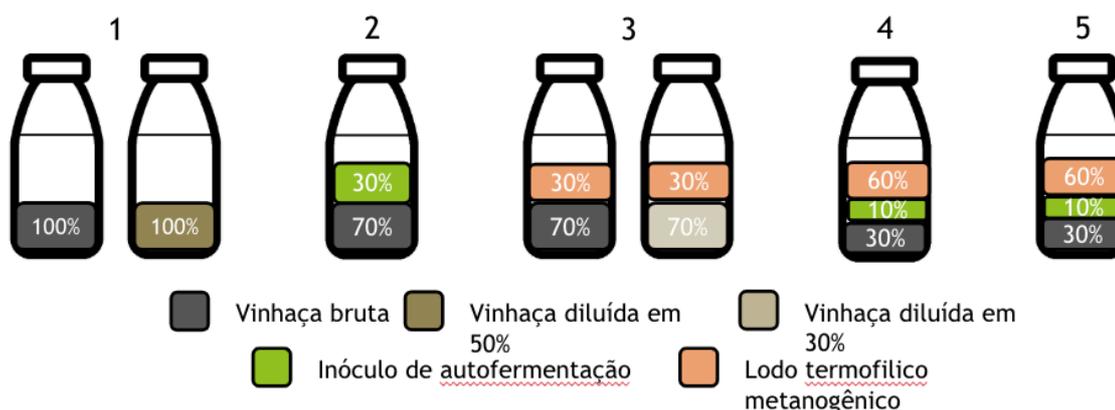
Foram utilizados frascos Duran de 500 mL, com tampa de butila para amostragem de biogás e da fase líquida. Os ensaios foram feitos em duplicata sob diferentes condições de pH inicial. Para obtenção da condição anaeróbia, N₂ foi insuflado por 5 minutos ao meio líquido antes do início de cada ensaio. Ao todo, foram realizados 5 ensaios, com diferentes características de inóculo e diferentes diluições de vinhaça. A Tabela 1 mostra os diferentes ensaios realizados. Os ajustes de pH foram realizados com hidróxido de sódio (NaOH 50%, m/v). Nessa fase a vinhaça não foi filtrada.

Tabela 1 - Ensaios em batelada para determinação de melhor pH inicial de fermentação

Ensaio	pH
1	4,5; 5,5;6,5
2	4,5; 5,5;6,5
3	6,5
4	6,5
5	4,5; 6,5

Fonte: Autor.

Figura 5 – Composição dos meios reacionais utilizados na FASE 2



Fonte: Autor.

Diferentes estratégias de preparo de meio de fermentação (vinhaça + inóculo) foram realizadas a partir do uso de vinhaça bruta e diluída, com e sem adição de inóculos, como descrito a seguir: vinhaça bruta e diluída sem adição de inóculo (ensaio 1), vinhaça bruta com adição de 30% de inóculo de auto fermentação (IAF) (ensaio 2), vinhaça bruta e diluída com adição de 30% de lodo termofílico de reator metanogênico (LTM) (ensaio 3) e vinhaça bruta com mistura inóculos (60% de LTM e 10% de IAF) (ensaios 4 e 5). As porcentagens relacionadas acima são baseadas no volume total de fermentação (vinhaça + inóculo), que foi fixado em 50% do volume total das garrafas utilizadas como reator. Nos ensaios 4 e 5 a proporção de inóculo utilizada (70%) foi superior à de vinhaça (30%) como tentativa de viabilizar o processo fermentativo.

4.3.2 Inóculo

O inóculo utilizado nos experimentos foi obtido pelo processo de auto fermentação, seguindo mesma metodologia destacada na subseção 4.2.2. O lodo metanogênico (STV = 12,04 g.L⁻¹) foi coletado em um reator termofílico tratando vinhaça na Usina São Martinho, também foi utilizado como inóculo. Não foi realizado pré-tratamento nos inóculos.

4.3.3 Análise dos gases

A pressão parcial dos experimentos foi acompanhada periodicamente por meio de um medidor de pressão assim como a composição dos gases que foi avaliada por meio de análises cromatográficas em cromatógrafo gasoso Shimadzu GC-2010, equipado com uma coluna capilar Carboxen 1010 PLOT (30 m x 0,32 mm) e detector de condutividade térmica. A temperatura do injetor, do detector era mantida em 220°C e 230°C, respectivamente, e a rampa de aquecimento da coluna de 130°C a 135°C, a 46°C.min⁻¹. A vazão do gás de arraste (Argônio) utilizado foi de 5,66 mL.min⁻¹ (PERNA et al., 2013).

4.3.4 Análises físico-químicas

A caracterização da vinhaça utilizada nos experimentos foi realizada de acordo com a metodologia descrita a seguir:

A concentração de carboidratos totais foi determinada usando o método fenol-sulfúrico proposto por Dubois et al. (1956). Após desidratação do açúcar pelo ácido sulfúrico e complexação dos produtos formados com o fenol, foi medida a absorvância da solução na região visível (490 nm) e substituída na equação gerada a partir da curva padrão de sacarose (1% m/v) de intervalo de 20 a 120 mg C₁₂H₂₂O₁₁.L⁻¹.

As análises da demanda química do oxigênio - DQO, pH e a série de sólidos foram baseadas no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2012).

A concentração de ácido lático foi determinada segundo a metodologia proposta por Baker e Sumerson (1941) e adaptada por Taylor (1996) para facilitar a adição de p-phenylphenol. A concentração de glicerol foi medida a partir de metodologia proposta por Valdez et al. (2012).

As análises físico-químicas referentes ao acompanhamento da operação dos reatores em batelada foram realizadas segundo a metodologia utilizada na caracterização da vinhaça.

Nesta fase também foi avaliada a concentração de ácidos graxos voláteis (AGV) nos reatores dos ensaios em batelada. Os AGV como acético, propiônico, isobutírico, butírico,

isovalérico, valérico e capróico, e solventes (metanol, etanol e n-butanol) foram analisados em cromatógrafo Shimadzu GC 2010, equipado com detector de ionização de chama (DIC) e coluna HP- INNOWAX, de 30 m x 0,25 mm (diâmetro interno) x 0,25 µm (espessura de filme).

As amostras foram preparadas em frasco-padrão (amostrador COMBI-PAL) de vidro com capacidade de 10 mL com fita veda-rosca, tampa rosqueável e septo de silicone com 18 mm de diâmetro, previamente seco em estufa a 100°C por aproximadamente 30 minutos para retirada de umidade. Em seguida, foi adicionado ao frasco, 1 g de cloreto de sódio (NaCl); 2 mL de amostra; 70 µL de solução de solução de isobutanol (1 g.L⁻¹ – padrão interno para acetona e alcoóis); 100 µL de solução de ácido crotônico (700 mg.L⁻¹ – padrão interno para ácidos) e 200 µL de solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2 mol.L⁻¹. A determinação dos limites de detecção foi realizada por meio de cálculos estatísticos, com os resultados das curvas de calibração.

As amostras foram inseridas no amostrador automático (COMBI-PAL) em condições de: tempo de aquecimento da amostra (13 min); temperatura do bloco de aquecimento (100°C); volume de amostra injetada (400 µL); temperatura da seringa (100°C), e; tempo de lavagem da seringa com N₂ (3 min). Condições cromatográficas utilizadas: rampa de temperatura do forno 35°C (0 min) 2°C.min⁻¹ 38°C (0 min) 10°C.min⁻¹ 75°C (0 min) 35°C.min⁻¹ 120°C (1 min) 10°C.min⁻¹ 170°C (2 min); temperatura do injetor (250°C); temperatura do detector (280°C); razão de split: 1,0; fluxo do gás de arraste (H₂) - 1,6 mL.min⁻¹; fluxo do make-up ou gás auxiliar (N₂) - 30 mL.min⁻¹; fluxos dos gases da chama - ar sintético (300 mL.min⁻¹) e H₂ (30 mL.min⁻¹) (ADORNO; HIRASAWA; VARESCHE, 2014).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização da vinhaça

A vinhaça utilizada nos experimentos apresentou as características mostradas na Tabela 2, após ter sido filtrada para as análises. Foram realizadas 3 coletas de vinhaça para os experimentos. Observa-se que os valores de DQO observados na presente pesquisa são semelhantes aos valores observados por Elia Neto (2016) em estudo realizado com vinhaça de cana-de-açúcar (23.801 mg.L⁻¹).

Tabela 2 – Características da vinhaça utilizada

Parâmetro	Unidade	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3
Ácido láctico	mg.L ⁻¹	1100	1200	1500
DQO _{bruta}	mg.L ⁻¹	16.200	18.800	24.700
Glicerol	mg.L ⁻¹	2025	1700	2500
pH		4,43	4,53	4,58
Carboidratos	mg.L ⁻¹	4000	3700	4600
Sólidos totais	mg.L ⁻¹	37.527	38.557	41.007

Legenda: DQO – Demanda Química de Oxigênio.

Fonte: Autor.

Os valores de DQO de vinhaça de cana-de-açúcar podem apresentar grande variabilidade entre diferentes usinas e até mesmo em uma mesma usina em diferentes períodos da safra. Christofolletti et al. (2013) relataram valores de DQO de vinhaça variando entre 50.000 e 150.000 mg.L⁻¹ e em estudo realizado por Niz et al. (2019) a coleta de vinhaça no início e no final da safra de cana-de-açúcar em uma mesma usina resultou em vinhaças com DQO entre 44.000 mg.L⁻¹ (início da safra) e 19.000 mg.L⁻¹ (final da safra). A variabilidade da DQO da vinhaça ao longo da safra está relacionada ao padrão de produção de usinas sucroalcooleiras, que quando produzem etanol e açúcar simultaneamente direcionam parte do melaço proveniente da produção de açúcar para as dornas de fermentação para produção de etanol, dando origem assim a uma vinhaça com maior DQO.

A importância da determinação da DQO nos estudos de reatores anaeróbios está na determinação das cargas orgânicas volumétricas (COV) aplicadas aos mesmos. A grande variabilidade observada em uma única safra demonstra a importância de implantação de reatores robustos o suficiente para atender a essas flutuações sem perdas de desempenho significativas, por exemplo, a partir da separação de fases (acidogênica e metanogênica), estratégia que amortiza as cargas.

Elia Neto (2016) encontrou valor de sólidos totais de 32.788 mg.L⁻¹, resultado inferior aos valores obtidos no presente estudo. O monitoramento de sólidos na vinhaça é de extrema importância para operação de reatores, principalmente para reatores de leito

empacotado, já que o excesso de sólidos afluentes ao reator pode promover a colmatação do leito.

Os valores de carboidratos encontrados por Ferraz Júnior (2013) foram de $4.100 \pm 900 \text{ mg.L}^{-1}$, valor semelhante aos observados na presente pesquisa. Amstalden (1991) observou concentrações de glicerol em valor médio de 3.700 mg.L^{-1} , superior à concentração de glicerol na vinhaça utilizada no presente estudo (2.200 mg.L^{-1}). A variabilidade da concentração desses açúcares pode estar associada às características da cana utilizada, além de possíveis diferenças na eficiência do processo de fermentação do caldo de cana para produção de etanol. Em processos fermentativos, esses são importantes parâmetros de monitoramento, tendo em vista que são compostos de rápida degradação e acidificação, com grande potencial para produção de hidrogênio.

De acordo com Fuess et al. (2018) carboidratos são a principal fonte de açúcares na produção de hidrogênio a partir de vinhaça de cana-de-açúcar. No entanto, outros autores destacaram que sob condições diferentes de temperatura, outros compostos podem ser utilizados, como por exemplo, o ácido lático (NIZ et al., 2019).

A concentração de ácido lático na vinhaça utilizada na presente pesquisa apresentou valor médio de 1.250 mg.L^{-1} com valores máximo e mínimo de 1.500 e 1.100 mg.L^{-1} . Valores semelhantes aos observados por Niz et al. (2019), que destacaram a rota de produção de hidrogênio a partir de ácido lático como sendo a principal rota de produção de hidrogênio a partir da vinhaça de cana-de-açúcar sob condição termofílica extrema, independente da concentração de carboidratos presente.

A vinhaça de cana-de-açúcar pode apresentar grande variabilidade composicional durante uma única safra (FUESS; GARCIA; ZAIAT, 2018). Fatores como: eficiência da fermentação na produção de etanol, eficiência da destilação, tipo de produção (exclusiva de etanol ou etanol + açúcar) e o tipo de cana utilizada são algumas das variáveis que podem influenciar nas características físico-químicas da vinhaça. Assim, a caracterização da vinhaça é de extrema importância, seja para o uso da mesma para produção de hidrogênio ou/e metano em reatores anaeróbios, seja como parâmetro de monitoramento das etapas do processo de produção de etanol.

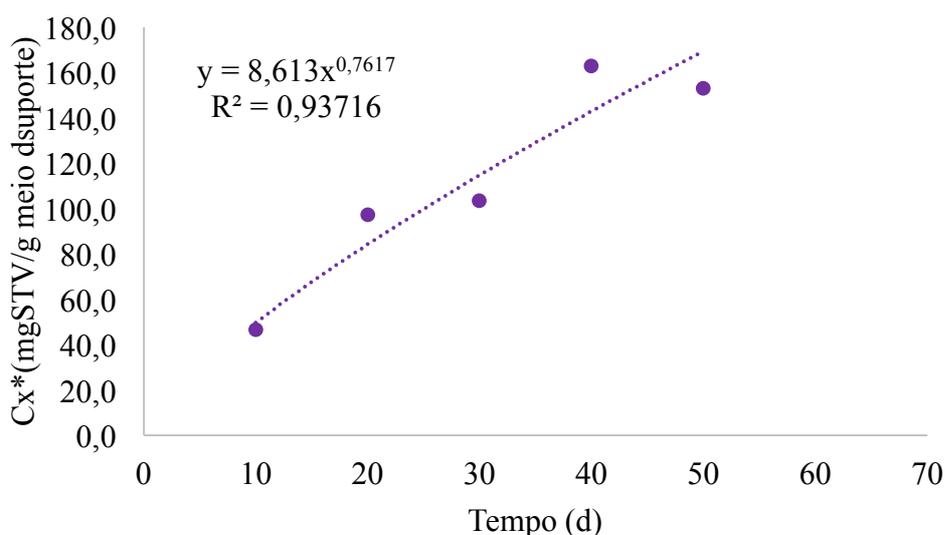
5.2 Análise de aderência de lodo ao meio suporte (FASE 1)

5.2.1 Experimento 1

O Experimento 1 consistiu na operação de 5 RAHLFD sob condição termofílica extrema, preenchidos com PEBD como meio suporte e alimentados com vinhaça, no qual

buscou-se analisar o crescimento e a aderência de biomassa no material suporte. A quantificação da biomassa acidogênica dos reatores diferenciais em condição termofílica extrema resultou em uma curva com tendência de crescimento potencial da massa específica em função do tempo (Figura 6). As vinhaças utilizadas no experimento foram de 2 coletas e apresentavam sólidos totais variando de 37.527 mg.L^{-1} até 38.557 mg.L^{-1} .

Figura 6 - Concentração de sólidos totais voláteis por grama de material suporte durante o período experimental com reta potencial de comportamento - condição termofílica extrema

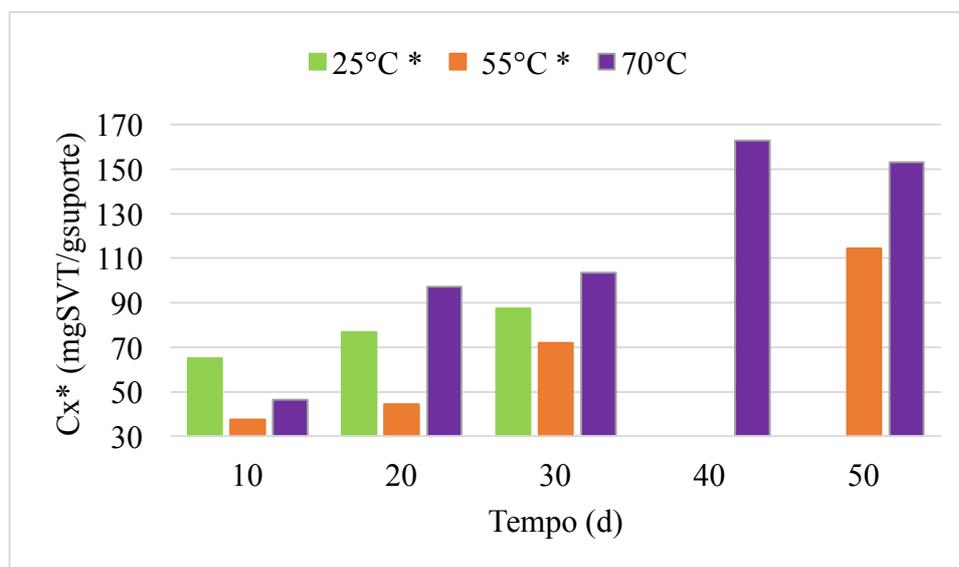


Legenda: SVT – Sólidos Totais Voláteis.

Fonte: Autor (2017).

Em estudo realizado por Koyama (2013) o acúmulo e aderência de biomassa a meio suporte PEBD em reatores RAHLFD alimentados com vinhaça foram avaliados em condições mesofílica (25°C) e termofílica (55°C). A autora observou que, sob condição mesofílica, ocorreu maior acúmulo de biomassa (Figura 5) sugerindo que maiores temperaturas promoveriam menor acúmulo de biomassa. No presente estudo, no entanto, em condição termofílica extrema (70°C), a quantidade de biomassa acumulada foi superior a aquelas observadas em temperaturas menores no estudo de Koyama (2013) em análise comparativa de 30 dias de operação, com valores de $103,9 \text{ mg de SVT.g}^{-1} \text{ meiosuporte}$ contra $72 \text{ mg de SVT.g}^{-1} \text{ meiosuporte}$ à 55°C e $87 \text{ mg de SVT.g}^{-1} \text{ meiosuporte}$ à 25°C no estudo de 2013 (Figura 7).

Figura 7 - Dados de massa específica ao longo do tempo em diferentes temperaturas operacionais.



Legenda: SVT – Sólidos Totais Voláteis.

Fonte: Autor. * Dados referentes à Koyama (2013)

A comparação dos resultados obtidos no presente estudo, em condição termofílica extrema, com estudo realizado anteriormente em temperaturas inferiores, demonstra maior acúmulo de biomassa em condição de maior temperatura. Esse resultado é contrário ao que foi anteriormente observado e constatado por Koyama (2013) que relatou menor acúmulo de biomassa em maiores temperaturas.

A vinhaça utilizada por Koyama (2013) possui DQO solúvel de $35200 \pm 2600 \text{ mg.L}^{-1}$, e concentração de carboidratos de $4100 \pm 900 \text{ mg.L}^{-1}$, enquanto a vinhaça utilizada no Experimento 1, possuía valor médio de DQO solúvel de $21025 \pm 408 \text{ mg.L}^{-1}$ e concentração de carboidratos igual a $4250 \pm 415 \text{ mg.L}^{-1}$. A diferença observada em termos de carboidratos pode estar relacionada a maior aderência de biomassa, dado que são açúcares que sofrem conversão durante a acidogênese, resultando no crescimento microbiológico.

Devemos destacar, que é possível que a comparação entre dados experimentais, obtidos no presente estudo (termofílica extrema), com dados de estudos anteriores (mesofílica e termofílica), leve a uma avaliação errônea dos dados, mesmo que as mesmas metodologias tenham sido seguidas. Diferenças na vinhaça utilizada (quantidade de sólidos voláteis totais da vinhaça, por exemplo) como inóculo e como substratos, diferenças sutis na montagem dos reatores e até mesmo diferentes operadores, podem levar a uma grande variação na quantificação dos sólidos.

Com finalidade de verificar a real relação entre crescimento e aderência da biomassa e a temperatura de operação, novo experimento foi realizado, com operação em paralelo de reatores RAHLFD sob condição termofílica e termofílica extrema (Experimento 2).

5.2.2 Experimento 2

Os resultados do Experimento 2, podem ser vistos na Tabela 3 e na Figura 6, nas quais observa-se a relação de massa de sólidos voláteis totais aderida por massa de meio suporte ao longo de 25 dias nas diferentes temperaturas de operação. Nesse experimento foi utilizada a vinhaça de uma coleta, que possuía valor médio de sólidos totais de $39.267 \pm 1740 \text{ mg.L}^{-1}$.

Tabela 3 - Resultados do Experimento 2 com operação simultânea de RAHLFD em termofilia e termofilia extrema

Tempo (d)	55°C			70°C		
	SVT (mg)	Cx* (mg _{STV} /g _{mat.lsup})	Cx (mg.mL ⁻¹)	STV (mg)	Cx* (mg _{STV} /g _{mat.lsup})	Cx (mg.mL ⁻¹)
5	213	14	14	865	74	56
10	160	13	10	623	42	40
15	980	61	63	843	64	54
20	908	71	59	895	68	58
25	1439	92	93	601	48	39

Legenda: SVT – Sólidos Totais Voláteis.

Fonte: Autor.

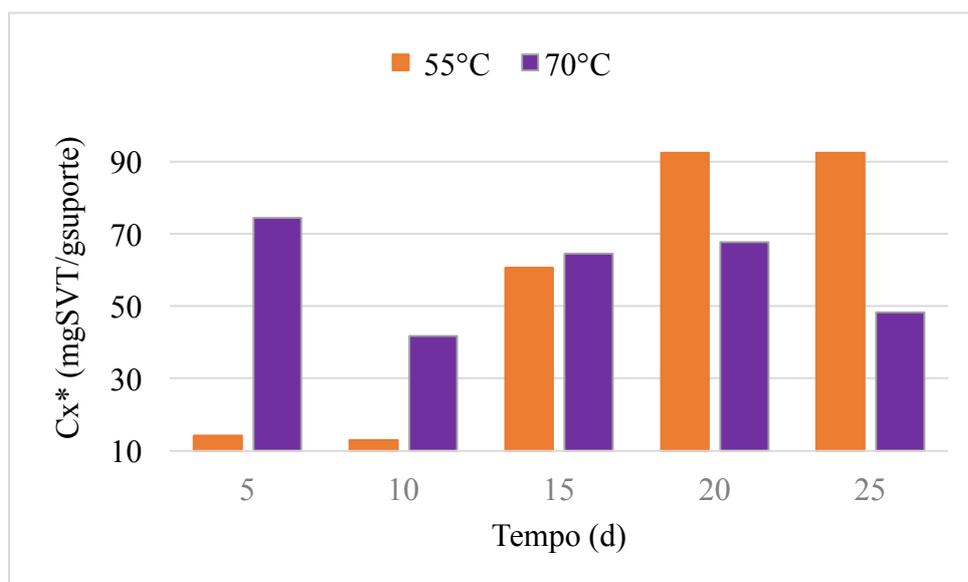
Nos primeiros reatores desmontados, após 5 dias de alimentação, foi possível verificar que em condição termofílica extrema a quantidade de biomassa acumulada e aderida ao meio suporte ($74 \text{ mgSTV.g}^{-1}_{\text{meiosuporte}}$) era significativamente superior a aquela observada em condição termofílica ($14 \text{ mgSTV.g}^{-1}_{\text{meiosuporte}}$). A diferença em termofilia extrema se comparada ao experimento anterior pode ser devido à maior presença de sólidos totais encontrada na vinhaça utilizada para o experimento 2.

No entanto, no decorrer do experimento, com a alimentação dos reatores, uma tendência interessante foi observada em ambas as condições. Em condição termofílica extrema a concentração de biomassa acumulada e aderida no meio suporte se manteve aproximadamente constante, com média de $59 \pm 13 \text{ mgSVT.g}^{-1}_{\text{meiosuporte}}$. Já em condição termofílica, o aumento na concentração de biomassa acumulada e aderida foi de 648%

(Figura 5), a diferença da quantidade de STV acumulada nos reatores do início ao final dos ciclos foi de 1.226 mgSVT (Tabela 3). Observou-se que a operação de reatores em temperatura menor, possibilitou maior crescimento e acúmulo de biomassa no interior dos reatores, comparativamente à condição termofílica extrema.

As estruturas responsáveis por promover a aderência superficial e formação de flocos e biofilme são os polímeros extracelulares (MIQUELETO et al., 2010). Em 1996, Van Lier, Sans Martin e Lettinga demonstraram que em temperaturas elevadas esses polímeros tem sua produção reduzida. Desse modo, a diferença de acúmulo de biomassa observada conforme a temperatura de operação dos reatores pode ser explicada devido à baixa produção de polímeros extracelulares por microorganismos extremófilos (VAN LIER; SANZ MARTIN; LETTINGA, 1996), resultando em um maior acúmulo de biomassa nas operações realizadas em condições menos elevadas de temperatura. A baixa produção desses polímeros também parece influenciar a eficiência de produção de H_2 . A menor produção de polímeros possibilita maior direcionamento de energia metabólica para produção de hidrogênio, como relata Niz et al. (2019) que, operando reatores em termofilia extrema, observou um rendimento de Hidrogênio cerca de 2,4 vezes maior que os observados por Ferraz Júnior et al. (2014) e Fuess et al. (2016a). Os valores encontrados foram de $1,9 \text{ molH}_2 \cdot \text{mol}_{\text{glucose}}^{-1}$ à 70°C contra $0,74 \text{ molH}_2 \cdot \text{mol}_{\text{glucose}}^{-1}$ e $0,79 \text{ molH}_2 \cdot \text{mol}_{\text{glucose}}^{-1}$, encontrados respectivamente por Ferraz Júnior et al. (2014) e Fuess et al. (2016a) em reatores operados à 55°C .

Figura 8 - Dados de massa específica ao longo do tempo em condição termofílica extrema (70°C) e termofílica (55°C)



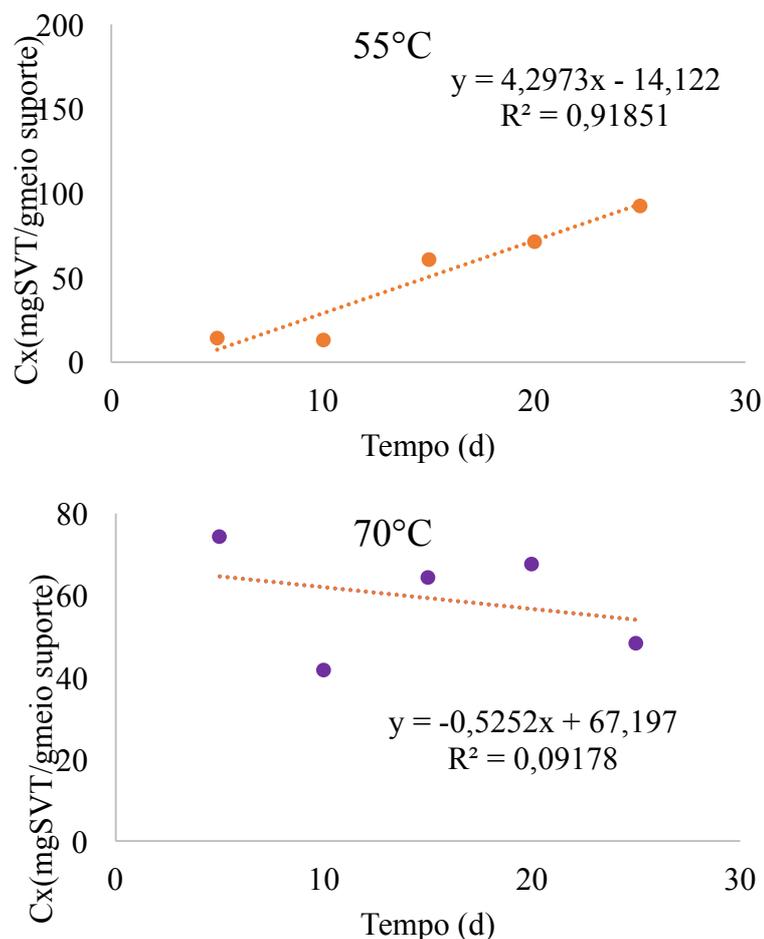
Legenda: SVT – Sólidos Totais Voláteis.

Fonte: Autor.

Na Figura 6 pode-se observar os dados de quantificação da biomassa acidogênica para a operação concomitante dos reatores diferenciais em condição termofílica (55°C) e termofílica extrema (70°C). Na condição termofílica, a concentração de biomassa no reator (C_x) ao longo do tempo resultou em crescimento com comportamento linear (Figura 7) enquanto que, em termofilia extrema não foi observado crescimento de biomassa. O acúmulo de lodo observado em condição termofílica extrema no Experimento 1 provavelmente estava associada ao maior tempo de monitoramento (50 dias). É válido destacar que o elevado valor observado no primeiro sacrifício à 70°C pode estar associado a um erro de diluição e análise. A comparação do comportamento de crescimento à 70°C dentro de 25 dias entre os experimentos 1 e 2, não é confiável devido ao baixo espaço amostral do experimento 1, reduzido devido aos ciclos de 10 dias de operação.

A velocidade específica de acumulação dos microrganismos (β) em cada temperatura foi obtida a partir do coeficiente angular dos gráficos de C_x em função do tempo (Figura 8). Em condição termofílica, o valor de β encontrado foi de $4,2973 \text{ dia}^{-1}$, e em condição extrema de temperatura (70°C) o β obtido foi de $-0,5252 \text{ dia}^{-1}$, o que representa que houve diminuição da biomassa nos reatores nessa condição e que sob condição de menor temperatura o acúmulo de biomassa ocorreu significativamente mais rápido.

Figura 9 - Dados referentes às concentrações de lodo por tempo de experimento



Legenda:SVT – Sólidos Voláteis Totais

Fonte: Autor.

A partir dos resultados observados no Experimento 2 é possível observar e confirmar a tendência relatada por Koyama (2013), na qual a maior temperatura promoveu menor acúmulo de biomassa ao longo do tempo de operação.

Estudos realizados com reatores de leito empacotado com PEBD em escala de bancada, para a produção biológica de hidrogênio a partir da vinhaça (FERRAZ JÚNIOR, ETCHEBEHERE; ZAIAT, 2015a, 2015b; FUESS et al., 2016a), destacaram a vantagem da operação desses reatores em condição termofílica sobre a condição mesofílica. Segundo os autores, maior estabilidade e produção contínua de hidrogênio estão associados à maiores temperaturas de operação, e segundo Ferraz Júnior, Etchebehere e Zaiat . (2015a) um dos motivos para tal é o menor acúmulo de lodo nessas condições.

De acordo com Speece (1996), processos anaeróbios em condição termofílica, apresentam baixo coeficiente líquido de produção celular de lodo, cerca de 50% do valor em

condição mesofílica. Os resultados encontrados no Experimento 2 reafirmam o que parece ser consenso no que diz respeito ao crescimento celular, ou seja, espera-se que em maiores temperaturas, principalmente em temperaturas extremas como a utilizada neste estudo (70°C), a diversidade de microrganismos que consigam se desenvolver e crescer seja menor.

No estudo realizado por Fuess et al. (2016b), para produção de hidrogênio a partir da fermentação da vinhaça de cana-de-açúcar em condição termofílica (55°C), usando reator de leito empacotado com o mesmo material suporte utilizado na presente pesquisa, os autores relataram necessidade de descartes periódicos de biomassa a partir do 45º dia de operação para manutenção da relação alimento/microrganismos e assim manutenção da produção de hidrogênio. Os resultados obtidos no Experimento 2 desta pesquisa demonstraram que a operação de reatores em condição de termofilia extrema poderiam resultar em produção contínua de hidrogênio sem a necessidade de descartes de lodo, devido ao menor acúmulo celular observado nesta condição.

Em estudo realizado por Niz et al. (2019) para produção de hidrogênio em condição termofílica extrema (70°C) a partir da fermentação da vinhaça de cana-de-açúcar em reator de leito estruturado, foi observada produção contínua e estável de hidrogênio por 170 dias, sem necessidade de descarte de lodo. A estabilidade observada nessa condição foi associada ao menor acúmulo de lodo no reator devido à estruturação do leito e ao menor rendimento celular em condição extrema de temperatura, o que por sua vez possibilitou a manutenção da relação alimento/microrganismos que foi destacada por Fuess et al. (2016a) como a principal causa da instabilidade na produção de hidrogênio em condição termofílica (55°C). A partir dos resultados do presente estudo é possível afirmar que o menor acúmulo de biomassa em condição termofílica extrema é inferior que em termofilia.

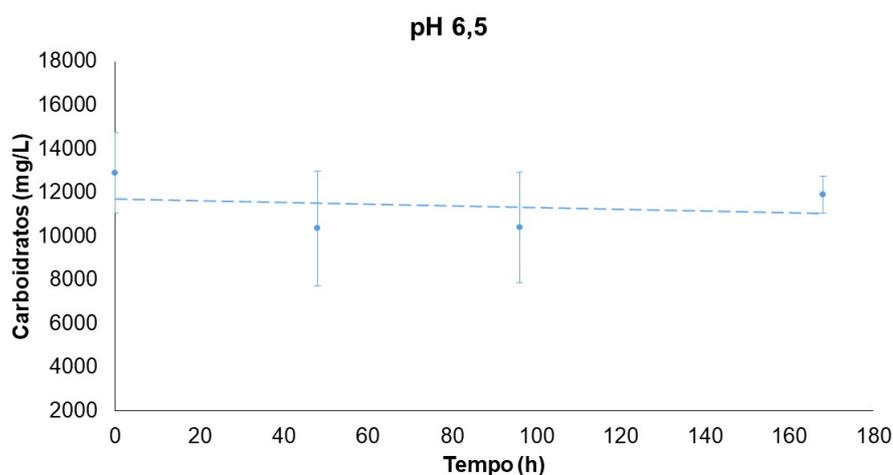
5.3 Determinação do melhor pH de fermentação em termofilia extrema (FASE 2)

Nas 5 tentativas de ensaios em batelada realizadas, não foi observada a produção de hidrogênio. Independente da aplicação de vinhaça bruta ou diluída, da utilização ou não de inóculo e das diferentes condições de pH iniciais, pouca ou nenhuma alteração físico-química da fase líquida nos reatores foi observada. A produção de gás também foi nula em todos os ensaios.

A seguir são apresentados os resultados das análises físico-químicas de amostras do último ensaio realizado, sob pH de 4,5 e 6,5 com vinhaça bruta (30% do volume total de fermentação), inóculo de auto fermentação (IAF - 10% do volume total de reação) e lodo

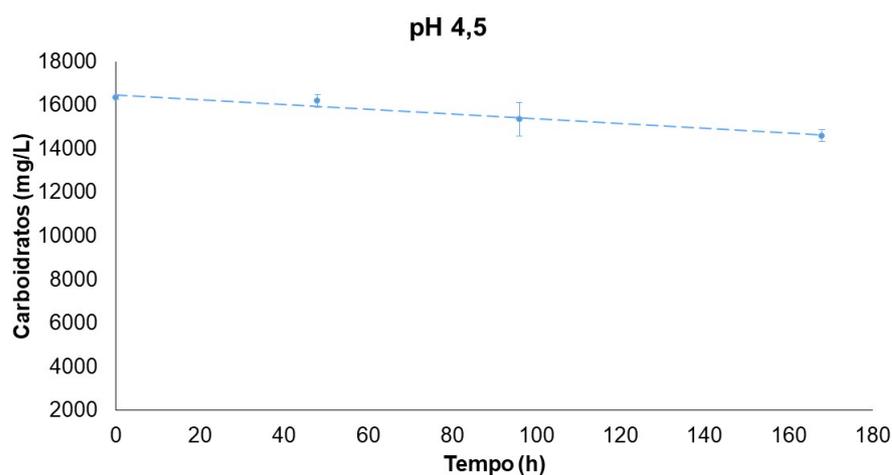
termofílico metanogênico (LTM - 60% do volume total de fermentação). Assim como em todos os ensaios prévios, não foi observada produção de hidrogênio ou alteração físico-química da fase líquida. A concentração de carboidratos observada nos reatores ao longo do período experimental manteve-se constante para ambas as condições de pH avaliadas, como observado nas Figuras 10 e 11. Tal comportamento indica que não houve degradação de carboidratos, o que demonstra ausência de metabolismo microbológico conversor de carboidratos e justifica a produção nula de biogás e consequentemente de hidrogênio.

Figura 10 - Perfil temporal da concentração de carboidratos em pH 6,5



Fonte: Autor.

Figura 11 - Perfil temporal da concentração de carboidratos em pH 4,5



Fonte: Autor.

A concentração de carboidratos inicial em pH 6,5 era de 13.200 mg.L^{-1} , ao final do experimento a concentração era de 12.325 mg.L^{-1} , representando redução de apenas 7% na

concentração de carboidratos. Em pH 4,5 haviam inicialmente 16.500 mg.L⁻¹ de carboidratos, ao final do experimento essa concentração era de 16.175 mg.L⁻¹, representando redução de 2%. A variação da concentração inicial e final de carboidratos pode estar associada a erros de diluição ou de análise e não necessariamente à atividade microbiológica de consumo/degradação de carboidratos.

As elevadas concentrações de carboidratos no ensaio 5 (13.200 a 16.500 mg.L⁻¹) estão relacionadas à elevada concentração de carboidratos no inóculo utilizado (IAF+LTM), principalmente devido do LTM que possuía valores maiores que 10.000 mg.L⁻¹, e ao elevado volume utilizado do mesmo (70% do volume total de fermentação), pois a vinhaça, como já destacado anteriormente, apresentava concentração de carboidratos de aproximadamente 4.700 mg.L⁻¹.

Os ácidos graxos voláteis (AGV) são resultado direto do processo fermentativo responsável pela produção de H₂. Como nos ensaios realizados não foi observada produção de H₂ e também não houve conversão significativa de carboidratos, a produção de AGV não era esperada. A análise dos AGV demonstrou ausência de todos os ácidos exceto do ácido acético, que já estava presente na vinhaça no início do ensaio.

Na figura 12 é possível verificar o perfil temporal da concentração de ácido acético no ensaio 5 em pH 6,5. Como esperado, não foi observada a produção de ácido durante todo o período. Para condição de pH inicial de 4,5, considerando concentração inicial e final do ensaio, também não foi verificada produção de ácido acético (Figura 13).

Figura 12 - Concentrações de ácido acético em pH 6,5

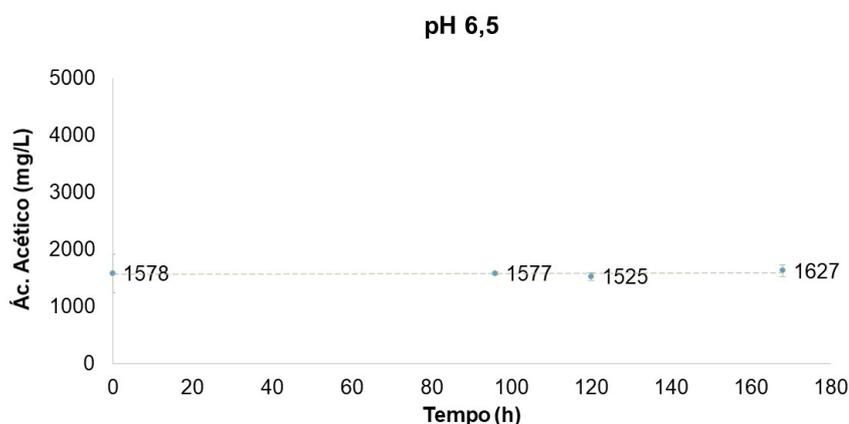
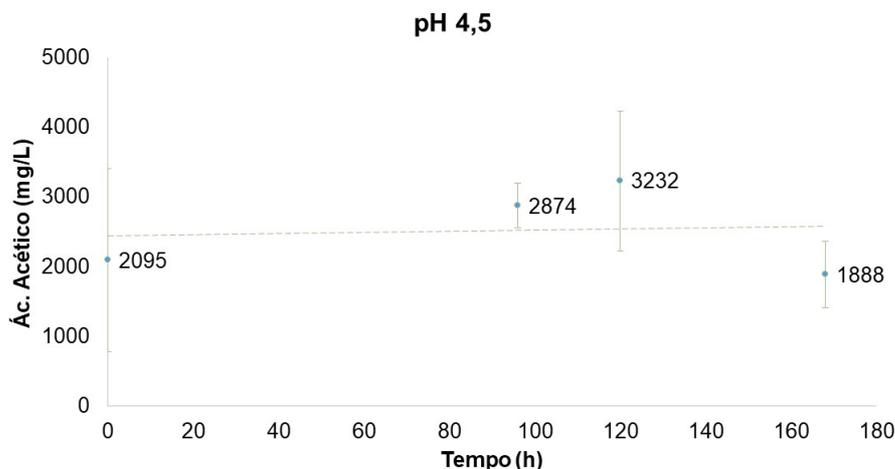


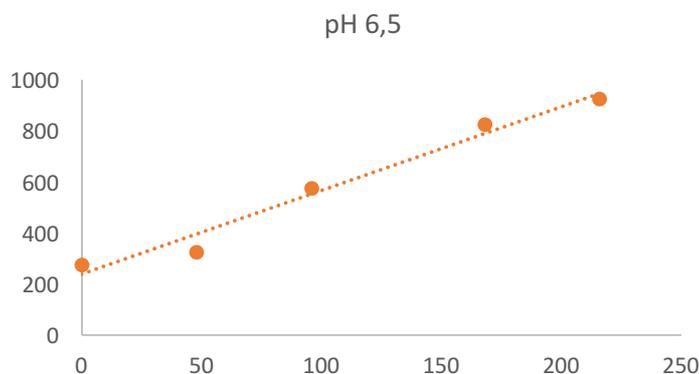
Figura 13 - Concentrações de ácido acético por reator em pH 4,5



Fonte: Autor.

Sabe-se que a produção biológica de hidrogênio pode se dar também pela degradação de Ácido Lático, parâmetro que não foi acompanhado durante o ensaio 5, porém durante a discussão dos resultados decidiu-se analisar a concentração de ácido lático nos outros ensaios. O ensaio 4 demonstrou tendência de crescimento da concentração de ácido lático, indicando que os microrganismos não estavam metabolizando esse composto e que a rota metabólica existente no meio era de produção de ácido lático, havendo, portanto, bactérias produtoras de ácido lático no meio. A figura 14 mostra as concentrações de ácido lático no início e fim do ensaio 4.

Figura 14 - Concentrações de ácido lático por reator no ensaio 4



Fonte: Autor.

A produção de H_2 em condição termofílica extrema com uso de vinhaça de cana-de-açúcar já se mostrou possível em reator contínuo, auto inoculado, em experimentos

realizados no Laboratório de Processos Biológicos (LPB), onde estes ensaios foram realizados, como observado por Niz et al. (2019). Além disso, a produção de H₂ em termofilia extrema já se mostrou possível com uso de outros substratos, sintéticos e não sintéticos, com culturas puras e mistas (ABREU et al., 2010; LIU; ZENG; ANGELIDAKI, 2008; TÄHTI; KAPARAJU; RINTALA, 2013; ZEIDAN; VAN NIEL, 2010).

A inviabilidade dos ensaios aqui apresentados pode estar associada aos métodos de inoculação utilizados, que aparentemente não foram suficientes para estabelecimento de uma comunidade microbiológica fermentativa para produção de H₂. O fato de que não foi observada conversão de carboidratos e/ou produção de ácidos tornam evidente a inexistência de metabolismo fermentativo nos ensaios realizados. Mesmo os ensaios realizados com vinhaça diluída produção nula de H₂ foi observada, anulando a hipótese de inibição de atividade microbiológica por excesso de substrato.

Devido à produção de ácido lático observada, é possível inferir que a comunidade microbiológica estabelecida nesses reatores metabolizou compostos através da rota metabólica de produção de ácido lático e não assimilação do mesmo. As bactérias produtoras de lático (BPL) são muito resistentes à diferentes condições de pH e tendem a se adaptar mais facilmente em diversos meios. Dessa forma, possivelmente as BPL prevaleceram no meio liberando bacteriocinas, compostos que inibem o crescimento de outras espécies de bactérias.

Outra possibilidade para a produção nula de hidrogênio e ausência de metabolismo fermentativo observada nos experimentos cinéticos é a possibilidade da existência de algum composto inibidor na vinhaça utilizada, composto este que pode haver sido negligenciado na caracterização físico-química realizada.

6 CONCLUSÕES

- A caracterização e o monitoramento da composição da vinhaça de cana-de-açúcar é de extrema importância para o uso da mesma na produção de hidrogênio (ou metano) em processo fermentativo (ou metanogênico). Além disso, o monitoramento pode servir como ferramenta para detecção de problemas nos sistemas de fermentação ou de destilação do etanol no processo produtivo de usinas sucroalcooleiras.

- A condição termofílica extrema resultou menor acúmulo de biomassa no leito dos RAHLFD preenchidos com PEBD comparativamente à condição termofílica, indicando que, a operação de reatores de leito fixo com mesmo preenchimento sob condição extrema de temperatura, poderia viabilizar a produção contínua de H_2 por períodos mais longos sem necessidade de descarte de biomassa.

- Nos ensaios em batelada, não foi possível cultivar microrganismos acidogênicos produtores de H_2 , o que foi evidenciado pela produção nula de biogás e consequentemente de H_2 . Também não foi observada degradação/conversão de carboidratos e/ou produção de AGV. Mesmo com diferentes métodos de inoculação e com diluição da vinhaça não foi observada atividade fermentativa nos ensaios realizados, independente dos pH aplicados.

REFERÊNCIAS

- ABREU, A.A. *et al.* Engineered heat treated methanogenic granules: a promising biotechnological approach for extreme thermophilic biohydrogen production. **Bioresource Technology**, v.101, n.24, p.9577–9586, July 2010. doi.org/10.1016/j.biortech.2010.07.070.
- ADORNO, M.A.T.; HIRASAWA, J.S.; VARESCHE, M.B.A. Development and validation of two methods to quantify volatile acids (C2-C6) by GC/FID: headspace (automatic and manual) and liquid-liquid extraction (LLE). **American Journal of Analytical Chemistry**, v.5, n.7, p.406–414, May 2014. doi.org/10.4236/ajac.2014.57049.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 22th ed. Washington: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environmental Federation, 2012.
- AMORES, M. J. *et al.* Life cycle assessment of fuel ethanol from sugarcane in Argentina. **International Journal of Life Cycle Assessment**, v. 18, n. 7, p. 1344–1357, 2013.
- AMSTALDEN, I.M.P. **Estudo de alguns parâmetros para precipitação de glicerol através de complexação com zircônio em vinhaças de álcool carburante e aguardente e em lixias fracas de saboaria**. 1991. 132 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1991.
- ANDRADE, E.T.; CARVALHO, S.R.G.; SOUZA, L.F. Programa do proálcool e o etanol no Brasil. **Engvista**, v.11, n.2, p.127–136, Dez. 2009.
- ANTONOPOULOU, G. *et al.* Influence of pH on fermentative hydrogen production from sweet sorghum extract. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.35, p.1921-1928, Mar. 2010.
- BARKER, S.B.; SUMMERSON, W.H. The Colorimetric determination of lactic acid in biological material. **Journal of Biology and Chemistry**, v.138, p.535-554, 1941.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Conab prevê nova queda do açúcar e aumento do etanol na safra 2018/19**. Brasília, 2018. Disponível em:<<http://www.agricultura.gov.br/noticias/conab-preve-nova-queda-do-acucar-e-aumento-do-etanol-na-safra-2018-19>>. Acesso em: 3 set. 2019.
- BUITRÓN, G. *et al.* Hydrogen and methane production via a two-stage processes (H₂-SBR D CH₄-UASB) using tequila vinasses. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.39, n.19, p.249–255, 2014.
- CAI, G. *et al.* Metabolic flux analysis of hydrogen production network by clostridium butyricum W5: effect of pH and glucose concentrations. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.35, n.13, p. 6681-6669, June 2010.
- CANÇADO, P.H.D. *et al.* Sugarcane stems as larval habitat for the stable fly (stomoxys calcitrans) in sugarcane plantations. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, n 6, p.741–744, June 2013. doi.org/10.1590/S0100-736X2013000600009.

CHEN, C.C.; LIN, C.Y.; CHANG, J.S. Kinetics of hydrogen production with continuous anaerobic. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.57, n. 1-2, p.56–64, Oct. 2001.

CHERNICHARO, C.A.L. **Reatores anaeróbios**. 1^a ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental 1997, v. 5, 246 p.

CHRISTOFOLETTI, C.A. *et al.* Sugarcane vinasse: environmental implications of its use. **Waste Management**, v.33, n.12, p.2752–2761, Sept. 2013.

Doi:10.1016/j.wasman.2013.09.005.

CUETOS M.J. *et al.* Anaerobic digestion of solid slaughterhouse waste (SHW) at laboratory scale: Influence of co-digestion with the organic fraction of municipal solid waste (OFMSW). **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, n. 1, p. 99-106, May 2008.

Doi:10.1016/j.bej.2007.11.019

D'AGOSTO, M.A.; OLIVEIRA, C.M. **Logística sustentável: vencendo o desafio contemporâneo da cadeia de suprimentos**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2018.

DAREIOTI, M.A.; VAVOURAKI, A.I.; KORNAROS, M. Effect of pH on the anaerobic acidogenesis of agroindustrial wastewaters for maximization of bio-hydrogen production: a lab-scale evaluation using batch tests. **Bioresource Technology**, v. 162, p. 218–227, June 2014. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.149>.

DAS, D.; VEZIROGLU, T.N. Advances in biological hydrogen production processes. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.33, n.21, p.6046–6057, Oct. 2008.

Doi: 10.1016/j.ijhydene.2008.07.098.

DUBOIS, M. *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, n.3, p.350–356, Mar. 1956.

doi.org/10.1021/ac60111a017.

ELIA NETO, A. **Estado da arte da vinhaça**. Piracicaba: UNICA – União da Indústria da Cana-de-Açúcar, 2016.

FERRAZ JÚNIOR, A.D.N.. **Digestão anaerobia da vinhaça da cana de açúcar em reator acidogênicos de leito fixo seguido de reator metanogênico de manta de lodo**. 2013. 164 f. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

FERRAZ JÚNIOR, A.D.N. *et al.* Effect of organic loading rate on hydrogen production from sugarcane vinasse in thermophilic acidogenic packed bed reactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.39, n.30, p.16852–16862, Oct. 2014.

Doi: 10.1016/j.ijhydene.2014.08.017.

FERRAZ JÚNIOR, A.D.N. *et al.* Thermophilic anaerobic digestion of raw sugarcane vinasse. **Renewable Energy**, v.89, p.245–252, Apr. 2016.

doi.org/10.1016/j.renene.2015.11.064.

FERRAZ JÚNIOR, A.D.N.; ETCHEBEHERE, C.; ZAAIT, M.. Mesophilic hydrogen production in acidogenic packed-bed reactors (APBR) using raw sugarcane vinasse as substrate: Influence of support materials. **Anaerobe**, v.34, p.94–105, Aug. 2015a.

doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.04.008.

FERRAZ JÚNIOR, A.D.N.; ETCHEBEHERE, C.; ZAAIT, M.. High organic loading rate on thermophilic hydrogen production and metagenomic study at an anaerobic packed-bed reactor treating a residual liquid stream of a Brazilian biorefinery. **Bioresource Technology**, v.186, p.81–88, June 2015b. Doi: 10.1016/j.biortech.2015.03.035.

FUENTES, M. *et al.* Application of two anaerobic digestion models to biofilm systems. **Biochemical Engineering Journal**, v. 38, p.259-269, 2008.

FUESS, L.T. *et al.* Operational strategies for long-term biohydrogen production from sugarcane stillage in a continuous acidogenic packed-bed reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.41, n.19, p.8132–8145, 2016a. doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.10.143.

FUESS, L.T. *et al.* Thermophilic two-phase anaerobic digestion using an innovative fixed-bed reactor for enhanced organic matter removal and bioenergy recovery from sugarcane vinasse. **Applied Energy**, v.189, n.10, p.480–491, 2016b.

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. **Biosource Technology**, v. 247, p. 426-433. 2018 DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.121>.

FUESS, L.T.; GARCIA, M.L. Implications of stillage land disposal: a critical review on the impacts of fertigation. **Journal of Environmental Management**, v.145, p.210–229, Dec. 2014. doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.07.003.

FUESS, L.T.; GARCIA, M.L, ZAIAT, M. Seasonal characterization of sugarcane vinasse: Assessing environmental impacts from fertirrigation and the bioenergy recovery potential through biodigestion. **Science of Total Environment**, v.634, p.29-40, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.326>

HALLENBECK, P.C. Fermentative hydrogen production: principles, progress, and prognosis. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.34, n.17, p.7379–7389, Sept. 2009. Doi: 10.1016/j.ijhydene.2008.12.080.

HAWKES, F. *et al.* Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimisation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.27, n.11-12, p.1339–1347, Oct. 2002. Doi: 10.1016/S0360-3199(02)00090-3.

INTANOO, P. *et al.* Optimization of separate hydrogen and methane production from cassava wastewater using two-stage upflow anaerobic sludge blanket reactor (UASB) system under thermophilic operation. **Bioresource Technology**, v.173, p.256–265, Sept. 2014. Doi: 10.1016/j.biortech.2014.09.039.

KIM, T. *et al.* Effects of initial lactic acid concentration, HRTs, and OLRs on bio-hydrogen production from lactate-type fermentation. **Bioresource Technology**, v.103, n.1, p.136-141, Oct. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.093>.

KOYAMA, M.H. **Obtenção de parâmetros cinéticos da etapa acidogênica da digestão anaeróbia da vinhaça de cana-de-açúcar em reatores diferenciais de leito fixo.** 2013. 187 f. Monografia (Graduação em Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

LEITE, J. *et al.* Application of an anaerobic packed-bed bioreactor for the production of hydrogen and organic acids. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.33, n.2, p.579–586, Jan. 2008. Doi: 10.1016/j.ijhydene.2007.10.009.

LIU, D.W.; ZENG, R.J.; ANGELIDAKI, I. Enrichment and adaptation of extreme-thermophilic (70 °C) hydrogen producing bacteria to organic household solid waste by repeated batch cultivation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.33, n.22, p.6492–6497, Nov. 2008. Doi: 10.1016/j.ijhydene.2008.08.014.

LUO, G. *et al.* Evaluation of pretreatment methods on mixed inoculum for both batch and continuous thermophilic biohydrogen production from cassava stillage. **Bioresource Technology**, v.101, n.3, p.959–964, Feb. 2010. Doi: 10.1016/j.biortech.2009.08.090.
RETIRAR ESPAÇO EXCESSIVO! LUO, G. *et al.* Long-term effect of inoculum pretreatment on fermentative hydrogen production by repeated batch cultivations: homoacetogenesis and methanogenesis as competitors to hydrogen production. **Biotechnology and Bioengineering**, v.108, n.8, p.1816–1827, Aug. 2011. Doi: 10.1002/bit.23122.

LYRA, M.R.C.C.; ROLIM, M.M.; SILVA, J.A.A. Topossequência de solos fertigados com vinhaça: contribuição para a qualidade das águas do lençol freático. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.7, n.3, p.525–532, dez. 2003. doi.org/10.1590/S1415-43662003000300020.

MIQUELETO, A. P. *et al.* Influence of carbon sources and C/N ratio on EPS production in anaerobic sequencing batch biofilm reactors for wastewater treatment. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 4, p. 1324–1330, 2010.

NITSCH, M. O Programa de biocombustíveis PROALCOOL no contexto da estratégia energética brasileira. **Revista de Economia Política**, v.11, n.2, p.123-138, 1991.

NIZ, M.Y.K. *et al.* Extreme thermophilic condition: An alternative for long-term biohydrogen production from sugarcane vinasse. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, p. 22876-22887, July 2019. Doi: 10.1016/j.ijhydene.2019.07.015.

NIZ, M.Y.K. **Produção biológica de hidrogênio e metano a partir de vinhaça de cana-de-açúcar em termofilia extrema.** 140 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós Graduação e Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, Sao Carlos, 2019.

PERNA, V. *et al.* Hydrogen production in an upflow anaerobic packed bed reactor used to treat cheese whey. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.38, n.1, p.54–62, Jan. 2013. Doi: 10.1016/j.ijhydene.2012.10.022.

RIBEIRO, R. *et al.* Influence of the carbon source on the anaerobic biomass adhesion on polyurethane foam matrices. **Journal of Environmental Management**, v.74, n.2, p.187–194, 2005. doi.org/10.1016/j.biortech.2011.01.084.

SILVA, M.A.S.; GRIEBELER, N.P.; BORGES, L.C. Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.11, n.1, p.108–114, jan./fev. 2007. doi.org/10.1590/S1415-43662007000100014.

SOCOL, C.R. *et al.* Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v.101, n.13, p.4820–4825, July 2010. Doi: 10.1016/j.biortech.2009.11.067.

SPEECE, R.E. **Anaerobis biotechnology for Industrial wastewater treatment**. Nashville: Archea, 1996.

TÄHTI, H.; KAPARAJU, P.; RINTALA, J. Hydrogen and methane production in extreme thermophilic conditions in two-stage (upflow anaerobic sludge bed) UASB reactor system. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.38, n.12, p.4997–5002, Apr. 2013. Doi: 10.1016/j.ijhydene.2013.02.058.

TAYLOR, K.A.C.C. A Simple colorimetric assay for muramic acid and lactic acid. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.56, n.1, p.49–58, 1996. Doi: 10.1007/bf02787869. RETIRAR ESPAÇO EXCESSIVO TEMUDO, M.F.; KLEEREBEZEM, R.; VAN LOOSDRECHT, M. Influence of the pH on (open) mixed culture fermentation of glucose: a chemostat study. **Biotechnology and Bioengineering**, v.98, n.1, p.69–79, Sept. 2007. Doi: 10.1002/bit.21412.

VALDEZ, H. *et al.* Determinação de glicerol livre e total em amostras de biodiesel por método enzimático com detecção colorimétrica. **Química Nova**, v.35, n.3, p.601–607, dez. 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422012000300028>.

VAN LIER, J.B. Limitations of thermophilic anaerobic wastewater treatment and the consequences for process design. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.69, n.1, p.1–14, 1996.

VAN LIER, J.B.; SANZ MARTIN, J.L.; LETTINGA, G. Effect of temperature on the anaerobic thermophilic conversion of volatile fatty acids by dispersed and granular sludge. **Water Research**, v. 30, n. 1, p. 199–207, 1996. Doi: 10.1016/0043-1354(95)00107-V

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. Doi: 10.1016/j.ijhydene.2008.11.015.

WILKIE, A.; RIEDESEL, K.; OWENS, J. Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks. **Biomass and Bioenergy**, v.19, n.2, p.63–102, July. 2000. Doi: 10.1016/S0961-9534(00)00017-9.

ZEIDAN, A.A.; VAN NIEL, E.W.J. A Quantitative analysis of hydrogen production efficiency of the extreme thermophile *Caldicellulosiruptor owensensis* OLT. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.35, n.3, p.1128–1137, Dec. 2010. Doi: 10.1016/j.ijhydene.2009.11.082.

ZHU, H. *et al.* Eliminating methanogenic activity in hydrogen reactor to improve biogas production in a two-stage anaerobic digestion process co-digesting municipal food waste and sewage sludge. **Bioresource Technology**, v.102, n.14, p.7086–7092, June 2011.
Doi: 10.1016/j.biortech.2011.0.