

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA CIVIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL

NORMA CANDIDA DOS SANTOS AMORIM

PRODUÇÃO DE ÁCIDO CAPRÓICO ASSOCIADO À PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO
UTILIZANDO A MANIPUEIRA

RECIFE

2018

NORMA CANDIDA DOS SANTOS AMORIM

PRODUÇÃO DE ÁCIDO CAPRÓICO ASSOCIADO À PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO
UTILIZANDO A MANIPUEIRA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Civil.

Área de concentração: Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos

Orientadora: Profa. Dra. Sávia Gavazza dos Santos Pessoa

Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Lucena Cavalcante de Amorim

RECIFE

2018

Catálogo na fonte
Bibliotecária: Neide Mesquita Gonçalves Luz / CRB4-1361 (BCTG)

A524p Amorim, Norma Candida dos Santos.
Produção de ácido capróico associado à produção de hidrogênio utilizando a
manipueira / Norma Candida dos Santos Amorim. – Recife, 2018.
128fol. il., figs., gráfs., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Sávia Gavazza dos Santos Pessoa.
Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Lucena Cavalcante de Amorim.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG.
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, 2018.
Inclui Referências.

1. Engenharia Civil. 2. Manipueira. 3. Acetileno. 4.
Autofermentação. 5. Alongamento da cadeia de carbono. 6. Tratamento
térmico I. Pessoa, Sávia Gavazza dos Santos (Orientadora). II.
Amorim, Eduardo Lucena Cavalcante de (Coorientador). III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL

A comissão examinadora da Defesa de Tese de Doutorado

**PRODUÇÃO DE ÁCIDO CAPRÓICO ASSOCIADO À PRODUÇÃO
DE HIDROGÊNIO UTILIZANDO A MANIPUEIRA**

defendida por

Norma Candida dos Santos Amorim

Considera a candidata APROVADA

Recife, 22 de janeiro de 2018

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Sávia Gavazza dos Santos Pessôa – UFPE
(orientadora)

Prof. Dr. Marcelo Zaiat – USP
(examinador externo)

Prof.^a Dr.^a Miriam Cleide Cavalcante Amorim – UNIVASF
(examinadora externa)

Prof.^a Dr.^a Fernanda Magalhães Amaral – UFPE
(examinadora externa)

Prof. Dr. Wanderli Rogério Moreira Leite – UFPE
(examinador externo)

Dedico este trabalho com carinho aos meus
pais, minhas irmãs, meu sobrinho, meu
esposo e ao meu filho.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar à Deus, por todas bênçãos as recebidas. Só tenho a agradecer!

Aos meus pais, Carlos Jorge (em memória) e Neusa Maria, pelo amor, incentivo e oportunidades.

Às minhas irmãs: Carol e Camilla. E ao meu sobrinho amado, Carlos Jorge. Meus amores, meu tudo.

Ao meu esposo Fabiano Barbosa, pelo companheirismo, paciência, incentivo e por nosso filho, Carlos Manoel.

Aos meus familiares e amigos, pela paciência e compreensão.

À minha orientadora, Sávia Gavazza, por aceitar a orientação, por toda ajuda, pelos conhecimentos transmitidos, pela confiança. Muito obrigada!

Ao meu co-orientador, Eduardo Lucena Cavalcante de Amorim, pelo incentivo, cooperação e generosidade.

A todos os colegas por todo apoio e ajuda. Nadjane, Elvan, Eveline, Juliana, Aline, Shyrlane, Antônio, Thais, Larissa, Mariana, Jucelia, dentre tantos que colaboraram com a minha jornada.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil da UFPE.

À amiga de sempre e incentivadora, Josuelly Souza.

Ao amigo Everaldo por toda ajuda e hospitalidade.

Ao Sr. Bréu pela permissão da coleta de manipueira.

Ao Laboratório de Saneamento Ambiental da UFAL, onde foram desenvolvidas quase todas as análises.

Ao Laboratório de Saneamento Ambiental da UFPE, pelo suporte.

A todos que contribuíram de alguma forma para a conclusão desse trabalho. Muito obrigada!

RESUMO

A manipueira é um resíduo gerado durante o processamento da mandioca (*Manihot esculenta Crantz*) para produção de farinha, fécula ou povilho. Geralmente a manipueira é descartada sem tratamento prévio, causando grande impacto ambiental pelo seu alto potencial poluidor, devido a elevada concentração de matéria orgânica e teor de cianeto. Porém, este resíduo é bastante atrativo para ser utilizado como substrato em processos biotecnológicos, incluindo a produção de biohidrogênio. Como a produção de hidrogênio ocorre no início da digestão anaeróbia (acidogênese), uma etapa posterior pode ser conduzida a fim de agregar valor ao processo. O ácido capróico pode ser formado a partir do alongamento da cadeia de carbono como etapa posterior à acidogênese. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de hidrogênio e ácido capróico a partir da digestão anaeróbia da manipueira. Para isso, testes em bateladas foram conduzidos em frascos de 2,3 L. Na primeira fase (F1), a inibição dos microrganismos metanogênicos no lodo foi avaliada utilizando acetileno (1% v/v no *headspace*) e tratamento térmico (120 °C, 1 atm por 30 minutos). Numa segunda fase (F2), três tipos de inóculo (rúmen bovino e dois lodos anaeróbios, provenientes de estação de tratamento de águas residuárias industrial e municipal) foram testados. As concentrações iniciais de manipueira, medidas como Demanda Química de Oxigênio (DQO), iguais a 10, 20 e 40 g O₂/L, foram aplicadas para cada inóculo, com o objetivo de identificar a melhor condição experimental para produção de hidrogênio e ácido capróico durante a fermentação da manipueira. Na terceira e última fase (F3), o alongamento da cadeia de carbono durante a autofermentação (sem inóculo e sem inibição da metanogênese) da manipueira foi avaliada. Para isto, duas concentrações iniciais de substrato foram adotadas (10 e 20 g O₂/L). Etanol foi adicionado aos reatores para permitir o alongamento da cadeia de carbono por meio da fermentação secundária do etanol introduzido, utilizando o ácido acético presente no meio. Os resultados de F1 indicaram que ambos, acetileno e tratamento térmico, inibiram eficientemente a metanogênese, sem produção de metano. No entanto, o potencial máximo de produção de H₂ por aplicação de tratamento térmico (~563 mL) foi maior do que o obtido no tratamento com acetileno (~257 mL); o ácido butírico foi o principal subproduto gerado (~3 g/L). Em relação ao tipo de inóculo e a concentração inicial do substrato (F2), observou-se maior rendimento de hidrogênio (1,66 mol H₂/mol de glicose) e produção de ácido capróico (~2 g/L) para a concentração inicial de manipueira de 20 g O₂/L, quando o rúmen bovino foi o inóculo. O alongamento da cadeia de carbono a partir da autofermentação da manipueira (F3) resultou em concentração máxima de ácido capróico de 4,2 e 7,2 g/L e rendimentos da produção de hidrogênio de 1,01 e 1,98 mol H₂/mol glicose para as concentrações iniciais de substrato de 10 e 20 g O₂/L, respectivamente. Os principais produtos de degradação metabólica em todas as condições foram etanol, e os ácidos acético, butírico, propiônico e capróico.

Palavras-chave: Manipueira. Acetileno. Autofermentação. Alongamento da cadeia de carbono. Tratamento térmico.

ABSTRACT

Manipueira is an agroindustrial waste from cassava processing (*Manihot esculenta* Crantz) for flour, starch or *tapioca* flour production. Usually the manipueira is discarded without previous treatment, causing great environmental impact by its high polluting potential, due to high concentration of organic matter and cyanide content. It is an attractive substrate for biotechnological processes, including biohydrogen production, due its high carbohydrate content (20-40 g glucose/L). Since hydrogen production occurs at the beginning of anaerobic digestion (acidogenesis phase), a second step can be adopted in order to add value to the process. Caproic acid can be produced from carbon chain elongation as a step after acidogenesis. Therefore, the aim of this study was to evaluate hydrogen and caproic acid production from the anaerobic digestion of manipueira. In the first phase (P1), methanogenesis inhibition in the sludge was evaluated using acetylene (1% v/v of headspace) and heat treatment (120°C, 1 atm for 30 min). In the second phase (F2), three inoculum types obtained from common anaerobic biomass (bovine rumen and sludges from municipal and textile industrial wastewater treatment plant) were individually assayed. Three initial concentrations of manipueira, in terms of Chemical Oxygen Demand (COD), of 10, 20 and 40 g O₂/L, were applied for each inoculum in order to determine the best hydrogen and caproic acid production performance during the fermentation of the manipueira. In the third and last phase (F3), the carbon chain elongation during manipueira autofermentation (without inoculum and without methanogenesis inhibition) was evaluated. Two initial substrate concentrations were adopted (10 and 20 g O₂/L). Ethanol was added to the reactors to promote carbon chain elongation by secondary fermentation of the ethanol added using the acetic acid available from manipueira acidogenesis. Results of F1 indicated that either acetylene or heat treatment efficiently inhibited methanogenesis, with no methane production. However, the maximum H₂ production potential by applying heat treatment (~ 563 mL) was more than twice compared with that by acetylene treatment (~ 257 mL); and butyrate was the main carboxylic acid by-product (~ 3 g/L). In relation to the inoculum type and the initial substrate concentration (F2), the highest hydrogen yield (1.66 ± 0.07 mol H₂/mol glucose) and caproic acid production (~ 2 g/L) were observed at 20 g O₂/L of manipueira COD, when bovine rumen was the inoculum. The carbon chain elongation during manipueira autofermentation (F3) resulted in a maximum caproic acid concentration of 4.2 and 7.2 g/L and hydrogen yields of 1.01 and 1.98 mol H₂/mol glucose for the initial substrate concentrations of 10 and 20 g O₂/L, respectively. The primary metabolic degradation products in all experiments were ethanol and acetic, butyric, propionic and caproic acids.

Keywords: Manipueira. Acetylene. Auto-fermentation. Carbon chain elongation. Heat treatment.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Participação percentual dos principais municípios na produção de mandioca em Alagoas, 2013.....	21
Figura 2 – Fluxograma do processamento da farinha de mandioca.....	23
Figura 3 – Esquema das reações envolvidas na plataforma dos ácidos carboxílicos.....	51
Figura 4 – Esquema do banho térmico: 1 – bomba submersa; 2 – caixa térmica de isopor; 3 – frascos reatores; 4 – sensor de temperatura; 5 – controlador de temperatura digital; 6 – aquecedor elétrico.....	66
Figura 5 – Produção acumulada de hidrogênio para os dois tipos de inibição da metanogênese: (■) acetileno; (●) tratamento térmico; (—) ajuste do modelo Gompertz.....	72
Figura 6 – Distribuição dos metabólitos (●) EtOH; (■) HAc; (▲) HBU; (○) HPr; (□) HCa; (Δ) H ₂ ao longo do experimento para inibição da metanogênese utilizando (a) acetileno e (b) tratamento térmico.....	75
Figura 7 – Produção acumulada de hidrogênio ajustada ao modelo Gompertz em função do tipo de inóculo e da concentração inicial do substrato (■, ● e ▲, para 10, 20 e 40 gO ₂ /L, respectivamente), para os inóculos: (A) Rúmen bovino, (B) Municipal ; C Lodo têxtil.....	79
Figura 8 – Distribuição dos principais metabólitos e produção de hidrogênio ao longo do experimento quando utilizado o rúmen como inóculo (A – R10; B – R20; C – R40): (●) EtOH; (■) HAc; (▲) HBU; (○) HPr; (□) HCa; (Δ) H ₂	83
Figura 9 – Distribuição dos principais metabólitos e produção de hidrogênio ao longo do experimento quando utilizado lodo de ETE municipal como inóculo (A – M10; B – M20; C – M40): (●) EtOH; (■) HAc; (▲) HBU; (○) HPr; (□) HCa; (Δ) H ₂	85
Figura 10 – Distribuição dos principais metabólitos e produção de hidrogênio ao longo do experimento quando utilizado lodo têxtil (A – T10; B – T20; C – T40): (●) EtOH; (■) HAc; (▲) HBU; (○) HPr; (□) HCa; (Δ) H ₂	87
Figura 11 – Esquema do banho térmico: 1 – bomba submersa; 2 – caixa térmica de isopor; 3 – frascos reatores; 4 – sensor de temperatura; 5 – controlador de temperatura digital; 6 – aquecedor elétrico.....	94

Figura 12 – Hidrogênio e metabólitos de degradação produzidos durante o período experimental do reator alimentado com manipueira na concentração inicial de 10 g O ₂ /L: (●) EtOH; (■) HAc; (▲) HBU; (○) HPr; (□) HCa; (Δ) H ₂	100
Figura 13 – Hidrogênio e metabólitos de degradação produzidos durante o período experimental do reator alimentado com manipueira na concentração inicial de 20 g O ₂ /L: (●) EtOH; (■) HAc; (▲) HBU; (○) HPr; (□) HCa; (Δ) H ₂	100
Figura 14 – Concentração dos ácidos acético e capróico, etanol, hidrogênio e metano durante o alongamento da cadeia de carbono no experimento de concentração inicial de substrato de 10 g O ₂ /L: (●) EtOH; (■) HAc; (□) HCa; (Δ) H ₂ ; (○) CH ₄	105
Figura 15 – Concentração do ácido capróico (□) e comportamento do pH (Δ) durante o alongamento da cadeia de carbono no experimento de concentração inicial de substrato de 10 gO ₂ /L.....	107
Figura 16 – Concentração dos ácidos acético e capróico, etanol, hidrogênio e metano durante o alongamento da cadeia de carbono no experimento de concentração inicial de substrato de 20 g O ₂ /L: (●) EtOH; (■) HAc; (□) HCa; (Δ) H ₂ ; (○) CH ₄	108
Figura 17 – Concentração do ácido capróico (□) e comportamento do pH (Δ) durante o alongamento da cadeia de carbono no experimento de concentração inicial de substrato de 20 gO ₂ /L.....	110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição da área cultivada e produção de mandioca no Brasil em 2017.....	19
Tabela 2 – Resumo de estudos anteriores que avaliaram a produção de hidrogênio em testes em batelada.....	45
Tabela 3 – Resumo de resultados obtidos por estudos que avaliaram o uso da manipueira como substrato para produção de hidrogênio.....	47
Tabela 4 – Resumo das condições experimentais utilizadas na fase 2.....	68
Tabela 5 – Parâmetros gerados a partir do modelo Gompertz, consumo de carboidratos, rendimento da produção de hidrogênio e pH.....	72
Tabela 6 – Parâmetros gerados a partir do modelo Gompertz, consumo de carboidratos, rendimento da produção de hidrogênio e pH em função do tipo do inóculo e da concentração inicial do substrato.....	78
Tabela 7 – Parâmetros gerados a partir do modelo Gompertz, consumo de carboidratos, rendimento da produção de hidrogênio e pH.....	97
Tabela 8 – DQO teórica dos metabolitos e DQO medida durante a fase de alongamento da cadeia na condição A10, antes e após as adições de etanol.	106
Tabela 9 – DQO teórica dos metabolitos e DQO medida durante a fase de alongamento da cadeia na condição A20, antes e após as adições de etanol.	111
Tabela 10 – Balanço de energia a partir do consumo de etanol e produção de ácido capróico durante o alongamento da cadeia de carbono na condição A10.....	113
Tabela 11 – Balanço de energia a partir do consumo de etanol e produção de ácido capróico durante o alongamento da cadeia de carbono na condição A20.....	113

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ΔG	Variação da energia livre de Gibbs
λ	Duração da fase <i>lag</i>
AGV	Ácidos graxos voláteis
ATP	Trifosfato de adenosina
DBO	Demanda biológica de oxigênio
DQO	Demanda química de oxigênio
ETE	Estação de tratamento de efluentes
EtOH	Etanol
FORSU	Fração orgânica dos resíduos sólidos urbanos
HAc	Ácido acético
HBu	Ácido burítico
HCa	Ácido capróico
HPr	Ácido propiônico
HPR	Produção volumétrica de hidrogênio
HY	Rendimento da produção de hidrogênio
P	Potencial de produção de H_2
pH	Potencial hidrogeniônico
R^2	Coefficiente de regressão linear
RAHC	Reator anaeróbio horizontal com chicanas
R_m	Taxa máxima de produção de hidrogênio
ST	Sólidos totais
SV	Sólidos voláteis
TDH	Tempo de detenção hidráulica
UASB	Reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	OBJETIVOS.....	17
2.1	OBJETIVO GERAL.....	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
3.1	MANIPUEIRA – ÁGUA RESIDUÁRIA DO PROCESSAMENTO DA MANDIOCA.....	18
3.1.1	A Mandioca.....	18
3.1.2	A cultura da mandioca em Alagoas.....	20
3.1.3	O processamento da mandioca.....	20
3.1.4	A Manipueira.....	22
3.2	O HIDROGÊNIO COMO FONTE DE ENERGIA.....	25
3.3	PRODUÇÃO FERMENTATIVA DO HIDROGÊNIO.....	26
3.3.1	Rotas fermentativas.....	27
3.3.2	Parâmetros que influenciam a produção de hidrogênio.....	29
3.3.2.1	pH.....	29
3.3.2.2	Concentração e tipo de substrato.....	31
3.3.2.3	Temperatura.....	33
3.3.2.4	Tipo e pré-tratamento do inóculo.....	36
3.3.3	Produção de Hidrogênio em testes em batelada.....	39
3.3.4	Produção de Hidrogênio a partir da manipueira.....	47
3.4	PLATAFORMA DOS ÁCIDOS CARBOXÍLICOS.....	49
3.4.1	Alongamento da cadeia de carbono.....	50
3.4.2	Rotas metabólicas.....	53
3.4.3	Produtos de compostos intermediários com valor associado.....	54

3.5	CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE A REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	58
4	RESULTADOS.....	61
4.1	ARTIGO 1: EFEITO DA TÉCNICA DE INIBIÇÃO DA METANOGENESE, TIPO DE INÓCULO E CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO NA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO E ÁCIDOS CARBOXÍLICOS A PARTIR DA MANIPUEIRA.....	61
4.2	ARTIGO 2: PRODUÇÃO DE ÁCIDO CAPRÓICO POR ALONGAMENTO DA CADEIA DE CARBONO DURANTE A PRODUÇÃO FERMENTATIVA DE HIDROGÊNIO A PARTIR DA MANIPUEIRA.....	90
6	CONCLUSÃO GERAL.....	116
	REFERÊNCIAS.....	118

1 INTRODUÇÃO

A descoberta de novas reservas de petróleo não tem acompanhado o crescimento populacional. O aumento da demanda por energia tem levado a exploração cada vez maior dos recursos naturais. Ao mesmo tempo, a sociedade tem gerado quantidades crescentes de resíduos orgânicos, como águas residuais industriais e agrícolas (Agler et al., 2011).

Diante desse cenário, o aproveitamento de resíduos industriais e agroindustriais como matéria-prima para produção sustentável de biocombustíveis e produtos químicos surge como alternativa para minimizar a dependência dos combustíveis fósseis e os impactos ambientais causados pela má gestão desses resíduos.

Muitos bioprocessos podem fornecer bioenergia ou compostos químicos com valor agregado associado e alcançar simultaneamente o objetivo de controle da poluição e recuperação de subprodutos de degradação. O tratamento de efluentes com alto teor de matéria orgânica facilmente degradável (resíduos da indústria alimentícia, de cervejarias, suinocultura e bovinocultura, por exemplo) pode resultar em balanço positivo de energia líquida (Angenent et al., 2004).

Os principais bioprocessos que produzem bioenergia ou compostos bioquímicos enquanto tratam efluentes industriais e agroindustriais, são: a digestão anaeróbia metanogênica, a produção biológica de hidrogênio, as células a combustível microbianas e a fermentação, para a produção de compostos com valor agregado associado. A escolha do bioprocessos depende da viabilidade técnica e econômica, simplicidade operacional, demanda social e prioridade política. Numa sociedade sustentável, busca-se o tratamento de águas residuais objetivando o controle de poluição e a recuperação de energia e de materiais valiosos (Angenent et al., 2004).

A mandioca é um produto agrícola tipicamente brasileiro que é utilizado na alimentação humana e animal, além de servir como matéria-prima para vários produtos industrializados, tais como a farinha de mandioca, amido de mandioca e polvilho. No processamento de um quilograma de mandioca são produzidos cerca de 5-7 litros de águas residuais – a manipueira. A manipueira é um resíduo rico em carboidratos (20-40 g/L), com pH entre 4 a 6,5 e contém alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO)

(~30 g/L), demanda química de oxigênio (DQO) (60-100 g O₂/L) e sólidos totais (ST) (45 g/L). Apesar do seu conteúdo energético, a manipueira geralmente é descartada em correntes de água sem qualquer aproveitamento econômico, provocando grande impacto ambiental pela elevada concentração de matéria orgânica e pela presença de cianeto (aproximadamente 400 mg/L, com 50% de cianeto livre) (Cereda, 2001).

O alto teor de matéria orgânica torna a manipueira atrativa para ser utilizada como substrato em processos biotecnológicos, incluindo a produção de biohidrogênio (Cappelletti et al., 2011). A produção de hidrogênio por fermentação a partir de resíduos orgânicos ocorre na fase acidogênica da digestão anaeróbia. Nessa fase também ocorre conversão de resíduos orgânicos complexos em compostos mais biodegradáveis ou em metabólitos de interesse comercial (ácidos orgânicos e solventes) (Valdez-Vazquez e Poggi-Varaldo, 2009; Wang e Wan, 2009a). Vários fatores influenciam a produção fermentativa de hidrogênio, tais como: inóculo, tipo de reator, tipo de substrato, teor de nitrogênio, teor de fosfato, temperatura e pH (Wang e Wan, 2009a). O tipo de inóculo tem grande influência na evolução das rotas fermentativas (De Gioannis et al., 2013), porém há poucos trabalhos sobre os efeitos de diferentes inóculos na produção fermentativa de hidrogênio a partir da manipueira (Pakarinen et al., 2008; Phowan e Danvirutai, 2014).

Para aumentar a eficiência da produção de hidrogênio vários métodos de pré-tratamento do inóculo podem ser adotados, tais como: tratamento térmico, acidificação, basificação, aeração ou congelamento (Wang e Wan, 2009b). O principal objetivo do pré-tratamento do inóculo é a prevenção da metanogênese e favorecimento de microrganismos produtores de hidrogênio.

Ao inibir a metanogênese, o pré-tratamento do inóculo pode conduzir o processo fermentativo para o alongamento da cadeia de carbono a fim de converter os ácidos carboxílicos de cadeia curta gerados na acidogênese, em ácidos carboxílicos de cadeia média (como por exemplo, o ácido capróico), que possuem grande valor agregado (Grootscholten et al., 2013).

O alongamento da cadeia de carbono é dependente da disponibilidade de ácidos carboxílicos de cadeia curta com pequenas quantidades de etanol e uma pressão parcial de hidrogênio elevada. A principal rota de produção de ácido capróico utiliza o ácido acético como substrato e o etanol como doador de elétrons (Steinbusch et al., 2011).

A produção de ácido capróico a partir do alongamento da cadeia de carbono vem sendo relatada principalmente a partir de meio sintético (Steinbusch et al, 2011; Grootscholten et al., 2013). Porém, Agler et al. (2012) produziram ácido capróico a partir de etanol de uma indústria de cerveja, e Grootscholten et al. (2014) a partir da fração orgânica de resíduos sólidos urbanos.

Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a influência do tipo de inóculo e da concentração do substrato na produção de hidrogênio a partir da manipueira. Além disso, foi avaliada também a dinâmica de formação/consumo dos metabólitos gerados de acordo com o tipo de pré-tratamento do inóculo e do teor de hidrogênio produzido. Três tipos de inóculos foram avaliados, são eles: lodo proveniente de um reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB) que trata esgotos municipais (M), rúmen de bovino (R), lodo proveniente de estação de tratamento de efluentes de uma indústria têxtil (T), além da autofermentação (A). O alongamento da cadeia de carbono foi realizado na autofermentação.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o desempenho do processo de digestão anaeróbia da manipueira baseado na produção de hidrogênio e do alongamento da cadeia de carbono visando a produção de ácido capróico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Avaliar o efeito do tipo de inibição da metanogênese (acetileno e tratamento térmico) sobre a produção de hidrogênio e distribuição dos metabólitos;
- 2 Avaliar a influência do uso de diferentes concentrações iniciais de manipueira sobre a produção de hidrogênio e de ácido capróico;
- 3 Avaliar a influência do tipo de inóculo sobre a produção anaeróbia de hidrogênio e de ácido capróico, utilizando a manipueira como substrato;
- 4 Promover o alongamento da cadeia de carbono como etapa posterior à produção de hidrogênio a partir da manipueira.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 MANIPUEIRA – ÁGUA RESIDUÁRIA DO PROCESSAMENTO DA MANDIOCA

Nesse item será descrita a importância da cultura da mandioca no Estado de Alagoas, como ocorre o processamento da mandioca, a produção da manipueira e o desempenho desta em trabalhos anteriores visando a produção de hidrogênio.

3.1.1 A Mandioca

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é um produto agrícola tipicamente brasileiro e caracteriza-se por ser tolerante às condições de seca e baixa fertilidade do solo (Portella, 2015). Cereda et al. (2001) ressaltam a importância do cultivo da mandioca no Brasil tanto como fonte de energia na alimentação humana e animal quanto como na geração de emprego e renda.

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de mandioca, com uma produção estimada em 20.606.037 toneladas. O cultivo da mandioca é realizado em todas as regiões do Brasil, abrangendo uma área total cultivada de 2.126.664 hectares (IBGE, 2018).

A Tabela 1 apresenta a distribuição da área cultivada e da produção de mandioca no Brasil no ano de 2017. Apesar de possuir maior área cultivada (872.216 hectares), a região Nordeste possui a segunda maior produção (5.172.156 toneladas), ficando atrás da Região Norte (7.434.781 toneladas).

No Norte e Nordeste do Brasil o cultivo da mandioca é realizado por pequenos produtores. A maior parte da mandioca cultivada é utilizada para fabricação de farinha para consumo e comercialização, constituindo-se em uma fonte de renda complementar (Silva, 2009; Portella, 2015), o que justifica os menores rendimentos de produção nesses Estados (9,4 e 5,9 ton/ha, respectivamente).

Tabela 1 – Distribuição da área cultivada e produção de mandioca no Brasil em 2017.

Região	Área cultivada		Produção		Rendimento
	Hectares	%	tonelada	%	ton/ha
Norte	787.800	37	7.434.781	36	9,4
Nordeste	872.216	41	5.172.156	25	5,9
Suldeste	169.216	8	2.254.348	11	13,3
Sul	224.362	11	4.556.462	22	20,3
Centro-oeste	73.070	3	1.188.290	6	16,3

Fonte: IBGE, 2018.

Já nos Estados de São Paulo e Paraná, as lavouras são mais tecnificadas, resultando nos maiores rendimentos (aproximadamente 26 ton/ha). A maior parte da produção de mandioca nesses Estados é utilizada pela indústria de farinha e fécula (IBGE, 2017).

Um estudo da Embrapa (2013) indica que 60% da produção nacional de mandioca é realizada em pequenas propriedades (< 10 ha), com mão-de-obra própria, pouca tecnologia e capital, visando a produção de farinha para abastecimento do consumo local. Enquanto que apenas 12% da produção é realizada em grandes propriedades rurais (> 50 ha), utilizando mão-de-obra terceirizada, mais tecnologia e capital, visando o abastecimento de mercados diversos.

Diante desse cenário, observa-se que a importância da mandioca está na sua utilização como fonte de alimento e também como atividade econômica. A fécula, por exemplo, tem grande importância na economia do Brasil, já que é utilizada como matéria prima para inúmeros produtos utilizados na indústria alimentícia, têxtil, petrolífera, plástica e siderúrgica, entre outras (Cappelletti et al., 2011).

3.1.2 A Cultura da Mandioca em Alagoas

Segundo Silva (2009), o cultivo da mandioca em Alagoas utiliza métodos tradicionais e mão-de-obra familiar. No geral, o plantio é feito em consórcio com outras culturas, como o milho, o feijão, o fumo e, com menos frequência, com a batata.

O cultivo da mandioca vem ganhando relevância no Estado e, desde 2006, essa cultura vem ocupando a posição da segunda maior safra agrícola do Estado (190.684 toneladas), perdendo apenas para cana-de-açúcar (23.497.027 toneladas). Em 2017, a produção da mandioca foi de 303.957 toneladas, enquanto que a cana-de-açúcar foi de 14.968.691 toneladas (IBGE, 2018). Um crescimento de 59% da produção de mandioca, enquanto que a produção de cana-de-açúcar apresentou queda de 36% entre 2006 e 2017.

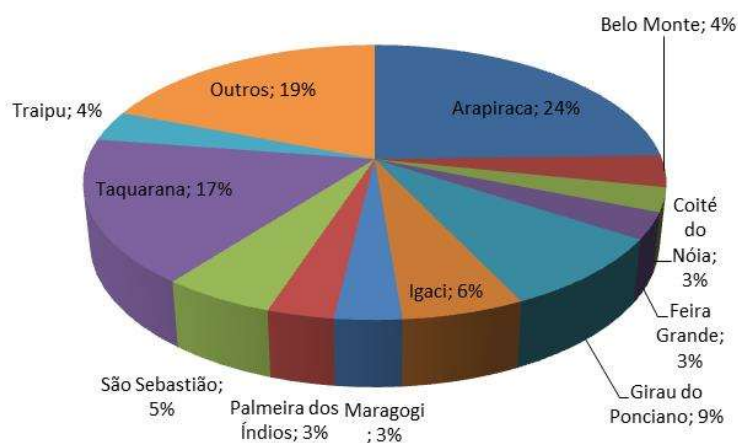
Dentre os municípios que mais contribuem com a produção de mandioca no Estado, estão os municípios de Arapiraca e Taquarana, que são responsáveis por 24 e 17%, respectivamente, da produção no Estado (IBGE, 2014). A participação dos municípios de Alagoas na produção de mandioca pode ser observada na Figura 1.

3.1.3 O Processamento da Mandioca

O processamento da mandioca se dá em diferentes estágios, dependendo do produto fim que se deseja obter. Nas casas de farinha, a mandioca é convertida em farinha e, nas fecularias, em fécula e amido, ou ainda em polvilho (por fermentação da fécula) (Lamaison, 2009).

Segundo Del Bianchi e Cereda (1999), a farinha é o principal produto derivado da mandioca no Brasil, com aproximadamente 60% da produção de mandioca sendo destinada à produção de farinha e o restante é utilizado na alimentação humana e animal, e na produção de amido. Portella (2015) afirma que o rendimento médio do aproveitamento das raízes de mandioca para produção de farinha é de 25 a 30%.

Figura 1 – Participação percentual dos principais municípios na produção de mandioca em Alagoas, 2013.



Fonte: Adaptado do IBGE, 2013.

Para Dias e Leonel (2005) o número de casas de farinha existentes no Brasil é difícil de ser determinado, principalmente pela grande quantidade de indústrias de pequeno porte (casas de farinha comunitárias ou privadas, que produzem entre 6 a 10 sacas de farinha por dia) que muitas vezes funcionam de forma sazonal. Segundo os autores, estima-se que apenas no Estado do Paraná existam mais de 250 farinheiras concentradas na região de Paranaíba.

Dados da Relação Anual de Informações Sociais (RAIS) apontam que, no ano de 2014, existiam 355 estabelecimentos de farinha de mandioca e derivados. Porém, apenas 14 desses estabelecimentos possuíam 100 empregados ou mais e estariam concentrados nos Estados do Rio Grande do Norte, no Paraná e em São Paulo (Conab, 2016).

Em Alagoas, o processamento da mandioca é feito tanto de forma artesanal quanto de forma mecanizada. No caso das casas de farinha tradicionais são utilizados métodos artesanais de processamento da mandioca. Geralmente, essas casas de farinha tradicionais funcionam de modo intermitente, de acordo com a produção local. Já em regiões de maior produção, são encontradas casas de farinha mecanizadas, mais

precisamente nas etapas de trituração, prensagem e torração da farinha, porém é comum o uso de fornos à lenha (SEBRAE, 2005).

3.1.4 A Manipueira

No processamento da mandioca há produção de alguns resíduos de elevado impacto ambiental. A água extraída na prensagem da massa da raiz moída, conhecida como manipueira, é o principal resíduo líquido resultante do processamento da mandioca (Wosiacki e Cereda, 2002).

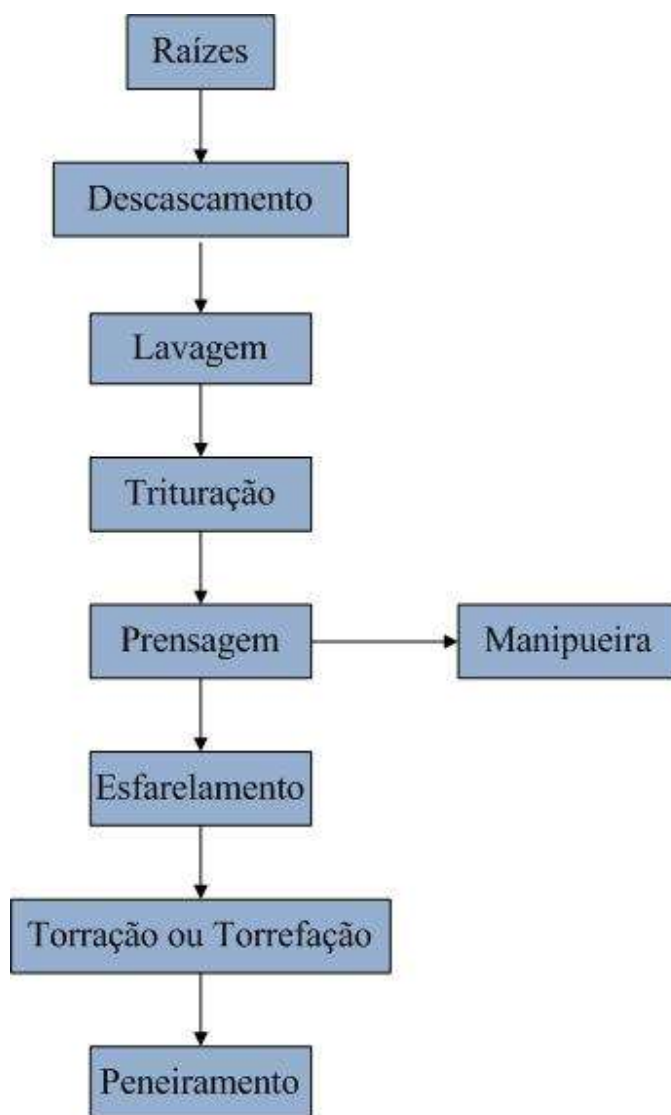
Um estudo realizado por Araújo et al. (2014) numa casa de farinha indentificou os resíduos sólidos (cascas com cepa e crueiras) e líquidos (efluente do lavador dessacador e manipueira) gerados durante o processamento da mandioca. Os autores observaram que durante o processamento de aproximadamente 7 toneladas de mandioca (produção semanal da casa de farinha) houve geração em média de 545,30 kg de cascas com cepas, 111,30 kg de crueira (pedaços de fibras e entrecascas das raízes de mandioca), 2,41 m³ de efluentes de lavagem das raízes e 1,95 m³ de manipueira. Ou seja, a produção de manipueira foi de 279,1 L/ton de raízes processadas. Considerando que aproximadamente 12 milhões de toneladas de mandioca é utilizada anualmente no Brasil para a produção de farinha (60% da produção nacional, segundo Del Bianchi e Cereda, 1999) com uma, estima-se que um volume considerável de manipueira é produzido.

A Figura 2 apresenta as etapas do processamento da mandioca numa casa de farinha.

A manipueira tem o mesmo conteúdo líquido solúvel da raiz, contendo de 20 a 40 g/L de carboidratos. Apesar do seu conteúdo energético, a manipueira, na maioria das vezes, é descartada em correntes de água sem qualquer aproveitamento econômico, outras vezes ela é aproveitada para fertilização do solo. Porém, o descarte da manipueira sem prévio tratamento é considerado um fator de preocupação ambiental e legal por conta de sua elevada concentração de carboidratos que pode resultar no esgotamento

do oxigênio em ambientes aquáticos, prejudicando os animais que vivem nesse ecossistema (Wosiacki e Cereda, 2002).

Figura 2 – Fluxograma do processamento da farinha de mandioca.



Fonte: Autora, 2018.

Segundo Silva (2009), o potencial poluidor da manipueira provém da elevada concentração de matéria orgânica. O autor afirma que a concentração em termos de DQO da manipueira gerada em casa de farinha está entre 60 e 100 g O₂/L.

A presença de cianeto na manipueira também favorece seu elevado impacto ambiental. A concentração de cianeto total na manipueira é de aproximadamente 400 mg/L, com 50% de cianeto livre (Cereda et al., 2001). Gijzen et al. (2000) apotaram o potencial do tratamento anaeróbio na remoção de DQO de águas residuárias contendo cianeto e sugeriram a aplicação do tratamento anaeróbio especificamente visando a remoção de cianeto em águas residuárias. Para os autores os microrganismos anaeróbios podem se adaptar ao meio se tornando mais tolerantes à presença de cianeto.

Dessa forma, o tratamento biológico é uma opção adequada para manipueira. Além disso, o biogás produzido é muito semelhante ao gás natural, sendo considerado uma boa alternativa para a tecnologia de reforma a vapor. A utilização da manipueira para produção do biogás reduz a liberação de metano na atmosfera e produz fertilizantes ricos em nutrientes como subproduto (Madeira et al., 2017).

Devido ao potencial poluidor da manipueira, estudos com o intuito de controlar o impacto ambiental provocado pelo descarte desse resíduo vêm sendo cada vez mais difundidos.

Silva (2009) investigou o uso de um reator anaeróbio horizontal com chicanas (RAHC) no tratamento da manipueira, utilizando conchas de sururu para a correção do pH. O autor analisou três diluições da manipueira: 5%, 10% e 20%, correspondendo a concentrações em termos de DQO de 2,20, 5,87 e 12,38 g O₂/L e carga orgânica volumétrica de 1,93, 2,93 e 6,2 kg DQO/m³d, respectivamente. Os melhores resultados na remoção da demanda química de oxigênio (DQO), de até 95%, quando o sistema foi operado com 5% e 10% de manipueira. Para o autor, a diluição de manipueira a 20% provocou sobrecarga no sistema, resultando em queda significativa da eficiência (17% de remoção de DQO).

A necessidade de diluição da manipueira para obter maiores eficiência de remoção da matéria orgânica a partir do tratamento anaeróbio pode ser um problema pelo uso de

água potável. Porém, como observado no trabalho de Araújo et al. (2014), um grande volume de água é utilizado nas casas de farinha na etapa de descascamento e lavagem da mandioca (344,3 L/toneladas). A água de lavagem resultante dessa etapa é descartada, mas poderia ser aproveitada na diluição da manipueira no caso de requerimento de diminuição da carga orgânica.

Uma maneira de minimizar o impacto ambiental do descarte da manipueira é fazendo o seu aproveitamento como biofertilizante (Cardoso, 2005), como pesticida (Gonzaga et al., 2008) e na fermentação anaeróbia em fases separadas para produção do biogás que pode ser utilizado em substituição parcial ou total da lenha usada na secagem da farinha de mandioca, no caso de indústrias de médio e grande porte (Cappelletti et al., 2011).

Na culinária, a manipueira pode ser aproveitada na confecção de molhos de pimenta e de tucupi (prato típico do Estado do Pará). No Maranhão, a manipueira é matéria-prima para fabricação de uma bebida típica do Estado, a tiquira (Silva, 2009).

A utilização de resíduos orgânicos para a produção de hidrogênio favorece o meio ambiente e produz uma fonte de energia limpa. A manipueira vem sendo cada vez mais objeto de pesquisas nesse sentido, por ser um substrato rico em carboidratos, de baixo custo, renovável e abundante no setor agrícola (Cappelletti et al., 2011).

3.2 O HIDROGÊNIO COMO FONTE DE ENERGIA

O hidrogênio é considerado um combustível limpo, pois produz apenas energia e vapor d'água durante sua combustão. Seu poder calorífico é de aproximadamente 122 kJ/g, que é aproximadamente 2,75 vezes maior do que o poder calorífico dos combustíveis fósseis, sendo considerado uma opção atrativa às fontes de energia convencionais (Kapdan e Kargi, 2006).

A maior parte do hidrogênio produzido é utilizada nas indústrias de processamento de alimentos, metalúrgica, petroquímica e eletrônica. As principais barreiras que afetam a

viabilidade econômica da produção de hidrogênio é a sua indisponibilidade na natureza e seu processo de produção caro (Hosseini et al., 2015).

Atualmente, a produção de hidrogênio a partir de combustíveis fósseis supre aproximadamente 95% da demanda mundial de hidrogênio. Enquanto o hidrogênio produzido a partir da biomassa é responsável apenas por 1% da demanda mundial (Das et al., 2008). Porém, o biohidrogênio possui produção mais barata, é ambientalmente amigável e é renovável (Zhi e Wang, 2014).

A produção biológica de hidrogênio pode ser realizada pelos processos de biofotólise, fermentação ou fotodecomposição. O processo fermentativo possui as vantagens de poder utilizar vários tipos de matéria orgânica, apresentar um período de fermentação mais curto e maior taxa de produção de hidrogênio (Khan et al., 2016, Alibardi e Cossu, 2015).

3.3 PRODUÇÃO FERMENTATIVA DO HIDROGÊNIO

A produção fermentativa de hidrogênio se dá a partir da ação de microrganismos anaeróbios, cultivados na ausência de luz a partir de substrato rico em carboidratos (Harper e Pohland, 1986). Para viabilizar a produção fermentativa de hidrogênio, além de uma elevada concentração de carboidratos, o substrato utilizado deve ser biodegradável, disponível em quantidade suficiente e possuir baixo custo (Kapdan e Kargi, 2006; Levin et al., 2007).

Para Turner et al. (2008), o potencial de uso da fermentação encontra duas grandes barreiras: o alto custo da matéria prima (ao considerar a glicose como substrato ideal) e baixo rendimento de produção de hidrogênio. A utilização de resíduos agroindustriais e resíduos de alimentos ricos em carboidratos minimizam os custos relacionados à aquisição de matéria prima, que é responsável por 75% do custo total da produção de hidrogênio (Turner et al., 2008), ao mesmo tempo em que o potencial poluidor desses resíduos é minimizado.

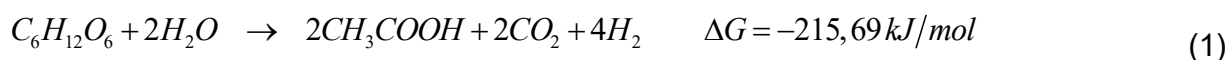
Dentre as vantagens do processo fermentativo de obtenção de hidrogênio estão: a possibilidade de produção contínua, já que não necessita da presença de luz, o que permite a operação contínua do reator; a alta velocidade de reação e a facilidade da reprodução de bactérias fermentativas para suprir o meio de produção (Nicodemos et al., 2008) e produção de metabólitos secundários com potencial de agregação de valor (Das e Veziroglu, 2001).

3.3.1 Rotas fermentativas

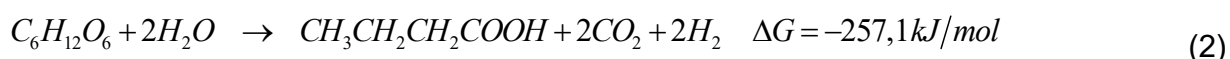
O processo de digestão anaeróbia pode ser descrito como um conjunto de reações ocorrendo simultaneamente através da ação microbiana e compreende cinco etapas principais: hidrólise, acidogênese, acetogênese, sulfetogênese e metanogênese (McCarty, 1964). É na fase acidogênica que ocorre a produção de hidrogênio. Portanto, o processo de digestão anaeróbia deve ser interrompido nessa fase para que não haja consumo do hidrogênio produzido durante a acidogênese, nas fases de acetogênese e metanogênese (Shida et al., 2008).

Na fase acidogênica ocorre conversão de resíduos orgânicos complexos em compostos biodegradáveis. O ácido acético (Equação 1) e o ácido butírico (Equação 2) são os principais metabólitos da acidogênese, sendo considerados indicadores da produção de hidrogênio, já que a produção desses ácidos leva a formação de hidrogênio (Reis e Silva, 2011).

Produção do ácido acético:



Produção do ácido butírico:



A razão entre a produção de ácido acético e ácido butírico é considerado um indicador da produção de hidrogênio. Como a formação do ácido acético produz mais

hidrogênio (até 4 mol H_2 /mol glicose) do que a formação do ácido butírico (até 2 mol H_2 /mol glicose) pode-se concluir que quanto maior for a razão entre as quantidades desses dois ácidos produzidas, maior será a quantidade de hidrogênio gerada (Reis e Silva, 2011).

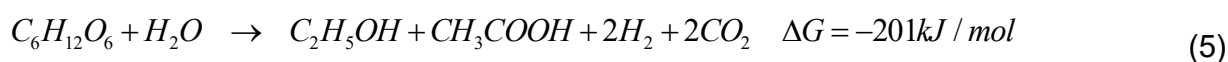
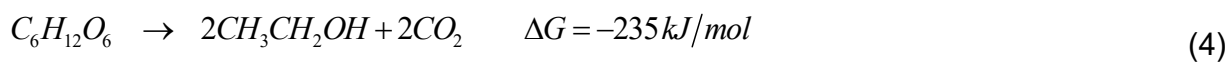
A produção de outros metabólitos tais como o etanol e o ácido propiônico, deve ser evitada na fase acidogênica, pois estes são compostos cuja produção influencia a eficiência da produção de hidrogênio. Na formação de ácido propiônico (Equação 3), por exemplo, há consumo de 2 mols de hidrogênio. Já a formação do etanol (Equação 4) a partir da glicose não consome hidrogênio diretamente, porém consome o substrato que poderia ser utilizado na formação de hidrogênio (Reis e Silva, 2011).

Apesar da competição e do possível efeito inibitório sobre a produção de hidrogênio causado durante a produção do etanol, podem ocorrer outras rotas de produção de hidrogênio, que dependem de alguns fatores como tipos de cultura microbiana, substrato, reator, carga orgânica, entre outros fatores que influenciam no direcionamento da produção dos metabólitos (Reis e Silva, 2011). Zhu et al. (2009) apresentaram algumas possíveis rotas de produção de hidrogênio e, em uma delas, haveria produção simultânea de etanol e hidrogênio, isto é, sem comprometimento da produção de hidrogênio (Equação 5).

Produção do ácido propiônico:



Produção do etanol:



3.3.2 Parâmetros que influenciam a produção de Hidrogênio

Na produção biológica de hidrogênio alguns parâmetros devem ser observados. Alguns deles estão listados a seguir.

3.3.2.1 pH

O pH tem grande importância na produção fermentativa de hidrogênio já que ele pode influenciar a ação da hidrogenase, bem como na rota metabólica e hidrólise do substrato (De Gioannis et al., 2013). Além disso, variações no pH podem provocar mudança de população microbiana, morfologia e estrutura celular (Lin et al., 2012).

Segundo De Gioannis et al. (2013), estudos onde o pH inicial é ajustado, sem controle ao longo do experimento, podem sofrer influência de fatores, como por exemplo a composição e a capacidade tampão do substrato e tipo de inóculo, que podem determinar a via metabólica predominante e a evolução do pH durante o processo, determinando diferentes taxas e rendimentos de produção de hidrogênio.

Lay et al. (2013) avaliaram o pH inicial (4,0-8,0) na produção de hidrogênio e etanol a partir da água residual do processamento de tofu. Os resultados mostraram que o pH entre a faixa de 5,5 a 6,0 como o ótimo para a produção de hidrogênio, alcançando o rendimento de 107,5 mL H₂/g DQO e teor médio de hidrogênio de 41 e 44% a 35 °C, respectivamente. Os autores observaram a produção de metano de 228 e 231 mL e teor de metano de 36 e 38% quando aplicados os pH iniciais de 7,5 e 8,0, respectivamente. A maior produção de etanol foi observada quando aplicado o pH inicial de 5,5 (2181 g DQO/L, 18% dos metabólitos solúveis produzidos).

O efeito do pH inicial na produção de hidrogênio também foi observado por Phowan e Danvirutai (2014). Os autores utilizaram polpa de mandioca hidrolisada como substrato e aplicaram uma variação de pH entre 5,0 e 8,0. Em todas as condições foi observado uma redução no pH final (variando entre 4,1-4,6), porém houve variação no rendimento da produção de hidrogênio. O rendimento da produção de hidrogênio (HY)

máximo foi observado quando aplicado o pH inicial de 5,5 (285,6 mL H₂/g DQO_{removida}), enquanto que para o pH inicial de 8,0 os autores obtiveram o menor valor de HY (111,4 mL H₂/g DQO_{removida}). Os autores sugerem que o pH inicial ideal para produção de hidrogênio depende de outros fatores que também influenciam a produção de hidrogênio, como o tipo de inóculo e de substrato, por exemplo. Foi detectada a predominância do ácido butírico dentre os metabólitos produzidos, indicando que a produção de hidrogênio foi favorecida pela rota fermentativa desse metabólito.

Vasmara e Marchetti (2017) avaliaram a influência do pH inicial (4-10) na produção de hidrogênio a partir de soro de queijo parcialmente desproteinizado, proveniente da produção de ricota. O pH final foi de aproximadamente 4,3 em todas as condições aplicadas. O maior valor de HY foi observado quando aplicado pH inicial igual a 8 (HY_{máx} = 1,81 mol H₂/mol lactose). Os autores concluíram que a produção de hidrogênio é favorecida em pH ácido, mas o uso de pH inicial alcalino resultou em aumento da produção global de hidrogênio quando utilizado substrato rico em lactose.

Sunyoto et al. (2017) utilizaram resíduos de alimentos na produção de hidrogênio em reatores em batelada a partir de três pH iniciais (4, 6 e 8). Os resultados indicaram que o pH afetou tanto a produção volumétrica de hidrogênio (HPR) quanto o HY, além do tempo de adaptação microbiana. O melhor desempenho na produção de hidrogênio foi obtido quando aplicado o pH inicial igual a 6 (HPR = 651 ± 7 mL H₂/L d e HY = 1044 ± 19 mL H₂/L, respectivamente). Os autores observaram que culturas submetidas ao maior pH inicial (pH = 8) atingiram a produção máxima no primeiro dia de incubação. Enquanto que a adoção de pH inicial mais baixo (4 e 6) resultou em aumento da fase *lag*, indicando que nessa condição a cultura microbiana exigiu mais tempo para adaptação.

Fuess et al. (2015) afirmaram que o pH é um fator chave para produção contínua de hidrogênio com alto rendimento. Os autores avaliaram a produção de hidrogênio a partir da vinhaça em reator acidogênico contínuo e concluíram que os melhores resultados da produção de hidrogênio foram observados para os valores de pH do efluente na faixa de 5,1 a 5,2 (HY = 3,4 ± 0,7 mol H₂/mol carboidrato).

No geral, a produção de hidrogênio aparentemente é favorecida na faixa de pH compreendida entre 5,0 e 6,0 (Phowan e Danvirutai, 2014; Fuess et al., 2015; Sunyoto et

al.; 2017), provavelmente pela inibição que o ambiente ácido promove aos microrganismos metanogênicos (Lay et al., 2013). O ajuste inicial do pH pode resultar em produções de hidrogênio diferentes dependendo do tipo de substrato ou outros fatores operacionais. Para Vasmara e Marchetti (2017), que utilizaram soro de queijo da produção de ricota parcialmente desproteínizado, o pH inicial de 8 foi o mais favorável à produção de hidrogênio, enquanto que para Sunyoto et al. (2017), que utilizaram resíduos de alimentos, o pH inicial ideal foi de 6.

3.3.2.2 Concentração e tipo de Substrato

Existem alguns critérios que devem ser obedecidos para que o substrato seja considerado adequado para ser utilizado na produção de hidrogênio. São eles: ser rico em carboidratos, ser produzido a partir de recursos renováveis, estar em concentração suficiente para que a fermentação e a recuperação da energia sejam energeticamente favoráveis e que, no caso de algum tratamento prévio ser necessário, este seja de baixo custo (Lamaison, 2009).

Resíduos e efluentes ricos em carboidratos gerados por alguns processos industriais e agroindustriais, tais como os efluentes da indústria de laticínios (Vasmara e Marchetti, 2017), a manipueira (Lamaison, 2009; Cappelletti et al., 2011; Amorim et al., 2014; Rosa et al., 2016), efluente do processamento de tofu (Lay et al., 2013), etc, possuem potencial como substrato e possibilita a redução de até 75% do custo total da produção de hidrogênio (Turner et al., 2008).

Apesar da dificuldade na utilização de resíduos reais, já que suas características podem variar bastante dependendo do processo no qual são gerados, estes são atrativos pelo baixo custo e vasta disponibilidade. O pré-tratamento do substrato também pode ser adotado para viabilizar ou potencializar a utilização de resíduos mais complexos.

Phowan e Danvirutai (2014) adotaram pré-tratamento ácido do substrato. A polpa de mandioca foi hidrolisada em autoclave a 121°C utilizando diferentes concentrações de H₂SO₄ (0,25; 0,5; 1; 2; 3; 4 e 5% v/v) e tempos de reação (15, 30, 60, 90 e 120 minutos).

As condições ótimas obtidas foram 0,5% de H_2SO_4 na proporção de 1:15 (peso seco: volume) durante 30 min, resultando no rendimento máximo de concentração total de açúcar de 27,4 g de glicose/L.

Eker e Sarp (2017) também utilizaram pré-tratamento ácido na hidrólise de resíduos de fábrica de papel. Inicialmente, o pH da mistura de papel foi ajustado com ácido sulfúrico para 2,2, a hidrólise ácida foi realizada em autoclave a 121°C por 90 minutos e, posteriormente, a mistura foi filtrada. Como resultado, os autores alcançaram uma concentração total de açúcar de cerca de 30 g de glicose/L a partir de uma solução de resíduos de papel de 100 g/L.

Em relação à concentração dos substratos reais, observa-se que, independentemente do tipo de substrato utilizado, a concentração aplicada pode variar de acordo com as condições operacionais aplicadas, tipo de inóculo utilizado, pré-tratamento do inóculo, pH e etc.

Lamaison (2009) e Cappelletti et al. (2011) utilizaram a manipueira como substrato para a produção de hidrogênio. Lamaison (2009) obteve HY de 1,82 mol H_2 /mol glicose quando utilizou a manipueira sem suplemento e concentração inicial de substrato entre 2,3 e 3,2 g DQO/L. Cappelletti et al. (2011) observaram que as menores concentrações de substrato (entre 5-10 g DQO/L) aplicadas em seu estudo resultaram em maiores rendimentos, alcançando um rendimento máximo de 2,41 mol H_2 /mol glicose quando a concentração da manipueira foi de 5 g DQO/L.

Phowan e Danvirutai (2014) utilizaram polpa de mandioca hidrolisada em várias concentrações (variando de 5-40 g DQO/L) e alcançaram o maior rendimento (342 mL H_2 /g DQO_{removida}) e produção volumétrica de hidrogênio (3381 mL H_2 /L d) quando aplicada a concentração de 25 g DQO/L.

Como são vários os fatores que influenciam a produção de hidrogênio, é interessante buscar condições que favoreçam a utilização de substratos reais brutos ou em concentrações que exijam o mínimo de diluição para evitar a utilização de água limpa. A utilização de co-substratos também é uma opção interessante, que vem sendo estudada.

Rosales-Colunga et al. (2012) conseguiram aumentar o HY em 240% (de 0,30 para 1,02 mol H₂/mol hexose) ao utilizar a co-digestão da glicose com a galactose em relação à glicose sozinha. Além disso, a mistura dos dois substratos resultou na maior taxa máxima de produção de hidrogênio (24,45 mL/L h) dentre as condições avaliadas.

Wang et al. (2013) avaliaram a influência de diversos co-substratos (lodo de manipueira, estrume de porco, estrume de vaca e resíduo de lodo ativado) na produção de hidrogênio a partir da manipueira e concluíram que a utilização de co-substratos promoveu melhor hidrólise e acidificação do que a manipueira sozinha. O máximo rendimento da utilização de co-substrato foi 46% superior ao da manipueira isoladamente.

Marone et al. (2015) avaliaram várias proporções de lodo de búfalo, soro de queijo e glicerol bruto na composição do substrato para produção de hidrogênio. Os autores observaram que a melhor composição de substrato foi composta por 33% e 66% de lodo de búfalo e soro de queijo, respectivamente, alcançando o rendimento máximo de 117 mL H₂/g SV_{adicionado}.

A utilização de resíduos como substrato na produção de hidrogênio resulta em benefícios econômico e ambiental. Porém, como visto anteriormente, a produção de hidrogênio depende de vários fatores e a viabilidade do uso desses resíduos deve ser avaliada através do desenvolvimento de condições operacionais que resultem em ganho energético e ambiental.

3.3.2.3 Temperatura

A temperatura influencia o comportamento das bactérias produtoras de hidrogênio, já que altera a atividade de enzimas essenciais, como as hidrogenases, que são os biocatalizadores mais importantes para a formação de hidrogênio (Kumar et al., 2015). Grande parte das tecnologias de produção de biohidrogênio pode ser operada sob diferentes regimes de temperaturas. A maioria dos trabalhos visando a produção de hidrogênio por culturas mistas foram realizados principalmente sob condições mesofílicas

(20-40 °C) e termofílicas (50-60 °C), enquanto que condições extremamente termofílica (65-75 °C) são menos adotadas na produção de hidrogênio (Lin et al., 2012).

Mäkinen et al. (2012) avaliaram o aumento da temperatura (de 37 para 45 °C) na produção de hidrogênio a partir da xylose em reator anaeróbio com agitação contínua. Os autores observaram um aumento de 1,7 e 4,3 vezes do HY (de 1,18 para 1,97 mol H₂/mol xilose) e da taxa de produção de hidrogênio (de 1,7 para 7,3 mmol H₂/h/L), respectivamente, quando a temperatura passou de 37 °C para 45 °C. Na temperatura de 37 °C, as comunidades microbianas consistiam principalmente em espécies do gênero *Clostridium* (6 espécies). *Clostridium butyricum* estava presente apenas no início da operação, enquanto *Clostridium tyrobutyricum* estava presente durante toda a operação na temperatura de 37°C. *Clostridium acetobutylicum* foi a única espécie presente em ambas as temperaturas. Na temperatura de 45 °C, a comunidade microbiana consistia apenas em duas cepas bacterianas afiliadas a *Clostridium acetobutylicum* e *Citrobacter freundii*, responsáveis pela fermentação da xilose em hidrogênio.

Gadow et al. (2012) avaliaram três diferentes temperaturas na produção de hidrogênio a partir da celulose usando cultura mista. As temperaturas foram escolhidas a fim de abranger as faixas mesofílica, termofílica e hiper-termofílica (37 ± 2; 55 ± 2 e 80 ± 2 °C, respectivamente). Os HY máximo observados foram 0,61; 15,2 e 19,02 mmol H₂/g celulose para as temperaturas 37, 55 e 80 °C, respectivamente. A produção de metano foi observada apenas na condição mesofílica (37 °C), atingindo um rendimento de 7,03 mmol CH₄/g celulose e contribuindo para 26% da composição do biogás. Isso pode ter ocorrido pelo fato do inóculo utilizado não ter sido submetido a nenhum pré-tratamento a fim de inibir a atividade dos microrganismos metanogênicos consumidores de hidrogênio. Os resultados indicaram que as faixas termofílica e hipertermofílica foram as mais indicadas dentre as avaliadas, já que resultaram em inibição da produção de metano e, conseqüentemente, melhor desempenho da produção de hidrogênio.

Kargi et al. (2012) avaliaram as faixas mesofílicas e termofílicas (35 e 55 °C, respectivamente) na produção de hidrogênio a partir do soro de queijo em pó. Os melhores resultados da produção de hidrogênio foram observados na condição termofílica, com maior HY (111 mL H₂/g lactose), maior taxa de produção de hidrogênio

(3,46 mL H₂/L h) e maior taxa de produção específica de hidrogênio (2,10 mL H₂/g de células h). Porém, a fermentação termofílica resultou numa fase de adaptação maior (λ = 136,4 h) em relação à fermentação mesofílica (λ = 4,29 h). Os autores justificam esse comportamento pelo fato de a cultura original utilizada nos experimentos ser proveniente de uma estação de tratamento de efluentes operada em temperatura mesofílica (35 °C). Enquanto que os resultados superiores da produção de hidrogênio obtidos na fermentação termofílica foram provavelmente decorrentes da eliminação dos microrganismos consumidores de hidrogênio e seleção das bactérias produtoras de hidrogênio.

Sattar et al. (2016) avaliaram o efeito da temperatura (37 e 55 °C) na produção de hidrogênio a partir de diversos resíduos resultantes da colheita de arroz, tais como palha de arroz, casca de arroz e farelo de arroz, além de restos de arroz produzidos em cantinas. O aumento da temperatura de 37 para 55 °C resultou num aumento do rendimento de hidrogênio de 9,34%, 31,31% e 23,51% para os experimentos que utilizaram palha, casca e farelo de arroz, respectivamente. Embora o maior HY de 40,04 mL H₂/SV_{removidos} tenha sido produzido a partir de palha de arroz em condições termofílicas, a maior taxa máxima de produção de hidrogênio (R_m = 97,08 mL H₂/h) foi observada a partir de farelo de arroz também em condições termofílicas, com HY de 38,6 mL H₂/SV_{removidos}. O aumento da temperatura nos experimentos que utilizaram restos de arroz resultou em comportamento diferente em relação aos demais resíduos, com redução do rendimento de hidrogênio, do potencial máximo de produção de hidrogênio e da taxa máxima de produção de hidrogênio em 25,81%, 44,15% e 24,70%, respectivamente. Os autores afirmam que o aumento da temperatura tem um efeito negativo na produção de hidrogênio quando o substrato possui concentrações elevadas de carboidratos, como é o caso do restos de arroz.

Para Sivagurunathan et al. (2016), o aumento da temperatura poderia melhorar o desempenho da fermentação de hidrogênio, promovendo a hidrólise, diminuindo a solubilidade do hidrogênio no caldo e limitando a atividade dos microrganismos não-produtores de hidrogênio, que são sensíveis à temperatura mais elevadas. Porém, os autores alertam que a adoção da temperatura de operação deve levar em consideração

se o aumento da produção de hidrogênio compensa o investimento em energia para o aquecimento do sistema.

Lin et al. (2012) destacam a importância do desenvolvimento de sistemas que sejam operados à temperatura baixa o suficiente para permitir um ganho positivo de energia ao mesmo tempo que garanta segurança durante a manutenção e monitoramento do sistema.

Apesar da maioria dos trabalhos obter melhores resultados para a produção de hidrogênio ao aplicar faixa de temperatura termofílica, deve-se fazer um balanço entre a energia necessária para o aquecimento do sistema e a energia produzida. Por exemplo, os resultados de Gadow et al. (2012) demonstram um aumento de 25% no HY ao aumentar a temperatura de 55 para 80 °C, mas apontaram a inviabilidade de operação do sistema na faixa hiper-termofílica (80 °C). No geral, pode-se observar que temperaturas maiores favorecem o aumento do rendimento da produção de hidrogênio (Mäkinen et al., 2012; Gadow et al., 2012; Kargi et al., 2012; Sattar et al., 2016), porém o aumento da temperatura também pode resultar em desvantagens para alguns parâmetros, como o aumento da fase *lag* (Kargi et al., 2012) e diminuição da taxa máxima de produção de hidrogênio (Sattar et al., 2016), além de que o aumento da temperatura pode não ser ideal para todos os tipos de substrato, como observado por Sattar et al. (2016), que observaram melhor HY na faixa mesofílica (37 °C) quando utilizaram restos de arroz produzidos em cantina como substrato.

3.3.2.4 Tipo e pré-tratamento do Inóculo

A produção fermentativa de hidrogênio pode ser obtida a partir de culturas puras ou culturas mistas. A utilização de culturas puras possui inúmeras desvantagens. Além de não ser rentável, está associada com muitos problemas técnicos, tais como a exigência de condições estéreis e rigoroso controle das condições ambientais (Argun e Kargi, 2009) e muitos microrganismos de cultura pura podem não metabolizar uma variedade de substratos, tais como amido e celulose (Chaganti et al., 2012).

Já a adoção de culturas mistas promove o aumento do rendimento de hidrogênio e possibilita a utilização de uma maior diversidade de substratos, inclusive os substratos a base de amido e celulose (Argun e Kargi, 2009). Entretanto, comunidades microbianas anaeróbias mistas podem conter microrganismos não produtores de hidrogênio, como bactérias produtoras de ácido láctico, e populações consumidoras de hidrogênio, como os microrganismos homoacetogênicos, metanogênicos hidrogenotróficos e redutores de sulfato (Valdez-Vazquez e Poggi-Varaldo, 2009).

Para garantir um processo eficiente de produção de hidrogênio a partir de consórcios microbianos mistos, alguns métodos podem ser adotados para inibir a atividade de bactérias que consomem ou que não produzem hidrogênio. Esses métodos partem do princípio que as bactérias produtoras de hidrogênio possuem maior chance de sobreviver que outros microrganismos de uma cultura mista, quando submetidas a condições severas devido à sua capacidade de esporular, se tornando ativas quando as condições ambientais voltam a ser adequadas (De Gioannis et al., 2013).

Os principais métodos que atuam sobre esta seleção microbiana são: pré-tratamento com choque térmico, pré-tratamento ácido, aeração, congelamento e descongelamento, bem como a adição de compostos químicos específicos (2-bromoetanosulfonato de sódio, ácido 2-bromoetanosulfônico, etileno, etano, cloreto de metilo, fluoreto de metilo, clorofórmio, acetileno, dentre outros) (De Gioannis et al., 2013).

Phowan e Danvirutai (2014) investigaram três tipos de inóculo: lodo anaeróbio de um tanque de sedimentação de uma destilaria (MC-1), lodo granular de um reator UASB de uma cervejaria (MC-2) e lodo granular de um reator UASB de uma indústria de amido (MC-3), na produção de hidrogênio a partir da polpa de mandioca hidrolisada. Os inóculos foram pré-tratados termicamente. Os resultados indicaram que o lodo MC-2 apresentou melhor desempenho em termos de produção de hidrogênio, produção volumétrica de hidrogênio e rendimento de hidrogênio (350 mL, 3812 mL H₂/L d e 334 mL H₂/g DQO_{removido}, respectivamente).

Favaro et al. (2013) avaliaram a influência do inóculo na produção de hidrogênio a partir da fracção orgânica dos resíduos sólidos urbanos usando lodo granular de reator UASB tratando efluente de uma cervejaria. O lodo foi submetido a pré-tratamento térmico.

Os autores observaram pouca diferença na produção de hidrogênio usando inóculo e não usando inóculo. A maior diferença foi no tempo de latência que não foi observado nos experimentos com adição de inóculo e apresentou atraso de 6 dias para o início da produção de hidrogênio quando o inóculo não foi utilizado.

Penteado et al. (2013) avaliaram o desempenho da autofermentação em relação ao lodo de reator UASB tratando resíduos de abatedouro de aves e lodo anaeróbio de reator UASB tratando resíduos de suinicultura. Os inóculos foram submetidos a tratamento térmico e adição de ácido para suprimir a metanogênese. A autofermentação apresentou rendimento compatível com o lodo de reator UASB tratando resíduos de aves quando o lodo foi pré-tratado (térmico e ácido), indicando que a autofermentação pode ser uma alternativa interessante já que não necessita da etapa de pré-tratamento do inóculo.

Chaganti et al. (2012) compararam a produção de hidrogênio a partir de uma cultura mista submetida a diferentes pré-tratamentos (choque térmico, tratamento ácido, tratamento alcalino ou adição de ácido linoleico). A adoção do pré-tratamento do inóculo resultou em um aumento entre 1,8 e 2,2 vezes do HY em relação ao experimento controle (sem pré-tratamento do inóculo). O rendimento de hidrogênio foi estatisticamente igual ($\alpha = 0,05$) para todos os pré-tratamentos adotados. Houve produção de metano apenas quando adotado o tratamento alcalino (0,1 mol CH_4 /mol glicose) e no experimento controle (0,4 mol CH_4 /mol glicose). Os autores concluíram que os métodos adotados foram eficazes para aumentar o HY. O tratamento alcalino foi o único que não inibiu a metanogênese completamente.

Cisneros-Perez et al. (2015) testaram o choque térmico e lavagem seletiva do lodo em reator contínuo, operado a 37°C, TDH de 8 h, agitação de 250 rpm e pH de 5,7, na produção de hidrogênio em dois reatores de leito granular expandido. Ambos os pré-tratamentos foram eficazes na prevenção da atividade metanogênica. O pré-tratamento de lavagem seletiva do lodo apresentou melhor desempenho do que o pré-tratamento por choque térmico, atingindo HY máximo de 0,92 mol H_2 /mol hexose e HPR máximo de 4,23 L H_2 /L d. Os autores observaram que o pré-tratamento do inóculo tem um forte efeito

inicial durante os primeiros estágios de fermentação, após o qual as condições operacionais têm maior impacto no desempenho do reator.

Os tipos de inóculo são essenciais para prover o meio com microrganismos que permitam o bom desempenho da produção de hidrogênio. A avaliação do inóculo para determinado substrato ou condição operacional é crucial, devendo ser bem analisada a necessidade de tratamento prévio ou não desse inóculo. O pré-tratamento deve ser adotado de acordo com a eficiência na inibição dos microrganismos consumidores de hidrogênio, ao mesmo tempo que não prejudique o desensolvimento das bactérias produtoras de hidrogênio não-esporulantes (como as enterobactérias) (Lamaison et al., 2015), assim como observando a viabilidade econômica de sua aplicação.

3.3.3 Produção de Hidrogênio em testes em batelada

A Tabela 2 apresenta um resumo de alguns estudos anteriores que avaliaram a produção de hidrogênio em reatores em batelada. Os estudos abordam diversos substratos e os resultados do rendimento de hidrogênio são apresentados a partir de diferentes abordagens (mol H₂/mol glicose, mol H₂/mol lactose, mL H₂/SV_{removidos}, mL H₂/DQO_{removida}, etc). A seguir são apresentados maiores detalhes de cada estudo.

Han et al. (2015) desenvolveram um bioprocesso combinado visando a fermentação de estado sólido e, posteriormente, a produção fermentativa de hidrogênio a partir de resíduos de alimentos. A fermentação de estado sólido foi realizada por *Aspergillus awamori* e *Aspergillus oryzae*, misturando 15 g de resíduos de alimentos com 1 mL de solução de esporos (4 x 10⁶ e 1 x 10⁶ esporos/mL, respectivamente), cultivada em incubadora a 30°C por 4 dias. A massa sólida fermentada foi transferida para um biorreator (a 55°C e 500 rpm) para realizar a hidrólise enzimática. O caldo fermentativo produzido foi centrifugado à 10.000 rpm por 30 minutos e, posteriormente, filtrado por papel de filtro Whatman nº 1, obtendo-se o resíduo de alimentos hidrolisado. Para os autores o bioprocesso combinado poderia acelerar a taxa de hidrólise, melhorar a utilização de matéria-prima e aumentar o rendimento de hidrogênio. Para produção de hidrogênio, o resíduo de alimentos hidrolisado na primeira etapa foi filtrado e lodo

anaeróbio de uma estação de tratamento de águas residuais municipais pré-tratado termicamente foi utilizado como inóculo. Diferentes concentrações iniciais de glicose derivada da hidrólise dos resíduos alimentares foram avaliadas (15,54; 22,89; 29,80 e 36,90 g/L) e resultaram nos seguintes rendimentos 1,51; 1,38; 1,28 e 1,25 mol H₂/mol glicose, respectivamente. Os autores concluíram que o processo proposto poderia ser potencialmente utilizado na produção de hidrogênio a partir de resíduos de alimentos.

Wang et al. (2015) avaliaram a utilização das águas residuais de diversas etapas do processamento do amido de milho visando identificar a melhor relação C/N (6,0; 8,0; 9,1; 10,3 e 15,2) e a concentração inicial do substrato (10, 15 e 20 g/L) para maximizar a produção de hidrogênio. A principal fonte de carbono foi a água residual de glicose gerada quando o leite de amido refinado é parcialmente transformado em glicose, enquanto peptona, NH₄Cl e uma mistura da água residual da infusão do milho com água com glúten de milho gerada a partir do processo de centrifugação do leite de amido de milho foram utilizadas como principal fonte de nitrogênio. Os resultados mostraram que a relação C/N inicial ideal e a concentração total de açúcar foram de 9,1 e 10,0 g/L, respectivamente, com o rendimento máximo de hidrogênio de 1,88 mol H₂/mol de glicose quando utilizada a mistura das águas residuais como fonte de carbono. Para os autores a produção de hidrogênio utilizando águas residuais de mistura de amido de milho resultou em um HY aproximadamente 76% e 32% maior do que com o uso de amido de milho e amido de mandioca, respectivamente. Já a taxa máxima de produção de hidrogênio (R_m) de 165,89 mL/L/h obtida usando águas residuais de mistura de amido de milho como fonte de nitrogênio foi cerca de 21 vezes maior do que quando a peptona foi utilizada como fonte de nitrogênio. Assim, os autores concluíram que a produção de hidrogênio a partir de águas residuais de amido de milho combinado é uma maneira econômica e prática de recuperação de energia e tratamento de águas residuais.

Rosales-Colunga et al. (2012) utilizaram *Escherichia coli* WDHL na produção de hidrogênio a partir da lactose, glicose e galactose. Os resultados indicaram que a produção cinética de hidrogênio e metabólitos, bem como o rendimento de hidrogênio, foram afetados pelo tipo de açúcar utilizado como substrato. Ao utilizar a glicose como substrato, o principal metabólito formado foi o lactato, resultando em produção de hidrogênio e rendimento de 1037 mL e 0,30 mol H₂/mol de glicose, respectivamente. O

maior rendimento da produção de hidrogênio (1,12 mol H_2 /mol galactose) foi observado quando a galactose foi utilizada como substrato, com etanol como rota metabólica predominante, o que pode justificar a menor taxa máxima de produção de hidrogênio nessa condição (13,21 mL H_2 /L h). O HY ao utilizar glicose mais galactose aumentou e foi similar ao rendimento obtido durante a fermentação da lactose sozinha (1,02 mol H_2 /mol hexose). Além disso, a mistura da glicose com a galactose resultou na maior taxa máxima de produção de hidrogênio observada dentre as condições analisadas (24,45 mL H_2 /L h). Os autores destacam a importância de buscar uma maior conformidade entre o rendimento de hidrogênio e a taxa máxima de produção de hidrogênio. Isso porque, segundo os autores, a taxa de produção de hidrogênio é um parâmetro crítico para determinar a aplicação prática em grande escala de processos de fermentação.

Lay et al. (2013) utilizaram a água residual do processamento de tofu na produção de hidrogênio e etanol. Os autores avaliaram a influência do inóculo (lodo anaeróbio coletado em duas estações de tratamento de águas residuais diferentes), dos valores iniciais de pH (4,0-8,0), de duas temperaturas diferentes (35 e 55 °C) e da concentração inicial do substrato (10, 15, 20, 30 e 40 g/L). O efeito do inóculo e da temperatura indicaram que os dois lodos foram capazes de produzir hidrogênio a partir do substrato utilizado, sem geração de metano. O aumento da temperatura não afetou significativamente o rendimento de hidrogênio. A variação do rendimento variou entre 54,8 e 61,2 mL H_2 /g DQO. Enquanto a produção de etanol só foi observada ao utilizar o lodo 1 na temperatura de 55 °C (2842 mg DQO/L, 25% dos metabólitos solúveis produzidos). Em relação ao pH, o maior HY (107,5 mL H_2 /g DQO) foi obtido na faixa de pH inicial compreendida entre 5,5 e 6,0, sem produção de metano. Já a faixa de pH inicial compreendida entre 7,5 e 8,0 favoreceram à produção de metano (228 e 231 mL e teor de metano de 36 e 38%, respectivamente). Enquanto que o pH 5,0 foi o mais favorável à produção de etanol (2181 g DQO/L, 18% dos metabólitos solúveis produzidos). Já o aumento da concentração inicial do substrato de 10 para 20 g DQO/L provocou aumento no rendimento de 20 para 99,2 mL H_2 / g DQO. Em seguida, o rendimento de hidrogênio sofreu uma pequena redução quando a concentração inicial passou para 30 g DQO/L (92,8 mL H_2 / g DQO), porém foi observado a maior concentração do teor de hidrogênio no biogás nessa condição (50,9%). A concentração inicial do substrato de 40 g DQO/L

provocou inibição do rendimento que reduziu para 72,9 mL H₂/ g DQO. Em relação à distribuição dos metabólitos, os autores observaram a predominância da rota do acetato na menor concentração do substrato (10 g DQO/L, HAc = 51% e HBu = 23% dos metabólitos solúveis produzidos), e a predominância da rota do butirato nas maiores concentrações de substrato (15, 20, 30 e 40 g DQO/L, HAc = 20-25% e HBu = 50-58% dos metabólitos solúveis produzidos).

Phowan e Danvirutai (2014) avaliaram o efeito do pH inicial, da concentração da biomassa e do substrato na produção de hidrogênio a partir da polpa de mandioca hidrolisada. O efeito do tipo de inóculo foi investigado a partir da concentração inicial do substrato de 20 g DQO/L e pH inicial fixo em 6,0. Três tipos de inóculo foram analisados: lodo anaeróbio de um tanque de sedimentação de uma destilaria (MC-1), lodo granular de um reator UASB de uma cervejaria (MC-2) e lodo granular de um reator UASB de uma indústria de amido (MC-3). A melhor produção de hidrogênio, produção volumétrica de hidrogênio e rendimento de hidrogênio (350 mL, 3812 mL H₂/L d e 334 mL H₂/g DQO_{removido}, respectivamente) foram obtidas quando o lodo MC-2 foi adotado como inóculo. Para avaliar o efeito do pH inicial na produção de hidrogênio, os autores utilizaram o inóculo MC-2 (2 g/L) e concentração inicial do substrato de 20 g DQO/L, variando o pH entre 5,0 e 8,0. O HY máximo foi observado quando aplicado o pH inicial de 5,5 (285,6 mL H₂/g DQO_{removida}), enquanto que o pH inicial de 8,0 ocorreu o menor HY (111,4 mL H₂/g DQO_{removida}). Já a concentração inicial do substrato foi avaliada (5, 10, 15, 20, 25, 30 e 40 g DQO/L) utilizando o melhor pH inicial (5,5) e o melhor inóculo (MC-2) obtidos nas etapas anteriores. Os autores observaram que o rendimento de hidrogênio aumentou de 207,0 para 342,8 mL H₂/g DQO_{removida} com o aumento da concentração inicial de 5-25 g DQO/L, reduzindo para 207,4 mL H₂/g DQO_{removida} quando a concentração inicial do substrato passou para 40 g DQO/L. Os autores observaram que concentrações iniciais de substrato mais elevadas causam acúmulo de ácidos no sistema e, posteriormente, declínio do pH no meio que provoca aumento da pressão parcial do sistema de fermentação levando à produção de solventes e, conseqüentemente, à inibição dos microrganismos produtores de hidrogênio. Por último, o efeito da concentração inicial da biomassa foi avaliada (0,5-5 g/L) na concentração inicial do substrato de 25 g DQO/L. A produção acumulada de hidrogênio (P) e a taxa de produção

máxima de hidrogênio (R_m) aumentaram quando a concentração inicial de biomassa passou de 0,5 para 3 g/L ($P = 185,6$ e $387,4$ mL, $R_m = 3,45$ e $7,87$ mL/h, respectivamente). O aumento da concentração inicial da biomassa para 5 g/L, promoveu redução no P e R_m (281,3 mL e 5,94 mL/h, respectivamente). Os autores justificam esse comportamento pelo fato de que concentrações mais elevadas de biomassa poderiam afetar a formação de hidrogênio, consumindo-o para a formação de ácido acético pelas bactérias acetogênicas, além da inibição causada pelo acúmulo de ácidos no meio.

Sattar et al. (2016) utilizaram resíduos da colheita de arroz (palha de arroz, a casca de arroz e o farelo de arroz, além de restos de arroz produzidos em cantinas) na produção de hidrogênio em duas temperaturas diferentes (37 e 55 °C). O maior HY (40,04 mL H_2 /SV_{removidos}) foi obtido quando utilizado a palha de arroz, enquanto a maior R_m (97,08 mL H_2 /h) foi alcançada a partir do farelo de arroz, ambos em condições termofílicas (55 °C).

Marone et al. (2015) avaliaram o efeito da co-fermentação do lodo de búfalo com soro de queijo e glicerol bruto usando cultura mista microbiana na produção de hidrogênio. Inicialmente, os autores fizeram a seleção do inóculo a partir de três tipos diferentes: um consórcio microbiano artificial (DC), uma cultura mista microbiana enriquecida nos sedimentos de um lago costeiro hipertrófico (F210) e uma cultura mista microbiana enriquecida com lodo ativado da estação de tratamento de águas residuais (GCL). O substrato utilizado foi uma mistura de 33%, 33% e 33% de lodo de búfalo, soro de queijo e glicerol bruto, atingindo uma concentração final de 20 g SV/L. F210 apresentou o maior HY ($50,4 \pm 3,0$ mL H_2 /g SV). Segundo os autores, este inóculo seria o mais "versátil" e menos especializado entre todos os inóculos, resultando numa adaptação mais fácil às condições aplicadas. Num segundo momento, os autores avaliaram a influência da composição do substrato na produção de hidrogênio utilizando o inóculo F210. O melhor HY (117 mL H_2 /g SV_{adicionado}) foi observado quando a composição do substrato foi 33% e 66% de lodo de búfalo e soro de queijo, respectivamente. No geral, o soro de queijo foi o substrato mais adequado para produção de hidrogênio, porém promoveu uma redução brusca no pH (de 6,5 para 4,0). Já o lodo de búfalo apresentou alta capacidade de tamponamento mantendo o pH acima de 6,0. Para os autores, os resultados demonstraram a possibilidade de misturar vários efluentes

em diferentes composições mantendo a produção de hidrogênio num intervalo ótimo, entre 105 e 117 mL H₂/g SV_{adicionado}, facilitando o gerenciamento de sistemas ou processos em que a disponibilidade de substratos pode mudar ao longo do tempo.

Eker e Sarp (2017) analisaram o efeito da concentração inicial do substrato (3,84-45,5 g/L) e biomassa (0,25-2,00 g/L) na produção de hidrogênio a partir resíduos de papel. O maior HY foi de 1,01 mol H₂/mol açúcar quando aplicada a concentração inicial de açúcar de 3,84 g/L. Os autores justificam a diminuição do rendimento de hidrogênio causada pelo aumento da concentração inicial de açúcar devido à inibição causada pelo acúmulo de ácidos voláteis e pela presença de hidroximetilfurfural gerado durante a hidrólise ácida dos resíduos de papel, que causam efeito inibitório sobre microrganismos. Para avaliar o efeito da concentração inicial da biomassa, a concentração inicial de açúcar foi mantida em 18,9 g/L, já que foi obtida a maior taxa de produção de hidrogênio nessa condição (0,51 mL H₂/ g biomassa h). O maior HY foi obtido quando aplicada a concentração inicial de biomassa de 0,25 g/L (0,34 mol H₂/mol açúcar). Os autores concluíram que menores concentrações iniciais de biomassa (0,25-0,5 g/L) e de açúcar (< 20 g/L) são mais favoráveis à produção de hidrogênio a partir de resíduos de papel.

Vasmara e Marchetti (2017) utilizaram soro de queijo da produção de ricota parcialmente desproteinizado na produção de hidrogênio a partir de diferentes pH iniciais (4-10). O pH inicial de 8, resultou no maior HY (HY_{máx} = 1,81 mol H₂/mol lactose) para este tipo de substrato.

Os resultados demonstram que a produção de hidrogênio depende de vários fatores e que a avaliação de diferentes condições operacionais é necessária para otimizar a produção de hidrogênio.

Tabela 2 – Resumo de estudos anteriores que avaliaram a produção de hidrogênio em testes em batelada.

Referência	Temperatura	Substrato Concentração	Inóculo	pH	HY HPR*
Rosales-Colunga et al. (2012)	37 °C	Açúcares (lactose, glicose e galactose) 15 g/L	<i>Escherichia coli</i> WDHL	6,0	0,3-1,12 mol H ₂ /mol hexose 13,21-24,45 mL H ₂ /L h
Lay et al. (2013)	35 e 55 °C	Efluente do processamento de tofu 10-40 g COD/L	Lodo anaeróbico de estação de tratamento de águas residuais	4,0-8,0	29,2-107,5 mL H ₂ /g DQO 0,1-6,6 L H ₂ /L d
Phowan e Danvirutai (2014)	35 °C	Polpa de mandioca hidrolisada 20 g DQO/L	Lodo anaeróbico de um tanque de sedimentação de uma destilaria; Lodo de um reator UASB de uma cervejaria; lodo granular de um reator UASB de uma indústria de amido	5,5	342 mL H ₂ /g DQO _{removida} 3381 mL H ₂ /L.d
Han et al. (2015)	37 °C	Resíduos de alimentos 15,52-36,9 g glicose/L	Lodo anaeróbico de uma estação de tratamento de águas residuais municipais	4,0-4,6	1,25-1,51 mol H ₂ /mol glicose 35,4-92,56 mL H ₂ /h
Marrone et al. (2015)	37 °C	Lodo de búfalo, soro de queijo desproteínizado e glicerol bruto 20 g SV/L	Cultura mista microbiana enriquecida a partir dos sedimentos de um lago costeiro hipertrófico	6,5	2,8-112 mL H ₂ /g SV _{adicionado} 1,17-26,8 mL H ₂ /h
Wang et al. (2016)	35 °C	Água residuária de amido de milho 10, 15 e 20 g/L	Lodo anaeróbico	6,5	1,88 mol H ₂ /mol glicose 165,89 mL H ₂ /L h

Tabela 2 – Resumo de estudos anteriores que avaliaram a produção de hidrogênio em testes em batelada (Continuação).

Referência	Temperatura	Substrato Concentração	Inóculo	pH	HY HPR*
Sattar et al. (2016)	37-55 °C	Resíduos de colheita de arroz	Lodo de um canal de sedimentação	7,0-7,5	23,05-40,04 mL H ₂ /SV _{rem} 24,29-97,08 mL H ₂ /h
Eker e Sarp (2017)	-----	Resíduos de papel (papelão e papel de escritório) 3,84-45,5 g/L	Lodo acidogênico de estação de tratamento anaeróbio	6,8	1,01 mol H ₂ /mol açúcar 0,44-9,85 mL H ₂ /h
Vasmara e Marchetti (2017)	35 °C	Soro de queijo parcialmente desproteinizado da produção de ricota 51 g/L lactose	Lodo de suíno	4-10	0,22-1,81 mol H ₂ /mol lactose 0,078-0,0459 mol H ₂ /mol lactose h

*HPR: Produção Volumétrica de Hidrogênio.

Fonte: Autora, 2018.

3.3.4 Produção de hidrogênio a partir da manipueira

A Tabela 3 apresenta um resumo dos resultados obtidos por alguns trabalhos que utilizaram a manipueira como substrato para produção de hidrogênio.

Tabela 3 – Resumo de resultados obtidos por estudos que avaliaram o uso da manipueira como substrato para produção de hidrogênio

Referência	Reator Temperatura	Concentração Inóculo	TDH pH	HY HPR*
Lamaison (2009)	Reator Anaeróbio de Batelada Sequencial 35°C	2352-3202 mg/L Lodo de reator anaeróbio de fluxo ascendente tratando efluente de suínos	48 h 5,3	0,007-1,82 mol H ₂ /mol glicose 90-224 mL/d
Cappelletti et al. (2011)	Reator Anaeróbio de Batelada Sequencial 36°C	5-30 g/L Cultura pura	----- 7,0	0,60-2,41 mol H ₂ /mol glicose 13,4-55,0 mL/h.L
Amorim et al. (2014)	Reator anaeróbio de leito fluidificado 26-30 °C	4 g/L Lodo de lagoa anaeróbia tratando dejetos de suínos	1-8 h ~ 5,0	1,91 mol H ₂ /mol glicose 2,04 L/h/L
Intanoo et al. (2016)	UASB 37 °C	10-30 g/L d Lodo de um tanque de tratamento de manipueira	5.5	39,83 L H ₂ /kg DQO removida 0,39 L H ₂ /L.d
Rosa et al. (2016)	Reator anaeróbio de leito fluidificado 30 °C	2-15 g /L Lodo de reator UASB tratando dejetos de suínos	12 e 10 h 5,0	2,0 mmol/g DQO 2,1 L H ₂ /L.d

*HPR: Produção Volumétrica de Hidrogênio.

Fonte: Autora, 2018.

A partir da Tabela 3, se observa que Cappelletti et al. (2011) avaliaram várias concentrações de manipueira (5; 7,5; 10; 15 e 30 g/L) e os autores alcançaram maior rendimento da produção de hidrogênio ao aplicar uma concentração inicial de 5 gDQO/L (HY = 2,41 mol H₂/mol glicose). Ao analisar concentrações menores que esta (entre

2352-3202 mg/L), Lamaison (2009) obteve rendimento máximo um pouco inferior (1,82 mol H₂/mol glicose). Vale ressaltar que Cappelletti et al. (2011) trabalhou com cultura pura, enquanto que Lamaison (2009) utilizou lodo de reator anaeróbio de fluxo ascendente tratando efluente de suínos como inóculo em seu experimento. Apesar da literatura indicar que culturas mistas possuem maior diversidade microbiana resultando no aumento do HY pela facilidade de adaptação dos microrganismos a uma maior variedade de substratos (Argun e Kargi, 2009), essas comunidades podem conter microorganismos não produtores de hidrogênio (bactérias produtoras de ácido láctico) ou consumidoras de hidrogênio (microrganismos homoacetogênicos, metanogênicos hidrogenotróficos e redutores de sulfato) (Valdez-Vazquez e Poggi-Varaldo, 2009), resultando na diminuição do HY. Isso pode justificar o menor HY obtido no estudo de Lamaison (2009).

A taxa de carregamento orgânico também influencia a produção de hidrogênio. Segundo Amorim et al. (2014) HY de 1,91 mol H₂/mol glicose foi alcançado ao utilizar a manipueira na concentração de 4 gDQO/L em reator anaeróbio de leito fluidificado. Os autores avaliaram a influência da redução do TDH (8, 6, 4, 2 e 1 h) e consequente aumento da TCO (de 28 para 161 kg DQO/m³.d) sobre a produção de hidrogênio, e observaram aumento do rendimento de hidrogênio de 0,31 para 1,91 mol H₂/mol glicose em função da redução do TDH de 8 para 2 h e aumento da TCO de 28 para 126 kgDQO/m³.d. Enquanto que a maior produção volumétrica de hidrogênio ocorreu no TDH de 1 h e TCO de 161 kg DQO/m³.d (2,04 L/h/L).

Intanoo et al. (2016) avaliaram a produção de hidrogênio em reator UASB a partir da manipueira utilizando diferentes taxas de carregamento orgânico (10, 20, 25 e 30 kgDQO/m³.d). Os autores obtiveram taxa de produção específica de hidrogênio de 0,39 L H₂/L.d e rendimento de hidrogênio máximo de 39,83 L H₂/kg DQO removida, respectivamente, ao aplicar a TCO de 25 kg DQO/m³.d.

Rosa et al. (2016) obtiveram produção volumétrica superior (2,1 L H₂/L.d ao aplicar a TCO de 14 kg DQO/m³.d) ao utilizar reator anaeróbio de leito fluidificado em relação ao trabalho de Intanoo et al. (2016) que utilizou reator UASB (0,39 L H₂/L.d). De qualquer forma, os trabalhos indicam que TCO mais altas do que as comumente aplicadas ao

tratamento de efluentes domésticos ou até industriais, favorecem a produção de hidrogênio.

3.4 PLATAFORMA DOS ÁCIDOS CARBOXÍLICOS

A plataforma do carboxilato tem como base a conversão de matérias-primas orgânicas, que são muitas vezes derivados de resíduos industriais e agroindustriais, em carboxilatos de cadeia curta a partir de uma comunidade mista de microrganismos anaeróbios. Carboxilatos são ácidos orgânicos dissociados que são caracterizados pela presença de pelo menos um grupo carboxila ($-\text{COOH}$) (Agler et al., 2011).

Os carboxilatos de cadeia curta (por exemplo, acetato, propionato e n-butirato) possuem de 2 a 5 átomos de carbono e são considerados produtos primários da plataforma, já que são formados durante a primeira fermentação juntamente com hidrogênio e dióxido de carbono (Figura 3, fermentação primária). Os ácidos carboxílicos de cadeia curta são considerados bastante valiosos, porém são difíceis de serem extraídos por sua elevada proporção oxigênio-carbono (Steinbusch et al., 2011). No entanto, esses produtos podem ser convertidos biologicamente ou quimicamente em combustíveis ou compostos com maior valor agregado associado (Marshall et al., 2013).

Uma aplicação bastante comum dos carboxilatos de cadeia curta é como substrato para produção de metano (metanogênese acetoclástica) (Figura 3f). A produção de metano pode ocorrer num mesmo sistema de digestão anaeróbia, dentro de um mesmo microbioma. No entanto, o metano é considerado um produto de baixo valor quando comparado a outros produtos de fermentação. De maneira semelhante, no mesmo reator e microbioma, a cadeia de carbono dos carboxilatos pode ser alongada formando ácidos carboxílicos de cadeia média (de 6 a 8 átomos de carbono) (Figura 3g) (Spirito et al., 2014).

Por ter uma cadeia de carbono mais longa, hidrofóbica, proporção oxigênio-carbono menor (de 0,33 a 0,25), facilitando a separação do caldo de fermentação, os carboxilatos de cadeia média são considerados mais interessantes como intermediários

para produção de produtos químicos e combustíveis do que os carboxilatos de cadeia curta (Steinbusch et al., 2011).

3.4.1 Alongamento da cadeia de carbono

O alongamento da cadeia de carbono tem se tornado uma opção interessante por seus produtos (ácidos carboxílicos de cadeia média, como os ácidos capróico e caprílico) possuírem aplicações diretas, como antimicrobianos, na alimentação animal e inibidores de corrosão (Aglar et al., 2011; Grootscholten et al., 2013), e indiretas, como precursores da produção de biodiesel (Steinbusch et al., 2008), de bioplásticos (Li and Fang, 2007) e de produtos químicos (Logan et al., 2008).

Além disso, a utilização de resíduos industriais e agroindustriais como matéria-prima sustentável para a produção de biocombustíveis e produtos químicos, proporciona aumento da oferta desses produtos no mercado e dificilmente iria competir com a produção de alimentos (Tilman et al., 2009).

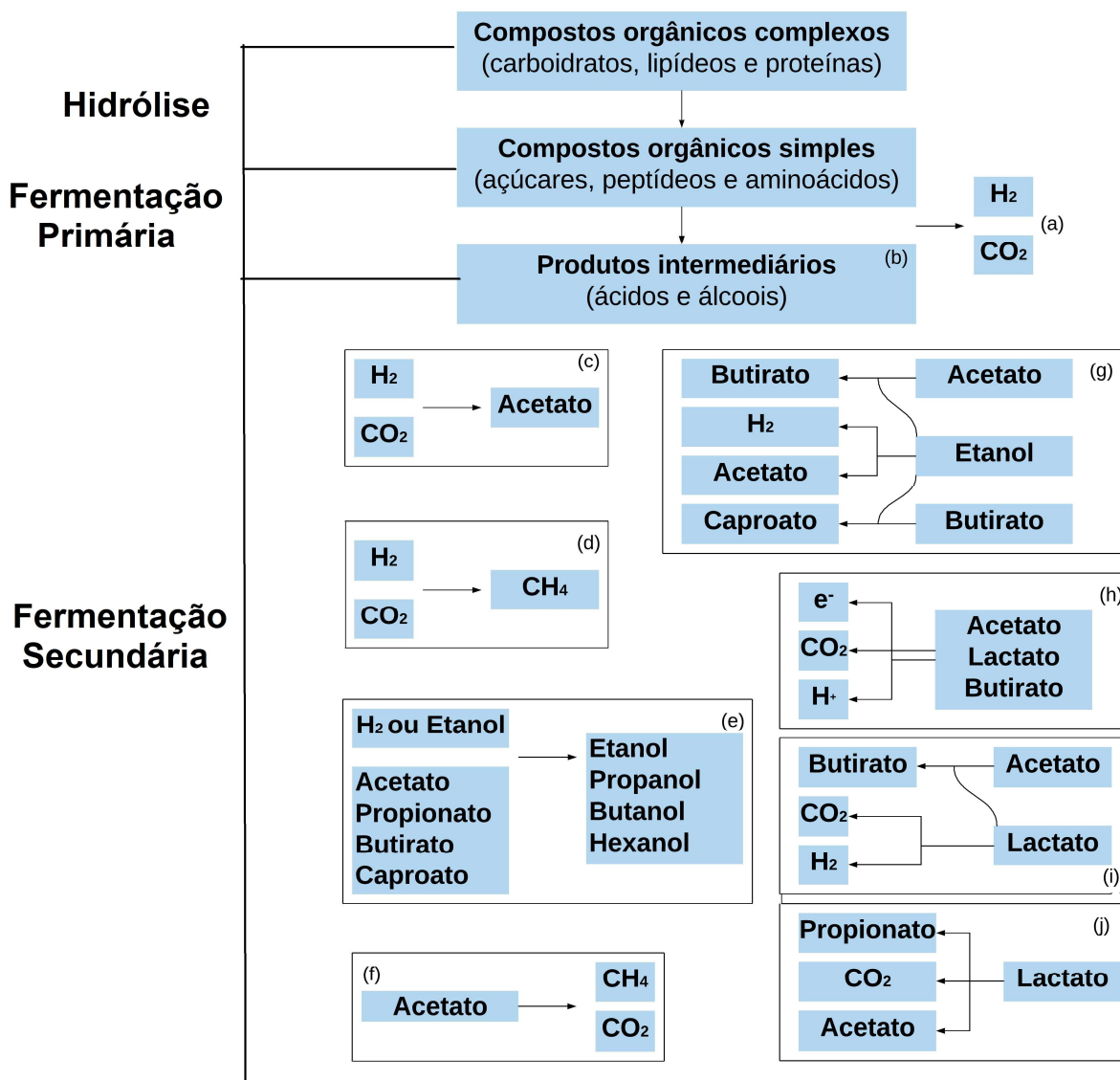
O alongamento da cadeia pode ser realizado em meio não esterilizado com uma cultura microbiana mista (Grootscholten et al., 2014). Apesar da composição do microbioma carboxilato ainda não ser definida, análises de estudos anteriores determinaram a presença de cerca de 50% de espécies do gênero *Clostridium* spp., 4% dos quais pertenciam a *Clostridium kluyveri* durante a produção máxima de ácido capróico (Steinbusch et al., 2011).

Os microrganismos envolvidos na plataforma de carboxilato, como as comunidades microbianas presente no rúmen, operam sinergicamente, com diferentes porções de cada comunidade realizando processos metabólicos que resultam na degradação cooperativa de materiais, que de outra forma seria difícil para espécies individuais digerir (Hess et al., 2011).

Altas concentrações de ácidos carboxílicos de cadeia curta com pequenas quantidades de etanol e uma pressão parcial de hidrogênio elevada são condições

necessárias para induzir a produção de um ácido carboxílico com uma cadeia mais longa, tais como o caproato (Steinbusch et al., 2011).

Figura 3 – Esquema das reações envolvidas na plataforma dos ácidos carboxílicos.



Fonte: Adaptado de Agler et al. (2011).

A utilização de etanol e hidrogênio, que são combustíveis, para alongar a cadeia de carbono é justificada pelo aumento da quantidade total de energia a ser recuperada a partir da biomassa. O poder calorífico de 1 mol de ácido capróico (3452 kJ) é mais

elevado do que o poder calorífico dos 2 mols de etanol (2638 kJ) requeridos para produzir ácido capróico. O poder calorífico do ácido capróico combinado com a extração mais simples torna o alongamento da cadeia de carbono uma opção atrativa (Steinbusch et al., 2011).

Para que o alongamento da cadeia de carbono ocorra é necessário realizar a inibição da metanogênese por este ser um processo competitivo. O pré-tratamento do inóculo, o controle do pH ou a adição de inibidores metanogênicos (por exemplo, ácido 2-bromoetanosulfônico, acetileno) são necessários para que o processo do alongamento ocorra de forma mais satisfatória (Agler et al., 2011).

Agler et al. (2012) observaram ao realizar a extração em linha do ácido capróico e o controle do pH a 5,5 que a metanogênese hidrogenotrófica não é um processo competitivo do alongamento da cadeia de carbono. Para os autores, apenas a metanogênese acetotrófica é considerada um processo competitivo, por utilizar o mesmo substrato necessário à produção de ácido capróico, o ácido acético.

Além da metanogênese, a oxidação excessiva de etanol em acetato é considerada um processo competitivo, assim como a oxidação dos ácidos carboxílicos de cadeia média em acetato. A metanogênese hidrogenotrófica pode ter um efeito indireto sobre o alongamento da cadeia, já que reduz a pressão parcial de hidrogênio permitindo a oxidação excessiva do etanol (Grootscholten et al., 2014).

Spirito et al. (2014) observaram que, em geral, a produção de ácido capróico é feita a partir do ácido acético e de etanol como substratos em biorreatores com pH de 7, sem extração do produto em linha (Steinbusch et al., 2011; Grootscholten et al., 2013). Quando é utilizado substrato real, os reatores são operados a um pH de 5,5 para prevenir a metanogênese acetoclástica e gerar um gradiente de pH que permita a extração de ácido capróico em linha líquido/líquido (Agler et al., 2012; Vasudevan et al., 2014).

A extração do ácido capróico se torna necessária devido à sua natureza tóxica a um valor de pH mais baixo de 5,5 (Kim e Rhee, 2013; Butkus et al., 2011). A solubilidade máxima relativamente baixa do ácido capróico (~10 g/L) facilita a extração em linha, especialmente quando comparado com a natureza miscível completa do etanol (Agler et al., 2012; Vasudevan et al., 2014).

A extração do ácido capróico pode ser realizada por vários métodos (extração bifásica, por membrana e eletrólise da membrana). A extração bifásica utiliza um solvente (alamine 336 ou fosfato de tri-n-butil) dissolvido em álcool oléilico, evitando a mistura com o meio. A transferência do ácido capróico não dissociado do caldo de fermentação para o meio de extração ocorre por meio de uma reação deste com o solvente (Choi et al., 2013; Jeon et al., 2013).

A extração por membrana evita o contato entre o extrator, que possui natureza tóxica, com a biomassa. A baixa solubilidade do ácido capróico permite a sua transferência do meio fermentativo para a camada de óleo formada na superfície externa da membrana. Em seguida, o ácido capróico é novamente extraído através de uma segunda membrana para uma solução alcalina como um sal (Cavalcante et al., 2017).

O método de eletrólise da membrana consiste na aplicação de uma corrente aos eletrodos que resulta na separação dos íons OH^- e do H_2 na câmara do biorreator (ânodo), enquanto os ácidos graxos voláteis ficam concentrados na solução aquosa da câmara de extração (cátodo) (Andersen et al., 2015).

Apesar da extração por membrana ser promissora, ainda não foi confirmada a viabilidade econômica desse método, já que alguns parâmetros importantes ainda não foram determinados, como a taxa de extração superficial máxima e a concentração ideal do extrator (Cavalcante et al., 2017).

3.4.2 Rotas metabólicas

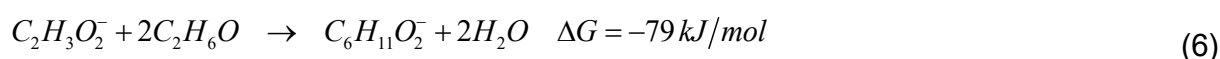
As rotas microbianas mais relevantes que são conhecidas para alongar cadeias de carbono em reator biológico são: homoacetogênese (alongamento do CO_2 em acetato em condições anaeróbias utilizando o H_2 como doador de elétrons) (Figura 3c); formação de succinato (alongamento do CO_2 e glicerol em succinato); e a β -oxidação reversa (Figura 3g).

É na rota β -oxidação reversa que o ácido capróico é produzido. Atualmente, o ácido capróico é produzido comercialmente a partir de vários métodos petroquímicos,

porém a utilização do ácido capróico desenvolvido de forma sustentável vem sendo bastante pesquisada com o objetivo de obter condições de produção em nível comercial (Spirito et al., 2014).

A rota β -oxidação é uma via metabólica reversível, ou seja, pode executar tanto a oxidação quanto a reação de redução, de acordo com as condições do meio (Gonzalez-Cabaleiro et al., 2013). Normalmente a β -oxidação ocorre em abundância em reatores anaeróbios e pode operar em sentido inverso quanto há presença de compostos reduzidos ricos em energia, como o etanol e o lactato, e elevada pressão parcial de hidrogênio para evitar a oxidação e, conseqüentemente, a remoção dos ácidos carboxílicos de cadeia curta e média (Agler et al., 2014).

O metabolismo inicia com a oxidação do etanol a acetato, que é alongado a butirato e este, posteriormente em caproato. Neste metabolismo, o etanol é utilizado como doador de elétrons. Porém, no processo fermentativo, além do etanol, o hidrogênio pode ser utilizado como doador de elétrons, já que o hidrogênio juntamente com o acetato pode ser convertido em etanol. As reações de produção do ácido capróico podem ser resumidas segundo as equações 6 e 7 (Grootscholten et al., 2014).



A equação 6 apresenta a formação do ácido capróico a partir do acetato e etanol, enquanto que na equação 7, que é termodinamicamente mais favorável, o acetato e o hidrogênio são os responsáveis pela produção do ácido capróico.

3.4.3 Produção de compostos intermediários com valor associado

Em relação à produção de produtos intermediários com valor associado, observa-se que o ácido capróico é o principal produto gerado a partir do alongamento da cadeia

carbônica. Porém, alguns trabalhos também relatam a produção de ácido caprílico e de heptanoato. Neste item alguns destes trabalhos são apresentados.

Steinbusch et al. (2011) avaliaram a produção de ácido capróico e ácido caprílico a partir de acetato observando a influência do etanol e/ou do hidrogênio como doadores de elétrons, e do pH. Os autores observaram a presença de ácido capróico em todas condições (utilizando etanol, hidrogênio ou os dois). Já o ácido caprílico foi observado apenas nas configurações onde foi utilizado o hidrogênio ou hidrogênio e etanol ao mesmo tempo. Num segundo momento, os autores avaliaram a influência do pH. Para isso eles adotaram a melhor configuração na etapa anterior (acetato, hidrogênio e etanol) no pH 5,5 e 7. O ácido capróico foi observado nas duas situações, porém o ácido caprílico apenas no pH 7. A produção do ácido capróico máxima foi de 8,17 g/L, enquanto o ácido caprílico foi obtida a concentração máxima de 0,32 g/L. A taxa de produção do ácido capróico foi de 0,485 g/L.d.

Agler et al. (2012) alcançaram uma taxa de produção de ácido capróico de 2,1 g/L.d a partir de etanol de uma indústria de cerveja. Os autores alcançaram este valor sem a necessidade de utilizar agentes químicos para inibição da metanogênese. Foi realizada a extração em linha do ácido capróico formado e o pH foi controlado em 5,5.

Weimer e Stevenson (2012) isolaram uma cepa de *Clostridium kluyveri* do rúmen bovino em um meio contendo etanol, acetato e succinato (produtos comuns de fermentação do rúmen). Os autores obtiveram uma produção máxima de ácido capróico de 12,8 g/L. Os autores sugerem que essa cepa pode ter potencial para produção industrial de ácido capróico.

Jeon et al. (2013) produziram ácido capróico a partir do galacticol, utilizando *Clostridium sp.* BS-1. Os autores obtiveram uma produção máxima de ácido capróico de 6,96 g/L. Posteriormente, foi adotado um sistema extativo bifásico *in situ* a fim de recuperar o ácido capróico formado. O sistema de extração resultou numa fase *lag* mais longa, porém a produtividade e a concentração do produto aumentaram, atingindo 0,34 g/L h e 32 g/L, respectivamente.

Grootscholten (2013) realizou uma série de trabalhos visando o alongamento da cadeia de carbono que vai da utilização de reator contínuo com substrato sintético

(Grootscholten et al., 2013), à utilização de um resíduo real (Grootscholten et al., 2013a). A seguir serão apresentados alguns trabalhos do autor com sua configuração e resultados principais.

Grootscholten et al. (2013b) avaliaram a produção de ácidos carboxílicos de cadeia média em um filtro anaeróbio de fluxo ascendente a partir de acetato e etanol. Os autores utilizaram um tempo de detenção hidráulica de 17 horas e alcançaram uma taxa de produção volumétrica de carboxilatos de cadeia média de 16,6 g/L.d. Os autores afirmam que esta taxa é comparável a outros processos fermentativos, como a produção de metano, butanol e etanol. A concentração máxima de ácido capróico foi de 11 g/L e do ácido caprílico foi de 0,6 g/L.

Em seguida, os autores conseguiram aumentar a produção de ácidos carboxílicos de cadeia média ao reduzir o tempo de detenção hidráulica do filtro anaeróbio de fluxo ascendente de 17 para 4 horas (de 16,6 para 57,4 g/L.d). Porém a concentração do ácido capróico reduziu para 9,3 g/L e do ácido caprílico para 0,3 g/L no TDH de 4 horas (Grootscholten et al., 2013a).

Grootscholten et al. (2013c) avaliaram a produção de heptanoato a partir de ácido propiônico e etanol utilizando o alongamento da cadeia de carbono. A taxa de produção do heptanoato foi de 4,4 g/L.d e a concentração foi de 3,2 g/L. para os autores, os resultados apontam o potencial da produção do heptanoato a partir do alongamento da cadeia de carbono em substituição à produção a partir de óleo de mamona. Porém futuras pesquisas devem ser realizadas a fim de tornar o processo mais viável economicamente.

Grootscholten et al. (2013) avaliaram o desempenho da fração orgânica dos resíduos sólidos urbanos (FORSU) na produção de ácidos carboxílicos de cadeia média a partir da adição de etanol. Os autores observaram que a adição de etanol promoveu aumento das concentrações dos ácidos carboxílicos de cadeia média em comparação ao experimento sem adição de etanol. O caproato passou de 1,7 para 2,8 g/L, o heptanoato passou de 0,4 para 1,6 g/L, e o caprilato só foi observado nos experimentos no qual o etanol foi adicionado (0,6 g/L).

Para melhorar a produção dos ácidos carboxílicos de cadeia média, Grootscholten et al. (2014) avaliaram o desempenho do alongamento da cadeia de carbono em fases separadas a partir da FORSU. O objetivo foi promover a hidrólise e acidogênese da FORSU num primeiro estágio (reator em batelada), seguido do alongamento da cadeia em uma segunda etapa (reator contínuo com TDH de 11 h) a partir de uma mistura do lixiviado do primeiro reator com etanol. Os melhores resultados foram: caproato, 12 g/L; heptanoato, 0,5 g/L; e caprilato, 0,4 g/L. Os autores ressaltam a importância do controle do pH para conseguir maior estabilidade do processo.

Para os autores, ao separar a acidificação e o alongamento da cadeia, os efeitos de toxicidade dos ácidos e do etanol na hidrólise podem ser evitados. Outra vantagem de um sistema de duas fases seria a possibilidade de otimizar a acidificação e o alongamento da cadeia separadamente (Grootscholten et al., 2013a). Desta forma, seria permitido o aproveitamento da produção de hidrogênio e de ácidos carboxílicos de cadeia média. Como desvantagens, um sistema de duas fases possui maior complexidade e custos de capital mais elevado devido à necessidade de dois reatores em vez de um (Grootscholten et al., 2014).

Weimer et al. (2015) alcançaram concentração máxima de ácido capróico de 6,1 g/L a partir de biomassa celulósica (hastes de alfafa ou forragens de mudas) e etanol. Os autores avaliaram o desempenho do rúmen e uma mistura de rúmen com uma cepa derivada de rúmen de *Clostridium kluyveri* no alongamento da cadeia de carbono. A adição de *C. kluyveri* resultou na oxidação mais rápida do etanol (48-72 h), sem diminuição da produtividade.

Ge et al. (2015) desenvolveram melhorias nas condições operacionais de um biorreator anaeróbio para produção de ácido capróico com extração líquido/líquido a partir de efluente de cervejaria. A produção média de ácido capróico foi de $3,38 \pm 0,42$ g/L d ($7,52 \pm 0,94$ g DQO/ L d) com um rendimento de $70,3 \pm 8,81\%$ e uma relação DQO_{H_2Ca}/DQO_{EtOH} de $1,19 \pm 0,15$ por um período de cerca de 55 dias. A taxa de produção máxima foi alcançada aumentando as taxas de carga orgânica em conjunto com o aumento da capacidade do sistema de extração e uma mudança no substrato.

Liang e Wan (2015) avaliaram a produção de ácido carboxílico a partir do grão gasto de cerveja utilizando cultura mista. Os autores concluíram que o controle do pH e a adição de doadores de elétrons são essenciais para a produção de ácidos carboxílicos nas condições analisadas. O pH neutro e a adição de etanol como doador de elétrons, aumentou a produção de ácido valérico e ácido capróico em 44% e 167%, respectivamente.

Zhu et al. (2015) conseguiram aumentar a concentração de ácido capróico em 82,89% ao metabolizar o lactato (como uma única fonte de carbono e energia) em substituição ao etanol por um microbioma obtido a partir de um poço de fermentação utilizado na produção de licor chinês. A concentração de ácido capróico máxima obtida foi de 23,41 g/L, a uma taxa máxima de 2,97 g/L.d. Os autores afirmam que os resultados indicam um novo mecanismo de síntese de ácido capróico e que o processo analisado proporcionará uma oportunidade promissora para a inovação da recuperação de resíduos, bem como para a biossíntese de ácido capróico.

3.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE A REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão de literatura teve como objetivo buscar estudos anteriores que fornecessem base teórica para melhorar o entendimento do processo de produção de ácido capróico associado à produção de hidrogênio a partir da manipueira, por meio do alongamento da cadeia carbônica.

A produção de produtos químicos de alto valor agregado a partir de matéria orgânica pode ser mais viável do que a produção de bioenergia (Bungay, 2004). O que determina a viabilidade da utilização de um determinado resíduo para produção de um produto é o custo do processo de bioconversão e de extração (Laufenberg et al., 2003).

O baixo rendimento de conversão é a maior barreira, porém muito esforço tem sido dedicado para melhorar a quantidade de produto formado. A bioconversão pode ser melhorada por modificação do processo, tal como uso de cultura de imobilização ou acoplamento de dois biorreatores separados (Karumanchi et al., 2000).

A produção de hidrogênio por meio de *dark fermentation* tem o maior potencial como etapa de pré-tratamento que pode ser seguido por uma etapa do processo secundário, como a bioconversão de ácidos carboxílicos em outros produtos (Angenent et al., 2004).

A utilização de águas residuárias proveniente de processos industriais e agroindustriais para produzir hidrogênio e produtos químicos é interessante pelo baixo custo e grande disponibilidade, além de reduzir o potencial poluidor desses resíduos. Porém resíduos reais possuem características individuais que dificultam a obtenção das condições operacionais ideais. Além disso, muitos trabalhos utilizam substratos reais diluídos, sendo interessante buscar condições que possibilitem a utilização do resíduo em sua forma bruta ou com o mínimo de diluição para evitar a utilização de água limpa. Dessa forma, é interessante avaliar alternativas que promovam aumento da eficiência da produção de hidrogênio.

Este trabalho buscou avaliar alguns parâmetros que influenciam a produção de hidrogênio visando maximizar a produção de hidrogênio, são eles: método de inibição da metanogênese, concentração do substrato e tipo de inóculo. O alongamento da cadeia de carbono foi adotado com etapa posterior à produção de hidrogênio com o objetivo de agregar valor ao processo, por meio da partir da injeção de etanol, como doador de elétrons, utilizando o ácido acético produzido na fase acidogênica como substrato.

Os experimentos foram conduzidos a partir de testes em batelada e os resultados são apresentados em forma de artigo. No artigo 1, duas técnicas de inibição da metanogênese foram avaliadas para produção de hidrogênio, são elas: acetileno (1% v/v no *headspace*) e tratamento térmico (120°C, 1 atm por 30 minutos). Em seguida, três concentrações iniciais de substrato (10, 20 e 40 g O₂/L) e três tipos de inóculos (rúmen bovino e lodo anaeróbio, de estação de tratamento de águas residuárias industriais e municipais) foram analisados. No artigo 2, a produção de hidrogênio seguida do alongamento da cadeia de carbono foi promovida a partir da autofermentação da manipueira. Duas concentrações iniciais do substrato foram adotadas (10 e 20 g O₂/L). Inicialmente, o crescimento de microrganismos metanogênicos foi realizado a partir do

ajuste do pH para 5,5. O alongamento da cadeia de carbono foi realizado por adição estequiométrica de etanol e ajuste de pH para 7,0.

4 RESULTADOS

4.1 ARTIGO 1: EFEITO DA TÉCNICA DE INIBIÇÃO DA METANOGENÊSE, TIPO DE INÓCULO E CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO NA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO E ÁCIDOS CARBOXÍLICOS A PARTIR DA MANIPUEIRA

Resumo

Manipueira é um resíduo agroindustrial rico em carboidratos gerado durante o processamento da mandioca (*Manihot esculenta Crantz*). É, teoricamente, adequado para utilização em processos biotecnológicos, como a produção de hidrogênio e ácidos carboxílicos devido ao alto teor de matéria orgânica facilmente degradável. No entanto, a aplicação do método apropriado de inibição da metanogênese, o tipo inóculo e as cargas orgânicas são variáveis importantes do processo e foram avaliadas neste trabalho. Os experimentos foram conduzidos em batelada em frascos de 2,3 L durante duas fases operacionais. Na primeira fase (F1), a inibição dos microrganismos metanogênicos no lodo foi avaliada utilizando acetileno (1% v/v no *headspace*) e tratamento térmico (120 °C, 1 atm por 30 minutos). Na segunda fase (F2), três tipos de inóculo foram avaliados (rúmen bovino e lodo anaeróbio, de estação de tratamento de águas residuárias industriais e municipais). F2 visou identificar o melhor inóculo para esta aplicação, com base na capacidade de produção de hidrogênio. Foram testadas três concentrações iniciais de substrato em termos de demanda química de oxigênio (DQO) (10, 20 e 40 g O₂/L) a partir da diluição da manipueira (91,30 g O₂/L). Os resultados de F1 indicaram que tanto o acetileno quanto o tratamento térmico inibiram eficientemente a metanogênese, sem produção de metano. No entanto, o potencial máximo de produção de H₂ por aplicação de tratamento térmico (~563 mL) foi mais de duas vezes maior quando comparado com o tratamento com acetileno (~257 mL); o ácido butírico foi o principal subproduto gerado (~3 g/L). Em F2, observou-se que o maior rendimento de hidrogênio (1,66 ± 0.07 mol H₂/mol de glicose) e de produção de ácido capróico (~2 g/L) ocorreram para a concentração inicial de manipueira de 20 g O₂/L, quando o rúmen bovino foi o inóculo. Os principais produtos de degradação metabólica

foram o etanol, e os ácidos acético, butírico, propiônico e capróico. A detecção de ácido capróico em todos os experimentos sugeriu que as condições aplicadas favoreceram o alongamento da cadeia de carbono em relação à metanogênese.

Introdução

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é um produto agrícola tipicamente brasileiro que é utilizado como alimento ou como matéria-prima para vários produtos industrializados, tais como a farinha de mandioca, amido de mandioca e tapioca. Aproximadamente 6 litros de águas residuais, denominada manipueira, que é um resíduo rico em carboidratos (20-40 g/L), são produzidos pelo processamento de um quilograma de mandioca (Cappelletti et al., 2011). A manipueira pode ser aproveitada como biofertilizante, pesticida, na de fabricação tiquira (bebida típica do Estado do Maranhão) e na confecção de molhos de pimenta e de tucupi (prato típico do Estado do Pará) (Cardoso, 2005; Gongaza et al., 2008; Silva, 2009). Porém, a manipueira, na maioria das vezes, é descartada em correntes de água sem tratamento prévio.

O tratamento biológico de resíduos industriais e agrícolas pode fornecer bioenergia ou produtos químicos valiosos, ao mesmo tempo em que promove o controle da poluição (Angenent et al., 2004). Dessa forma, devido ao alto teor de matéria orgânica, a manipueira pode ser atrativa para ser utilizada como substrato em processos biotecnológicos, produzindo biohidrogênio e outros produtos de valor agregado associado.

A produção de hidrogênio por fermentação a partir de resíduos orgânicos ocorre na fase acidogênica da digestão anaeróbia. Vários fatores influenciam na produção fermentativa de hidrogênio, tais como tipo de inóculo, de reator, de substrato, teor de nitrogênio e de fosfato, temperatura, pH, etc. (Wang e Wan, 2009). O tipo de inóculo tem grande influência na evolução das rotas fermentativas (De Gioannis et al., 2013). Porém há poucos trabalhos sobre os efeitos de diferentes tipos de inóculo na produção

fermentativa de hidrogênio utilizando substratos reais (Luo et al., 2010; Pakarinen et al., 2008; Phowan e Danvirutai, 2014).

Luo et al. (2010) usaram cinco tipos diferentes de inóculo (lodo mesofílico coletado em reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB) que tratava manipueira, lodo termofílico de reator anaeróbio em batelada sequencial tratando manipueira, lodo mesofílico de reator de tanque de agitação contínua tratando esterco de vaca, lodo mesofílico de reator anaeróbio em batelada sequencial tratando esterco de frango, lodo ativado coletado em estação de tratamento de águas residuais municipais), sem qualquer pré-tratamento para produção de hidrogênio fermentativo a partir de manipueira. Lodo mesofílico coletado em reator anaeróbio de manta de lodo e lodo termofílico de reator anaeróbio em batelada sequencial, ambos tratando manipueira, resultaram em melhor desempenho ($HY = 85,2$ e $83,5$ mL H_2 /gSV, respectivamente) devido à afinidade dos microrganismos com a água residuária testada.

Pakarinen et al. (2008) avaliaram o potencial da silagem de capim como substrato para produção de hidrogênio usando dois tipos de inóculo diferentes (lodo mesofílico de um digestor tratando esterco de vaca e lodo mesofílico de uma estação de tratamento de águas residuárias municipais) com e sem tratamento térmico prévio. Somente o inóculo do digestor de fazenda tratando esterco de vaca produziu hidrogênio de silagem de capim sem pré-tratamento térmico ($HY_{\text{máx}} = 3,6$ mL H_2 /gSV). Quando o pré-tratamento térmico foi adotado, a produção de hidrogênio com lodo de digestor tratando esterco de vaca foi 3 vezes ($HY_{\text{máx}} = 11,5$ mL H_2 /gSV) maior do que sem pré-tratamento térmico e também foi maior do que quando o lodo de estação de tratamento de águas residuárias municipais foi adotado ($HY_{\text{máx}} = 0,2$ mL H_2 /gSV). Estes resultados relatam a dependência do tipo de inóculo na produção de hidrogênio, o papel do pré-tratamento do inóculo na seleção de microrganismos que produzem hidrogênio e na inibição dos consumidores de hidrogênio.

Por outro lado, há mais estudos que tratam da influência da concentração inicial do substrato na produção de hidrogênio, mesmo para manipueira. Cappelletti et al. (2011) avaliaram o efeito da concentração inicial da manipueira (30; 15; 10; 7,5 e 5 g O_2 /L) sobre a produção celular e produção de hidrogênio, por uma cultura pura de

Clostridium acetobutylicum ATCC 824 em ensaios em batelada. Os autores alcançaram maior rendimento da produção de hidrogênio (HY) na concentração de 5 g O₂/L (2,41 mol H₂/mol glicose).

Já Ottaviano et al. (2017) avaliaram as concentrações iniciais de soro de leite em pó (2,8; 4,9; 6,8; 9,8 e 14,6 g de lactose/L) na produção de hidrogênio usando um reator anaeróbio de leite fluidificado. Os autores observaram que a aplicação de maiores taxas de carga orgânica impactou negativamente na produção de hidrogênio, devido à sobrecarga do sistema. O aumento da concentração de substrato de 2,8 para 9,8 g de lactose/L resultou em pequena variação de HY, que foi relativamente estável em torno de 2,5 mL H₂/mol lactose. No entanto, quando a concentração foi aumentada para 14,6 g de lactose/L, observou-se uma queda acentuada do HY para 0,67 ± 0,09 mol H₂/mol de lactose.

Além disso, Eker e Sarp (2017) relataram acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGV) durante a produção anaeróbia de hidrogênio a partir de resíduos de papel com concentração total de açúcar variando entre 3,84 e 45,5 g/L. O maior rendimento de hidrogênio (140 mL H₂/g de açúcar total) também foi relatado para a menor concentração de açúcar aplicada (3,84 g/L). O acúmulo de AGV foi observado para a maior concentração, o que resultou na inibição da produção de hidrogênio. Considerando que vários fatores influenciam a produção de hidrogênio, é importante melhorar o conhecimento para agregação de valor ao uso de águas residuárias reais.

Quando a produção de hidrogênio é o alvo do sistema de tratamento, o efluente líquido gerado após o tratamento é, em geral, ainda rico em carboxilatos de cadeia curta e álcoois (Nissila et al., 2011). Os carboxilatos de cadeia curta (por exemplo, acetato, propionato e n-butirato) possuem de 2 a 5 átomos de carbono e são considerados produtos primários da plataforma do ácido carboxílico, já que são formados durante a primeira fermentação juntamente com hidrogênio e dióxido de carbono. Apesar de valiosos, estes ácidos são difíceis de serem extraídos por sua elevada proporção oxigênio-carbono (Steinbusch et al., 2011). No entanto, esses produtos podem ser convertidos biologicamente ou quimicamente em combustíveis ou compostos com maior valor agregado associado (Marshall et al., 2013).

O ácido capróico é um ácido carboxílico de cadeia média que pode ser obtido a partir do alongamento da cadeia de carbono do ácido acético e etanol ou hidrogênio gerados na primeira fermentação. A cadeia de carbono mais longa, com proporção oxigênio-carbono menor (0,33), facilita a separação do ácido capróico do caldo de fermentação (Steinbusch et al., 2011). Além da vantagem de possuir aplicações diretas, como antimicrobianos, alimentação animal e inibidores de corrosão (Agler et al., 2011; Grootscholten et al., 2013), o ácido capróico também pode ser utilizado indiretamente como precursor da produção de biodiesel (Steinbusch et al., 2008), de bioplásticos (Li and Fang, 2007) e de produtos químicos (Logan et al., 2008).

Por ser um processo que consome hidrogênio e competitivo do alongamento da cadeia de carbono, a metanogênese deve ser evitada. Vários métodos de pré-tratamento do inóculo podem ser adotados, tais como: tratamento térmico, acidificação, basificação, aeração ou congelamento (Wang e Wan, 2009a). A produção de ácido capróico também é dependente da inibição da metanogênese, pois os microrganismos metanogênicos acetoclásticos usam acetato e os hidrogenotróficos utilizam hidrogênio, reduzindo assim a disponibilidade de acetato e a pressão parcial de hidrogênio necessária para o alongamento da cadeia de carbono (Grootscholten et al., 2014).

Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a influência da inibição da metanogênese, do tipo de inóculo e da concentração do substrato na produção de hidrogênio e de ácido capróico a partir da manipueira gerada como resíduo agroindustrial durante o processamento da mandioca.

Material e métodos

Manipueira

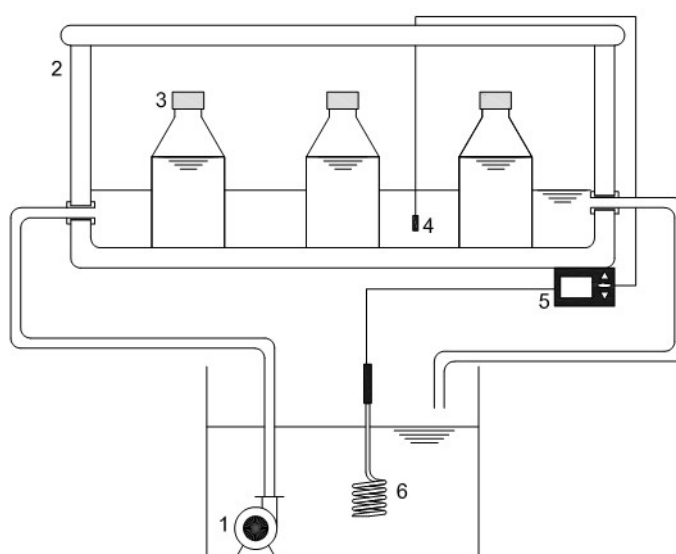
A manipueira foi coletada numa fábrica de farinha de mandioca em Taquarana, Alagoas, Brasil. As principais características da manipueira foram as seguintes: pH 5,5,

sólidos totais 103,28 g ST/L, sólidos voláteis de 75,82 g SV/L, carboidratos totais 87,08 g glicose/L e demanda química de oxigênio (DQO) 91,30 g O₂/L.

Reator

Foram utilizados frascos de vidro Duran® (Wertheim, Main, Alemanha) como reatores nas duas fases operacionais avaliadas. Os reatores possuíam volume total de 2,3 L e volume reacional de 1,7 L, vedados com rolhas de borracha com butila e tampa plástica. Os reatores foram mantidos em uma caixa térmica de polipropileno, que funcionava como banho térmico para controlar a temperatura (Figura 4). Em um recipiente com água, uma bomba submersa Resun S-1000 (Guangdong, China) foi responsável pela circulação da água dentro da caixa térmica. A temperatura foi controlada a partir de um aquecedor elétrico Granlux acoplado a um controlador de temperatura digital FullGalse (modelo MT-512RI plus – Canoas, Rio grande do Sul, Brasil). A caixa térmica foi mantida fechada para evitar a entrada de luz.

Figura 4 – Esquema do banho térmico: 1 – bomba submersa; 2 – caixa térmica de polipropileno; 3 – frascos reatores; 4 – sensor de temperatura; 5 – controlador de temperatura digital; 6 – aquecedor elétrico.



Procedimento Experimental

Os ensaios foram conduzidos em batelada, em duplicata, usando volume de inóculo suficiente para garantir uma concentração inicial de cerca de 2 g STV/L no licor misto de cada reator. A manipueira foi utilizada em proporções de diluição com água que resultaram em teores iniciais de matéria orgânica específicos para cada fase experimental (descritas nos itens 3.2.4 e 3.2.5). O pH inicial foi ajustado até atingir 5,5 com NaOH 2M ou HCl 2M. O meio de cultura foi preparado como descrito por Fernandes et al. (2010) e a suplementação nutricional utilizada foi (concentração no licor misto, em mg/L): $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ (6,000); $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,150); $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,750); $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,075); $\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,012); $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,618); SeO_2 (0,0108); KH_2PO_4 (1,608); KHPO_4 (0,390); $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,828).

Fase 1 – Inibição da metanogênese

Inicialmente, dois métodos de inibição da metanogênese foram testados no inóculo: tratamento térmico do inóculo por autoclave (120°C e 1 atm por 30 minutos) (Kim et al., 2013) e injeção de acetileno no *headspace* (1% v/v) (Sparling et al., 1997). A concentração inicial da manipueira adotada foi de 10 g O_2 /L. O inóculo foi lodo anaeróbio proveniente de um reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB) que trata esgotos domésticos. O inóculo tem boa diversidade microbiana (Lucena et al., 2011) e foi selecionado com base na aplicação bem sucedida deste tipo de inóculo para a produção de hidrogênio (Chen et al., 2002; Wu et al., 2007). A temperatura foi mantida em 30 ± 1 °C por meio de banho térmico (Figura 4).

Fase 2 – Influência do inóculo e da concentração do substrato na produção de hidrogênio

O efeito combinado de diferentes tipos de inóculo e concentrações de substrato na produção de hidrogênio e distribuição de metabólitos de degradação foram avaliados na segunda fase (F2), a fim de determinar o melhor desempenho na produção de hidrogênio. Três tipos de inóculo foram utilizados (Tabela 4). O inóculo 1 foi o mesmo lodo anaeróbico municipal (M) utilizado na fase 1. O inóculo 2 foi rúmen bovino (R) coletado em um matadouro localizado na cidade de Viçosa-AL, e o inóculo 3 foi lodo anaeróbico têxtil (T) proveniente de um reator UASB que trata efluente têxtil de uma indústria localizada na cidade de Caruaru-PE. O inóculo 2 (rúmen bovino) é reportado como boa fonte de bactérias produtoras de hidrogênio (Nandi e Sengupta, 1998); enquanto que o inóculo 3 era altamente especializado, caracterizado por Köchling et al. (2016) como sendo dominado (94%) por *Clostridium sp.*, gênero microbiano conhecido pela habilidade na produção de hidrogênio (Nandi e Sengupta, 1998). Todos os inóculos foram armazenados na geladeira por cerca de 20 dias.

Tabela 4 – Resumo das condições experimentais utilizadas na fase 2.

Inóculo	Temperatura	Manipueira (DQO em g O ₂ /L)	Código do tratamento
Inóculo 1 - ETE Municipal (M)	30°C	10	M10
		20	M20
		40	M40
Inóculo 2 - rúmen bovino (R)	40°C	10	R10
		20	R20
		40	R40
Inóculo 3 - ETE Têxtil (T)	30°C	10	T10
		20	T20
		40	T40

A manipueira foi utilizada em proporções de diluição com água que resultaram em teores iniciais de matéria orgânica iguais a 10, 20 e 40 g O₂/L, medidos como DQO. Estas concentrações são consideradas relativamente elevadas para a produção de hidrogênio em reatores em batelada (Phowan e Danvirutai, 2014; Wang et al., 2016; Gokfiliz e Karapinar, 2016). O objetivo foi produzir hidrogênio reduzindo o uso de água para

diluição, o que não é desejável no caso de aplicações em escala real. Para os inóculos 1 e 3 foi adotada a temperatura de 30 ± 1 °C, enquanto que para o inóculo 2 a temperatura do banho térmico foi mantida em 40 ± 1 °C, temperatura aproximada à do estômago bovino. Todos os inóculos foram pré-tratados termicamente por autoclave (120°C, 1 atm por 30 minutos), como método de inibição da metanogênese.

Monitoramento e operação

Os reatores foram operados entre 40 e 60 dias, dependendo da condição experimental aplicada. Foram coletadas entre cinco e seis amostras líquidas durante o experimento para monitoramento da DQO, pH, carboidratos, ácidos orgânicos voláteis e álcoois. A coleta de amostras líquidas (10 mL de amostra) foi realizada utilizando uma seringa descartável. A medição qualitativa e quantitativa do biogás foi realizado 3 vezes por semana.

DQO e pH foram analisados de acordo com a metodologia descrita no Standard Methods for Water and Wastewater Examination (APHA, 2012). A concentração de carboidratos foi medida a partir da metodologia desenvolvida por Dubois et al. (1956). Já a concentração dos ácidos orgânicos e álcoois foram determinadas por cromatografia gasosa (modelo Shimadzu GC-2010-Plus), utilizando detector de ionização de chama e coluna HP-INNOWAX (30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura do filme), e método descrito por Moraes et al. (2000). A composição do hidrogênio no biogás foi medida usando o mesmo cromatógrafo a gás (Shimadzu GC-2010-Plus), com detector de condutividade térmica e argônio como gás de arraste. As temperaturas do injetor, detector e coluna foram mantidas a 30 °C, 200 °C e 230 °C, respectivamente. A coluna utilizada foi a Supelco Carboxen 1010 (30 m de comprimento e diâmetro interno de 0,53 mm).

Parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos foram avaliados nas duplicatas dos reatores através do software OriginPro® 8. O potencial máximo de produção de hidrogênio (P), a taxa máxima de produção de hidrogênio (R_m) e a duração da fase de adaptação (λ) foram determinados a partir do modelo de regressão de Gompertz (Chen et al, 2006), indicado na Equação 8:

$$H(t) = P \exp \left\{ -\exp \left[\frac{R_m e}{P} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (8)$$

Onde:

$H(t)$ é a produção acumulada de hidrogênio (mL);

P é o potencial máximo de produção de hidrogênio (mL);

R_m é a taxa máxima de produção de hidrogênio (mL/h);

λ é o intervalo de tempo (fase *lag*) necessário para o início da produção exponencial de hidrogênio (h);

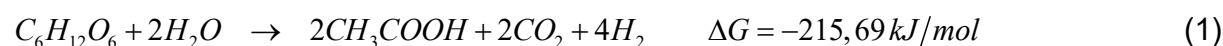
t é o tempo (h); e

e constante adimensional de Euler, 2,718.

O modelo foi aplicado aos dados experimentais de produção de hidrogênio provenientes de todas as fases experimentais. O rendimento da produção de hidrogênio (HY) foi obtido relacionando a quantidade de hidrogênio produzida com a quantidade de glicose consumida (Equação 9).

$$HY = \frac{\text{Quantidade (mol) de } H_2 \text{ produzido}}{\text{Quantidade (mol) de glicose consumida}} \quad (9)$$

A eficiência de conversão teórica de hidrogênio foi obtida com relação à produção de hidrogênio máxima de 4 mol H_2 /mol glicose obtida pela rota metabólica de formação do ácido acético, Equação 1.



Resultados e discussão

Fase 1 – Seleção do pré-tratamento do inóculo

A aplicação de acetileno e o tratamento térmico por autoclave do inóculo 1 foram eficientes como supressores da metanogênese, já que não houve detecção de metano ao longo do experimento na Fase 1. O acetileno é considerado um inibidor químico específico, que age em moléculas específicas das células de microrganismos metanogênicos (Conrad e Chidthaisong, 2000). A estrutura do acetileno é análoga a da enzima hidroximetilglutaril-SCoA (HMG-SCoA) (Liu et al., 2011), e o acetileno diminui a atividade das funções celulares que requerem fluxo de H^+ , incluindo a síntese de ATP, captação de Ni^{2+} e metanogênese (Sprott et al. 1982).

Por outro lado, o tratamento térmico é classificado como inibidor físico não específico, pois afeta as funções gerais dos microrganismos (Conrad e Chidthaisong, 2000). O princípio deste método de inibição parte do conhecimento de que bactérias produtoras de hidrogênio, como as do gênero *Clostridium*, são capazes de esporular, quando submetidas a condições adversas como, por exemplo, altas temperaturas, eliminando assim os microrganismos consumidores de hidrogênio não formadores de esporos, como é o caso das arqueas metanogênicas (Ren et al, 2008; Valdez-Vazquez e Poggi-Varaldo, 2009).

O modelo de Gompertz ajustou bem os dados experimentais de produção acumulada de hidrogênio (Figura 5). O potencial máximo de produção de H_2 (P) de $562,64 \pm 49,39$ mL quando utilizado o tratamento térmico, foi aproximadamente duas vezes maior do que o valor observado quando o acetileno foi adotado ($256,96 \pm 63,56$ mL) (Tabela 5).

Figura 5 – Produção acumulada de hidrogênio para os dois tipos de inibição da metanogênese: (■) acetileno; (●) tratamento térmico; (—) ajuste do modelo Gompertz.

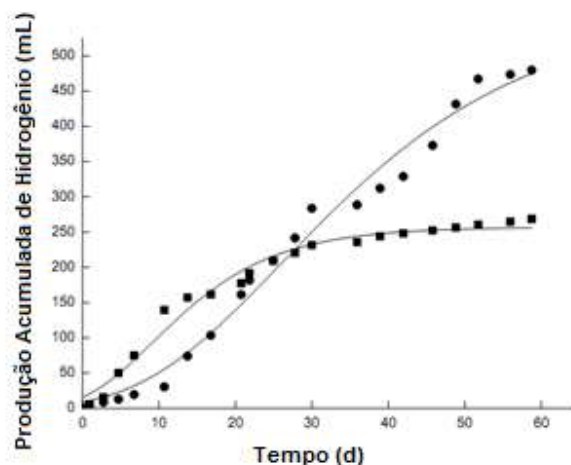


Tabela 5 – Parâmetros gerados a partir do modelo Gompertz, consumo de carboidratos, rendimento da produção de hidrogênio e pH.

Método de inibição	Parâmetros cinéticos do modelo Gompetz				Consumo de carboidratos (%)	HY (mol H ₂ /mol glucose)	pH
	P	R _m	λ	R ²			
	(mL)	(mL/h)	(h)				
Acetileno	256,96 ± 63,56	0,44 ± 0,09	6,05 ± 2,07	0,99	92,08 ± 0,12	0,45 ± 0,08	5,5 ± 0,3
Tratamento térmico	562,64 ± 49,39	0,47 ± 0,02	186,91 ± 61,62	0,98	93,31 ± 0,48	0,49 ± 0,09	5,1 ± 0,7

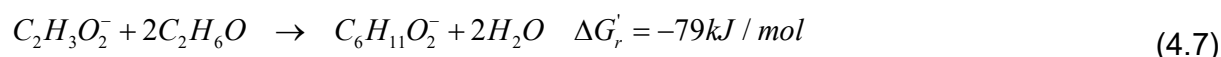
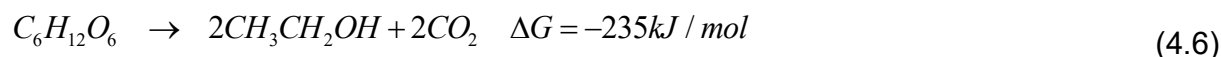
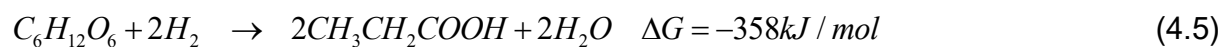
P – potencial máximo de produção de hidrogênio; R_m – taxa máxima de produção de hidrogênio; λ – intervalo de tempo (fase *lag*) necessário para o início da produção exponencial de hidrogênio; HY – rendimento de hidrogênio.

A análise da duração da fase *lag* (λ) (Tabela 5) mostra que o acetileno efetivamente inibiu a metanogênese com pequena influência sobre a atividade dos microrganismos produtores de hidrogênio, já que a produção de hidrogênio começou após 6 h. O acetileno atuou como um inibidor específico da metanogênese. A curta duração da fase *lag* utilizando acetileno também foi observada por Sparling et al. (1997), que relataram produção imediata de hidrogênio com inibição completa da

metanogênese. No caso do tratamento térmico, devido à sua não seletividade, os efeitos inibitórios também prejudicam os microrganismos que produzem hidrogênio, com fase *lag* que durou quase oito dias (187 h, Tabela 5). A duração da fase *lag* mais longa pode ser explicada pela esporulação de bactérias produtoras de hidrogênio.

Os resultados de HY (Tabela 5) foram semelhantes para ambos os métodos de inibição aplicada; em comparação com a eficiência de conversão teórica, os valores foram 11 e 12% para acetileno e tratamento térmico, respectivamente. Este resultado indicou que o desempenho da produção de hidrogênio, após a fase *lag*, foi semelhante entre as condições aplicadas. A conversão de carboidratos foi de 92%, HY foi de $0,45 \pm 0,08$ mol H₂/mol glicose, o HY específico foi $27,63 \pm 6,38$ mL H₂/g SV_{removido} e o teor de hidrogênio do biogás atingiu valor máximo de 21% com inibição por acetileno. Estes valores foram de 93%, $0,49 \pm 0,09$ mol H₂/mol glicose, $56,66 \pm 2,04$ mL H₂/g SV_{removido} e 22%, respectivamente, quando o inóculo foi submetido ao tratamento térmico. O pH (Tabela 5) variou num intervalo favorável à produção de hidrogênio e desfavorável à produção de metano, isto é, de 5,5 a 6,0 (Van Ginkel et al., 2001), o que pode ter contribuído para a ausência de metano no biogás.

Os principais metabólitos observados foram o etanol (EtOH) e os ácidos acético (HAc), butírico (HBu), propiônico (HPr) e capróico (HCa) (Figura 6). A produção dos ácidos acético e butírico estão vinculadas à produção de hidrogênio, já que 4 e 2 mols de hidrogênio são produzidos durante a formação de um mol de ácido acético e um mol de ácido butírico, respectivamente (Equações 1 e 2, respectivamente). Na formação do ácido propiônico é necessário o consumo de 2 mols de hidrogênio (Equação 3), sendo considerada uma rota indesejada quando se pretende maximizar a produção de hidrogênio. A rota metabólica do etanol não está vinculada à produção nem ao consumo de hidrogênio, porém pode ser considerada uma rota competitiva à produção de hidrogênio, já que utiliza o mesmo substrato (Equação 4). O ácido capróico é um ácido carboxílico de cadeia média (6 átomos de carbono) produzido a partir do consumo de ácido acético e etanol gerados na primeira fermentação pela rota de β -oxidação reversa (Equação 6). Esse ácido é considerado um produto de maior valor agregado do que os ácidos de cadeia curta e do que o metano (Grootscholten et al, 2013).

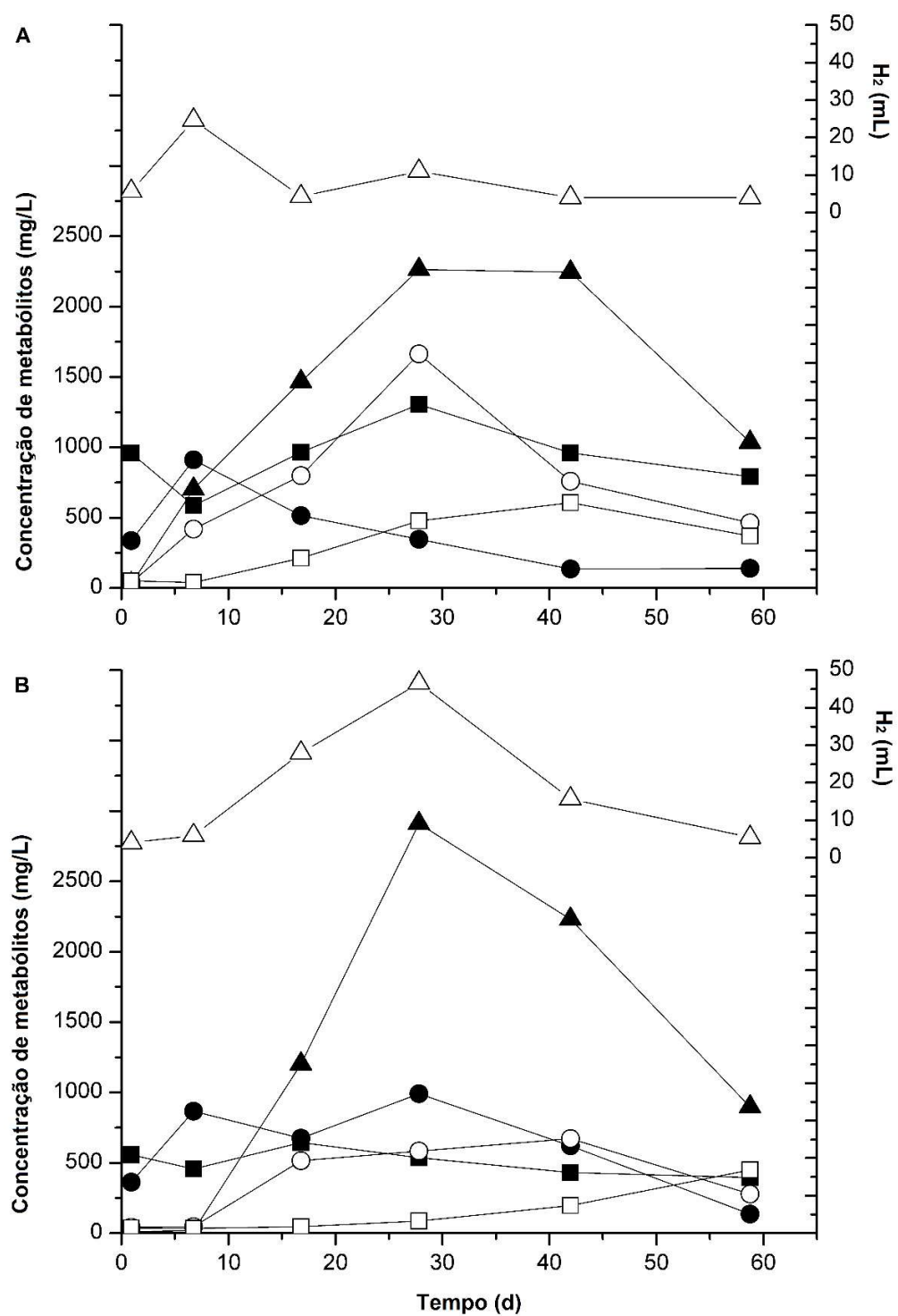


Conforme mostrado na Figura 6, a análise da distribuição de metabólitos indicou a predominância de ácido butírico, independentemente do método de inibição da metanogênese aplicado. A produção de ácido butírico está ligada à produção de hidrogênio (Equação 2) e é favorecida em pH entre 4,5 e 6,0 (Kim et al., 2004). Ao longo dos experimentos da Fase 1, o pH variou de 4,4 a 5,8 (Tabela 5), favorecendo assim a via metabólica da formação de ácido butírico.

O uso do acetileno gerou um aumento da produção de hidrogênio até o oitavo dia de operação (Figura 6), mas a partir de então, o volume diminuiu, tendo o hidrogênio sido consumido provavelmente para formação de ácido propiônico (Equação 3, Figura 6A). O aumento da produção de ácido acético (dia 28, Figura 6A) resultou do consumo de hidrogênio e dióxido de carbono pelas bactérias homoacetogênicas. Tais bactérias podem ser dos gêneros *Acetobacterium*, *Acetoanaerobium*, *Acetogenium*, *Butribacterium*, *Clostridium* e *Pelobacter* (Archer e Kirsop, 1990). O etanol foi produzido bem no início do experimento, atingindo aproximadamente 900 mg/L no dia 8 (Figura 6A), embora posteriormente tenha sido consumido (~800 mg/L) para formação de cerca de 540 mg/L de ácido capróico no dia 60.

Ambos os métodos de inibição da metanogênese aplicados no presente estudo provavelmente favoreceram o alongamento da cadeia de carbono já que a formação de metano compete com a produção de ácido capróico.

Figura 6 – Distribuição dos metabólitos (●) EtOH; (■) HAc; (▲) HBU; (○) HPr; (□) HCa; (Δ) H₂ ao longo do experimento para inibição da metanogênese utilizando (a) acetileno e (b) tratamento térmico.



A adoção do tratamento térmico resultou na dominância mais evidente da rota metabólica de formação de ácido butírico a partir da manipueira (Figura 6B). Ren et al. (2008) já indicavam que a produção de ácido butírico é favorecida pelos tratamentos por choque térmico e alcalino. No presente trabalho, a maior produção de ácido butírico e menor produção de ácido propiônico ao utilizar o tratamento térmico pode ser a causa do maior P relação ao tratamento utilizando o acetileno (Tabela 5). O etanol, nesse caso, só foi consumido a partir do dia 28, resultando na formação de ácido capríco. Nesse experimento 450 mg/L de ácido capríco foram gerados a partir do consumo de 850 mg/L de etanol (Figura 6B), ou seja, um rendimento teórico de 87% (Equação 6).

Como a inibição da metanogênese do inóculo 1 por tratamento térmico gerou um maior valor de P em relação ao uso do acetileno, esse método foi utilizado em experimentos da Fase 2.

Fase 2 – Influência do inóculo e da concentração do substrato na produção de hidrogênio

Produção de Hidrogênio

A Tabela 6 e a Figura 7 apresentam os resultados obtidos nos experimentos da Fase 2 quanto ao efeito dos tipos de inóculo e das concentrações de substrato na produção de hidrogênio. Comparando as condições experimentais com os três inóculos tratados termicamente, os maiores valores de P ($1183,91 \pm 61,49$ mL) e HY ($1,66 \pm 0,07$ mol H_2 /mol glicose) foram obtidos utilizando o rúmen bovino, o inóculo 2 (R), na concentração inicial em termos de DQO de manipueira de 20 g O_2 /L (condição R20). Os melhores resultados de P e do HY específico foram obtidos na ordem sequencial: R20 > R40 > R10 (Figura 7A, Tabela 6), indicando que a concentração inicial em termos de DQO de manipueira de 40 g de O_2 /L inibiu a produção de hidrogênio.

Resultados semelhantes foram observados utilizando o lodo municipal anaeróbio, o inóculo 1 (M), com o maior valor de P ($854,56 \pm 44,38$ mL) obtido para M20 (Tabela 6, Figura 7B); no entanto, o maior valor de HY ($0,84 \pm 0,12$ mol H_2 /mol glicose) foi obtido no experimento M10. Ambos os valores são inferiores aos observados para o inóculo 2

(R) nas mesmas condições de concentrações de DQO (R20 e R10, respectivamente). A inibição da produção de hidrogênio para DQO inicial de 40 g de O_2/L também foi observada ($P - M40 < P - M20$) (Figura 7B). Isso pode ser explicado pelo gás hidrogênio acumulado na fase líquida, que causa inibição de hidrogenase e baixo HY ($0,26 \pm 0,09$ mol H_2/mol glicose em M40) e HY específico ($18,31 \pm 1,72$ mL H_2/g $SV_{removido}$) (Van Ginkel e Logan, 2005).

Dificuldades no estabelecimento de uma concentração inicial ideal do substrato foram relatadas anteriormente, mesmo para substratos sintéticos (Zheng et al. 2008; Lee et al., 2008). Cappelletti et al. (2011) usaram cinco concentrações iniciais de DQO de manipueira (5, 7,5, 10,7, 15 e 30 g O_2/L) e observaram maior HY em concentrações mais baixas ($HY_{max} = 2,41$ mol H_2/mol de glicose com 5 g O_2/L). Além disso, de acordo com Van Ginkel et al. (2001), a redução das eficiências de conversão de hidrogênio resultantes do excesso de substrato pode promover a produção de álcoois, em vez de ácidos e hidrogênio. Esta hipótese pode ser aplicada no presente estudo já que foram observados maiores níveis de produção de etanol para DQO inicial de 40 g O_2/L em comparação aos experimentos com menores concentrações iniciais de DQO (Figuras 8, 9 e 10).

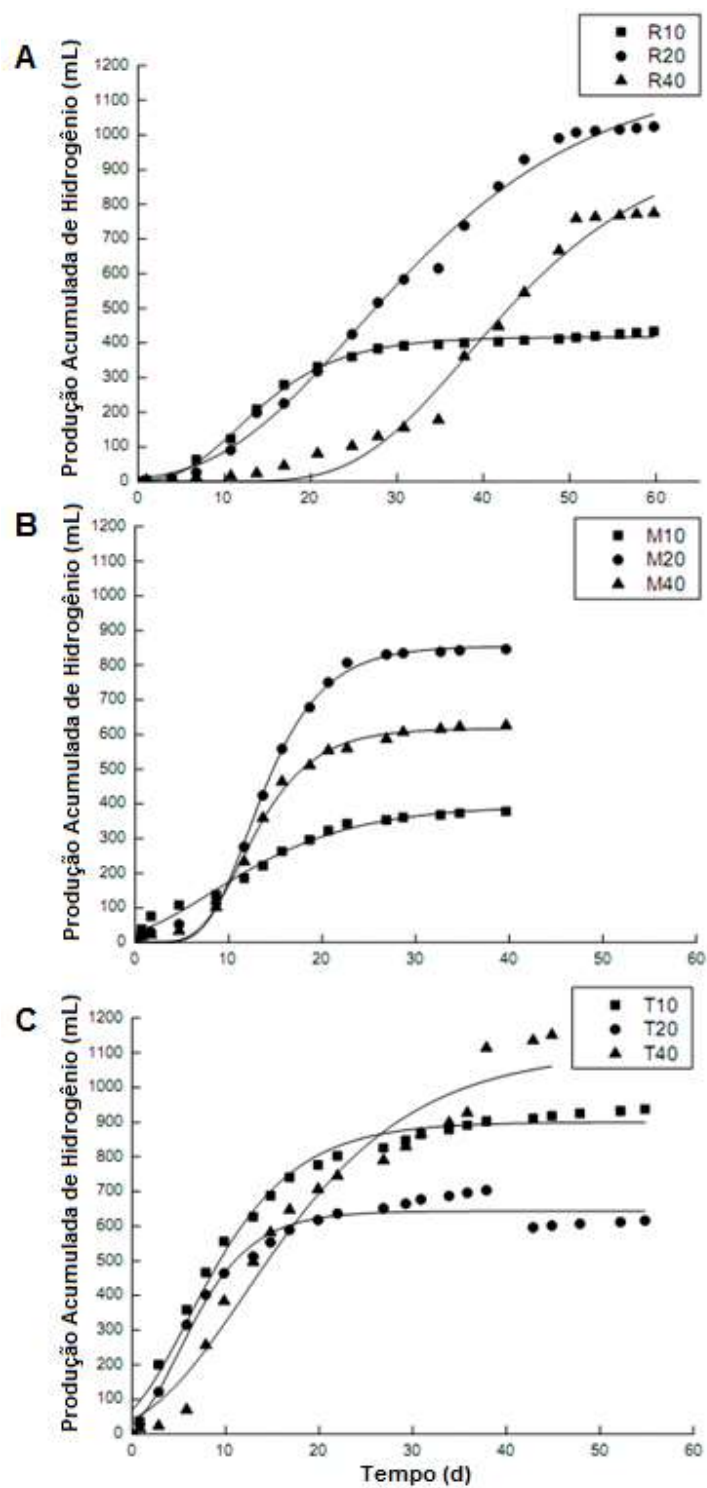
Tabela 6 – Parâmetros gerados a partir do modelo Gompertz, consumo de carboidratos, rendimento da produção de hidrogênio e pH em função do tipo do inóculo e da concentração inicial do substrato.

Condição operacional	Parâmetros cinéticos do modelo Gompertz				Consumo de carboidratos (%)	HY (mol H ₂ /mol glicose)	pH
	P (mL)	R _m (mL/h)	λ (h)	R ²			
M10	395,05 ± 47,13	0,70 ± 0,11	0	0,99	96,23 ± 0,00	0,84 ± 0,12	6,2 ± 0,8
M20	854,56 ± 44,38	2,98 ± 0,60	183,05 ± 26,14	0,99	95,12 ± 0,00	0,55 ± 0,17	6,4 ± 0,7
M40	617,00 ± 51,83	2,21 ± 0,63	165,39 ± 14,06	0,99	94,89 ± 0,00	0,26 ± 0,09	6,4 ± 0,6
R10	417,00 ± 40,73	0,97 ± 0,17	117,81 ± 16,42	0,99	94,60 ± 0,00	1,07 ± 0,10	6,3 ± 0,9
R20	1183,91 ± 61,49	1,15 ± 0,33	225,83 ± 42,50	0,99	74,09 ± 0,00	1,66 ± 0,07	6,7 ± 0,9
R40	988,09 ± 87,42	1,20 ± 0,10	609,98 ± 51,74	0,98	73,92 ± 0,02	0,61 ± 0,03	6,0 ± 0,7
T10	899,84 ± 113,86	2,17 ± 0,09	0	0,99	98,93 ± 0,00	1,30 ± 0,29	6,4 ± 0,4
T20	643,22 ± 105,33	2,26 ± 0,12	15,37 ± 5,89	0,97	98,88 ± 0,00	0,51 ± 0,10	6,5 ± 0,5
T40	1105,26 ± 193,46	1,65 ± 0,68	44,21 ± 4,18	0,96	98,82 ± 0,00	0,29 ± 0,05	6,6 ± 0,7

R – Rúmen bovino; M – Lodo de ETE municipal; T – Lodo têxtil

P – potencial máximo de produção de hidrogênio; R_m – taxa máxima de produção de hidrogênio; λ – intervalo de tempo (fase *lag*) necessário para o início da produção exponencial de hidrogênio; HY – rendimento de hidrogênio.

Figura 7 – Produção acumulada de hidrogênio ajustada ao modelo Gompertz em função do tipo de inóculo e da concentração inicial do substrato (■, ● e ▲, para 10, 20 e 40 gO₂/L, respectivamente), para os inóculos: (A) Rúmen bovino, (B) Municipal ; (C) Lodo têxtil.



No caso do inóculo 3, lodo têxtil (T), parece que o experimento com maior concentração de DQO de manipueira aplicada (T40) estimulou ligeiramente a produção de hidrogênio (Figura 7C). Os valores de P, HY e HY específico observados na condição experimental T40 foram $1105,26 \pm 193,46$ mL, $0,29 \pm 0,05$ mol H₂/mol glicose e $86,10 \pm 3,98$ mL H₂/g SV_{removido}, respectivamente (Tabela 6). O valor de P é muito próximo do encontrado para R20 ($1183,91 \pm 61,49$ mL) e o HY específico foi 21% superior ao observado em R20 ($71,05 \pm 0,97$ mL H₂/g SV_{removido}). Embora o experimento T10 tenha atingido um valor de P aproximadamente 19% menor do que o valor do experimento T40 ($1105,26 \pm 193,46$ mL), os melhores HY e HY específicos foram observados nessa condição ($1,30 \pm 0,29$ mol H₂/mol de glicose e $109,43 \pm 7,75$ mL H₂/g SV_{removido}, respectivamente). Ou seja, o experimento T10 apresentou o melhor HY específico e o segundo melhor HY comparando todas as condições experimentais.

No entanto, considerando que o uso de lodo têxtil resultou em menor duração da fase *lag* entre todos os experimentos da Fase 2, torna-se evidente a excelente capacidade de produção de hidrogênio dos microrganismos pretencentes ao gênero *Clostridium*, presentes no inóculo 3, conforme Köchling et al. (2017). Este inóculo mostrou uma vantagem significativa sobre os outros dois inóculos para concentração de DQO de 40 g O₂/L, com uma duração da fase *lag* de 44 h, que é 14 e 4 vezes inferior à R40 e M40, respectivamente. No entanto, a inibição também esteve presente em T40; se comparando sua fase *lag* com as obtidas em T10 e T20, 0 h e 15 h, respectivamente. Fica evidente que os microrganismos do gênero *Clostridium*, mesmo mais adaptados, também sentiram o efeito da alta carga aplicada a 40 g de O₂/L.

O melhor desempenho do rúmen na produção de hidrogênio pode ser justificado pela sua composição microbiana, que é principalmente relacionada à natureza do alimento de animais ruminantes, rico em material lignocelulósico. Os consórcios bacterianos do rúmen tem, em geral, afinidade com compostos lignocelulosicos e são produtores de biocombustíveis (Nocek e Russel, 1988). Os microrganismos presentes no rúmen foram descritos por Wang et al. (2010), que isolou três cepas microbianas durante a degradação anaeróbia da celulose com a produção de hidrogênio. Os referidos autores indicaram que os microrganismos do gênero *Ruminococcus* sp. seriam

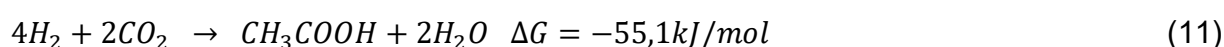
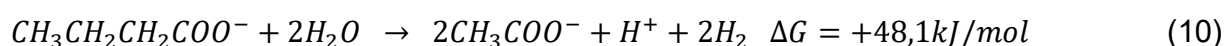
responsáveis pela degradação da matéria orgânica, enquanto os dos gêneros *Butyrivibrio sp.* ou *Succinivibrio sp.* (ou ambos) eram os produtores de hidrogênio. Chang et al. (2010) também avaliaram o desempenho do rúmen na produção de hidrogênio a partir de fontes celulósicas, relatando espécies do gênero *Clostridium sp.* como população dominante e responsável pela produção de hidrogênio. Isso indica a capacidade dos microrganismos presentes no rúmen para produção de hidrogênio. No entanto, a diferença na nutrição da vaca em comparação com a composição de manipueira pode justificar a duração da fase *lag* mais longa encontrada no rúmen. Uma vez que os microrganismos se adaptaram ao novo substrato, altas taxas de produção de hidrogênio foram alcançadas.

Razão semelhante explica a menor fase *lag* observada para a lodo têxtil, que é composto por aproximadamente 94% dos microrganismos como pertencentes ao gênero *Clostridium sp.* (Köchling et al., 2017). Além disso, os experimentos com maior concentração inicial de substrato inibiram a produção de hidrogênio (T20 e T40, Tabela 6) devido ao excesso de substrato, que causou acúmulo de álcoois em vez de ácidos e hidrogênio. A inibição da hidrogenase pelo acúmulo de hidrogênio nos reatores já foi observada em trabalhos anteriores (Van Ginkel et al., 2001, Van Ginkel e Logan, 2005).

Produção de ácidos carboxílicos

As Figuras 8, 9 e 10 mostram os resultados obtidos com os experimentos da Fase 2 quanto ao efeito dos tipos de inóculo e concentrações de substrato na produção de ácidos carboxílicos e outros metabólitos. A Figura 8 mostra as concentrações e a distribuição dos metabólitos e o desempenho da produção de hidrogênio ao longo dos experimentos R10, R20 e R40, usando o inóculo 2. A formação de ácido butírico ocorreu no início dos experimentos R10 e R20, mas o inverso foi observado após aproximadamente 20 dias de operação; o ácido butírico começou a ser consumido ao mesmo tempo que houve aumento da produção de ácido acético, que se tornou o metabólito predominante (Figuras 8A e 8B). No período entre os dias 20 a 35, houve consumo de hidrogênio (aproximadamente 47 e 61 mL para R10 e R20, respectivamente), reduzindo sua pressão parcial, tornando a conversão de ácido butírico

em ácido acético termodinamicamente favorável (Equação 10). Esta mudança de sentido de reação era esperada devido a diminuição da pressão parcial de hidrogênio observadas. Valores inferiores a 10^{-3} atm são considerados favoráveis (Harper e Pohland, 1986). Por sua vez, o consumo de hidrogênio pode ter ocorrido pela homoacetogênese, que é concomitante ao aumento da concentração de ácido acético (Equação 11), porque novamente, a baixa pressão parcial de hidrogênio favorece à sua formação (Agler et al., 2011).

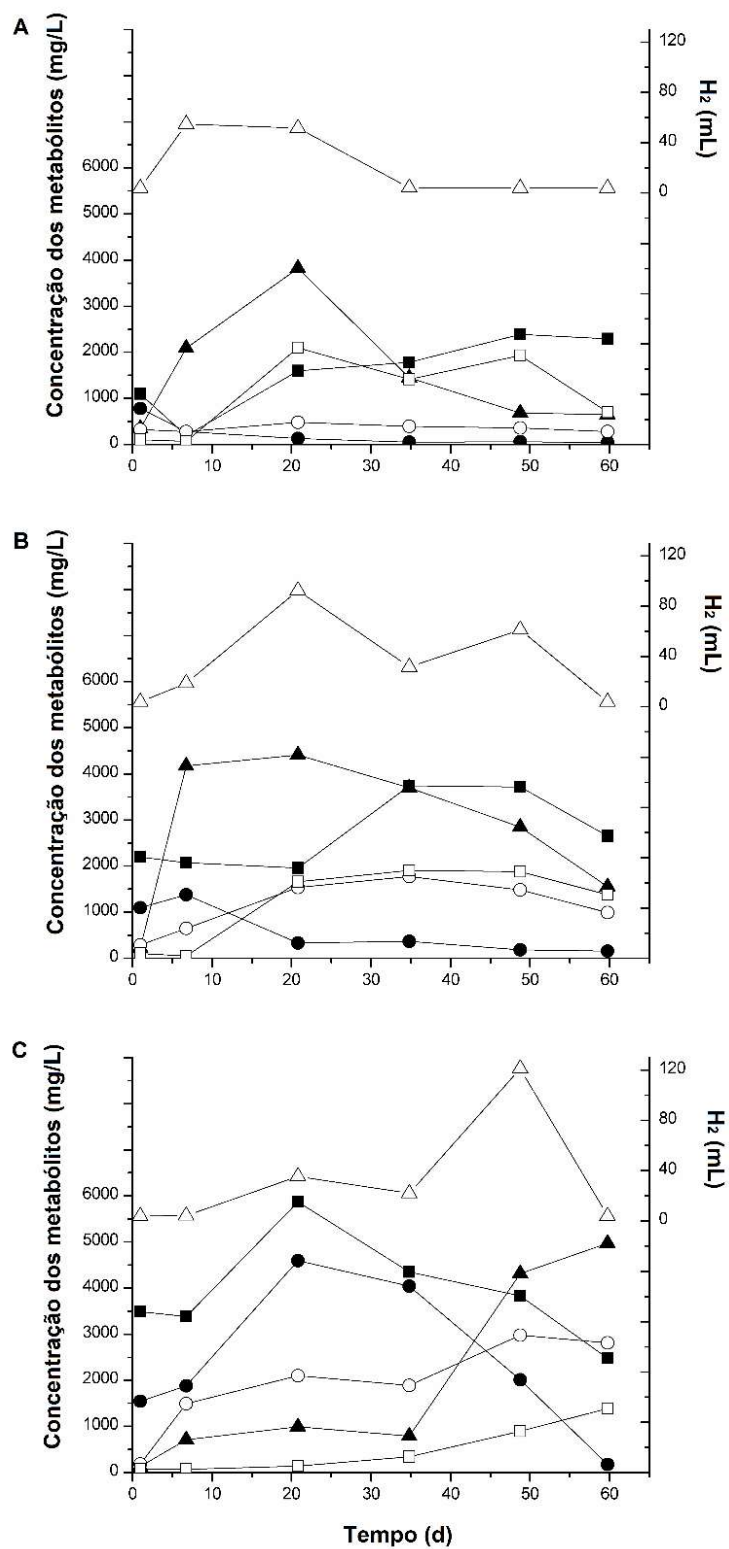


Na condição experimental R40 (Figura 8C), a rota metabólica de produção de ácido acético foi predominante até aproximadamente 30 dias de operação. A partir deste momento, o ácido acético começou a ser consumido e o butírico acumulou no meio. Este comportamento foi acompanhado pelo aumento da concentração de hidrogênio (entre os dias 30 e 50), indicando que a rota preferencial para produção de hidrogênio deve ter sido a do ácido butírico. A produção de etanol foi maior em R40 em comparação com R10 e R20 (Figuras 8A e 8B). Esse resultado pode explicar o menor valor de HY (Tabela 6) observado em R40, uma vez que a produção de etanol a partir de carboidratos (Equação 4) é competitiva à produção de hidrogênio (Equações 1 e 2), pois utiliza o mesmo substrato.

O ácido capróico foi gerado a partir de etanol e ácido acético (Equação 6) em todas as condições experimentais quando rúmen foi o inóculo, com acúmulo de 2,1; 1,9 e 1,4 g/L nas condições R10, R20 e R40, respectivamente. A menor concentração de ácido capróico, obtida na condição R40, ocorreu aparentemente pelo consumo de etanol para produção de ácido butírico (Equação 12). A produção de ácido butírico é considerada uma etapa intermediária do alongamento da cadeia de carbono para produção de ácido capróico.



Figura 8 – Distribuição dos principais metabólitos e produção de hidrogênio ao longo do experimento quando utilizado o rúmen como inóculo (**A** – R10; **B** – R20; **C** – R40): (●) EtOH; (■) HAc; (▲) HBu; (○) HPr; (□) HCa; (Δ) H₂.



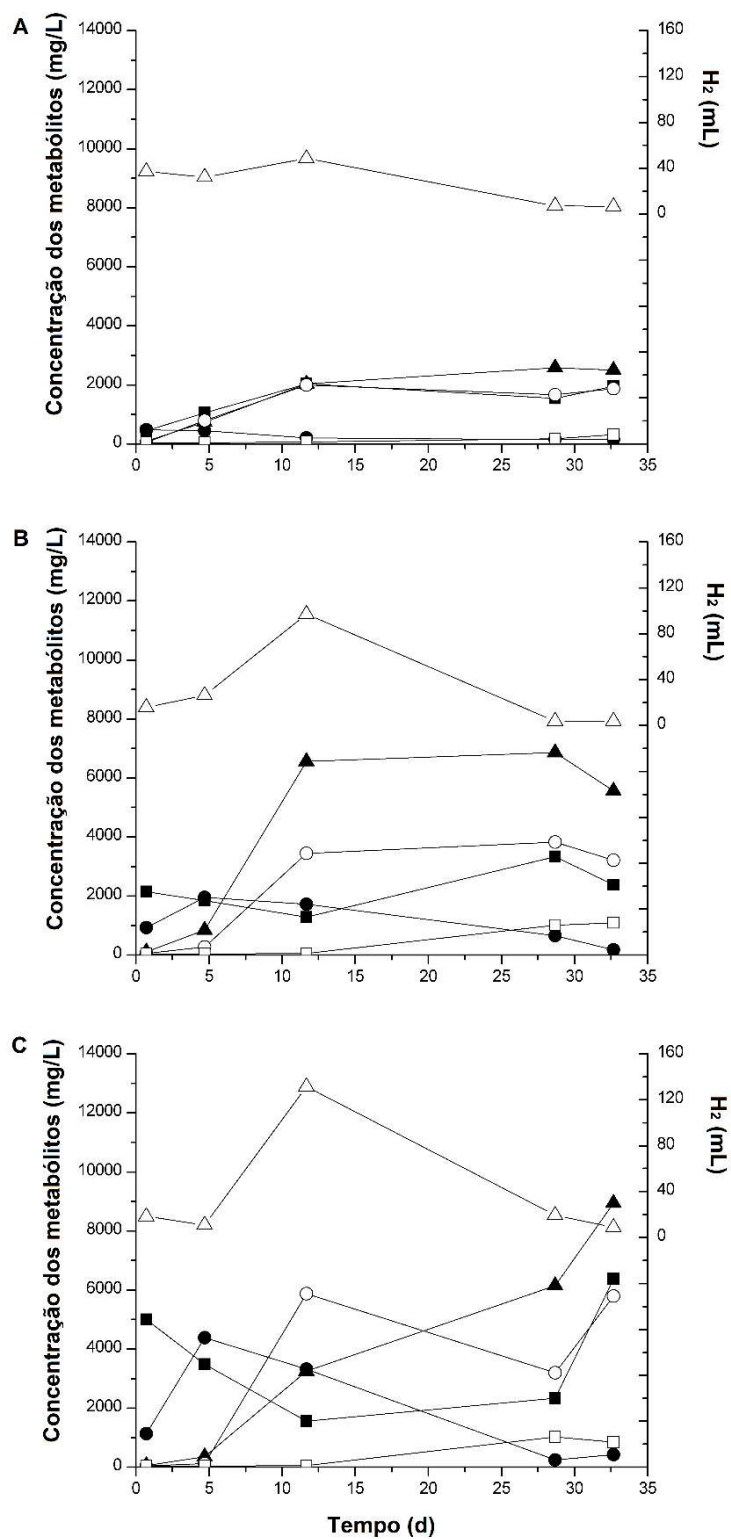
O rúmen tem sido considerado um bom inóculo quando se pretende atingir ambos os objetivos, de produção de hidrogênio (Wang et al., 2010) e de ácido capróico (Kenealy et al., 1995). Espécies conhecidas pela capacidade de produção de hidrogênio do gênero *Clostridium* sp. também são encontradas no rúmen (Ho et al., 2010). A produção de ácido capróico também pode ser justificada pela presença desses microrganismos no rúmen; Steinbusch et al. (2011) indicaram a presença de cerca de 50% de espécies do gênero *Clostridium* sp. durante a produção máxima de ácido capróico.

As Figuras 9 e 10 apresentam as concentrações e a distribuição dos metabólitos e o desempenho da produção de hidrogênio ao longo dos experimentos utilizando os inóculos 1 (M) e 3 (T), respectivamente. Desempenho semelhante em relação à acumulação de ácido acético após o consumo de hidrogênio ou acumulação simultânea de hidrogênio e ácido butírico foi observado nas concentrações iniciais de DQO de 20 g O₂/L (M20, T20) e 40 g O₂/L (M40, T40).

Quando o inóculo 1 (lodo de ETE Municipal) foi utilizado, o valor de P (Tabela 6) e o HY específico aumentou de M10 (395,05 ± 47,13 mL e 35,03 ± 4,11 mL H₂/g SV_{removido}, respectivamente) para M20 (854,56 ± 44,38 mL e 49,89 ± 6,33 mL H₂/g SV_{removido}, respectivamente), mas diminuiu em M40 (617,00 ± 51,83 mL e 18,31 ± 1,72 mL H₂/g SV_{removido}, respectivamente), semelhante aos valores de P e HY específico obtidos nos experimentos com rúmen (inóculo 2).

A duração da fase *lag* foi mais curta (Tabela 6), sem fase *lag* para M10, ao se comparar com os experimentos em que rúmen foi o inóculo. O rendimento da produção de hidrogênio para M10 (HY = 0.84 ± 0,12 mol H₂/mol glicose, Tabela 6) foi 1.5 e 3.2 vezes superior ao observado para M20 e M40, respectivamente. A média de consumo de carboidratos foi de 95% em todos os experimentos em que lodo de ETE Municipal foi utilizado. A Figura 9 mostra o acúmulo de ácido propiônico em maior proporção nesse experimento em comparação aos experimentos que utilizaram os inóculos 2 e 3. Esse fato justifica o menor HY em relação ao rúmen (Tabela 6).

Figura 9 – Distribuição dos principais metabólitos e produção de hidrogênio ao longo do experimento quando utilizado lodo de ETE municipal como inóculo (**A** – M10; **B** – M20; **C** – M40): (●) EtOH; (■) HAc; (▲) HBu; (○) HPr; (□) HCa; (Δ) H₂.



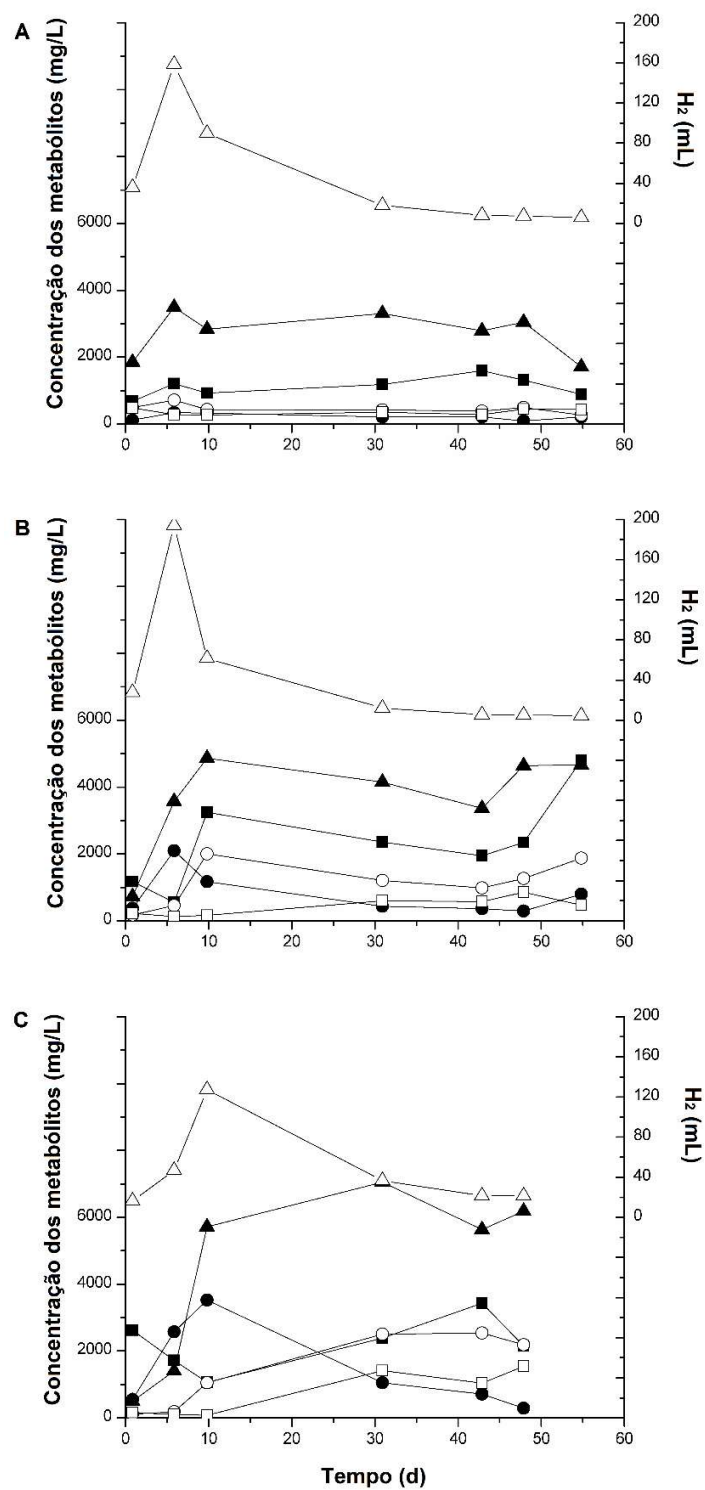
Ácido capróico também foi detectado em menores concentrações (319,10; 1097,35 e 1025,56 mg/L para M10, M20 e M40, respectivamente). Isso pode ter ocorrido devido à característica metanogênica desse inóculo que tratava água residuária municipal. Um estudo da diversidade microbiana deste lodo mostrou predominância de microrganismos metanogênicos hidrogenotróficos nesse lodo, pertencentes à ordem *Methanomicrobiales* para o Domínio *Archaea* (Lucena et al., 2011).

A utilização do lodo têxtil, inóculo 3, resultou nas menores durações de fase *lag* entre os inóculos testados (Tabela 6). O maior HY e HY específico foi na condição T10 ($1,30 \pm 0,29$ mol H₂/mol glicose e $109,43 \pm 7,75$ mL H₂/g SV_{removido}, respectivamente), acompanhado pelo acúmulo predominante dos ácidos butírico e acético em relação aos outros metabólitos e ao etanol (Figura 10).

Os reatores que apresentaram produção mais expressiva de ácido propiônico e etanol (T20 e T40, Figuras 10B e 10C, respectivamente) apresentaram também os menores rendimentos de hidrogênio ($0,51 \pm 0,10$ e $0,29 \pm 0,05$ mol H₂/mol glicose, respectivamente) e HY específico ($38,55 \pm 5,27$ e $86,10 \pm 3,89$ mL H₂/g SV_{removido}, respectivamente), ou seja, rotas metabólicas que consomem hidrogênio (acúmulo de ácido propiônico), ou que consomem o substrato que poderia ser utilizado para produção de hidrogênio (acúmulo de etanol), podem justificar os menores rendimentos. O consumo de carboidratos foi maior quando utilizado o lodo têxtil, atingindo 99% nas três condições aplicadas (T10, T20 e T40, Tabela 6).

O inóculo 3 era composto por 94% de microrganismos do gênero *Clostridium ss.* (Köchling et al., 2016) o que pode explicar o desempenho dos experimentos, especialmente sob condições mesofílicas prevalentes no presente estudo. Além disso, o pré-tratamento térmico do inóculo favorece a seleção de microrganismos formadores de esporos, como os do gênero *Clostridium* (O-Thong et al., 2008). O menor valor de P observado para o lodo têxtil na condição T20, diverge do comportamento das condições R20 e M20, nas quais foram obtidos os maiores valores de P para cada inóculo individualmente (Tabela 6). Comparando as três condições, observou-se que a produção de hidrogênio na condição T20 (Figura 10B) cessou mais rapidamente do que nas condições R20 (Figura 8B) e M20 (Figura 9B).

Figura 10 – Distribuição dos principais metabólitos e produção de hidrogênio ao longo do experimento quando utilizado lodo têxtil (**A** – T10; **B** – T20; **C** – T40): (●) EtOH; (■) HAc; (▲) HBU; (○) HPr; (□) HCa; (Δ) H₂.



Isso pode ter ocorrido pelo consumo de hidrogênio para produção do ácido propiônico (Equação 3) em T20. Além disso, o aumento da concentração de ácido acético coincide com consumo de hidrogênio (dia 10, Figura 10B), indicando a possibilidade da produção deste ácido pelas bactérias homoacetogênicas (Equação 11).

No geral, os resultados dos experimentos da Fase 2 mostraram que, primeiramente, o tratamento térmico inibiu eficientemente a metanogênese. Em termos de produção de hidrogênio, o lodo têxtil apresentou adaptação mais rápida, enquanto que o rúmen bovino demorou mais para adaptar-se. No entanto, após adaptado, foi com rúmen que os melhores rendimentos de produção de hidrogênio foram obtidos. O aumento da concentração do substrato aparentemente causou inibição do rendimento de produção de hidrogênio - HY. A única condição em que HY não diminuiu (com o aumento da concentração inicial de substrato) foi quando se aumentou de 10 g O₂/L para 20 g O₂/L o teor de DQO, quando o rúmen foi adotado como inóculo.

Conclusões

Os experimentos com acetileno e tratamento térmico mostraram que ambos foram muito efetivos na inibição da metanogênese, resultando em nenhuma produção de metano. Os rendimentos de hidrogênio por ambos os métodos foram semelhantes, $0,45 \pm 0,08$ e $0,49 \pm 0,09$ mol H₂/mol glicose para o acetileno e tratamento térmico, respectivamente. No entanto, a inibição da metanogênese por tratamento térmico resultou em maior potencial de produção de hidrogênio ($562,64 \pm 49,39$ mL) do que o acetileno ($256,96 \pm 63,56$ mL). O ácido butírico foi o metabólito predominante, independentemente do método de inibição da metanogênese aplicada. Em geral, o aumento da concentração inicial da manipueira (10, 20 e 40 g O₂/L) promoveu diminuição da produção de hidrogênio. A única exceção ocorreu quando o rúmen bovino foi adotado como inóculo e a concentração inicial da manipueira aumentou de 10 para 20 g O₂/L. O melhor HY foi observado para o rúmen e concentração inicial de 20 g de O₂/L (HY = $1,66 \pm 0,07$ mol H₂/mol de glicose), atingindo 42% da eficiência de conversão teórica máxima. No entanto, HY específico ($71,05 \pm 0,97$ mL H₂/g SV_{removido}) foi menor do que no

experimento T10 ($109,43 \pm 7,75$ mL H_2 /g SV_{removido}), que apresentava predominância de microrganismos produtores de hidrogênio. Os principais metabólitos observados foram o etanol e ácidos acético, butírico, propiônico e capróico. Em todas as condições testadas, a formação de ácido capróico sugeriu que o alongamento da cadeia de carbono foi favorecido em relação à metanogênese. O aumento da concentração inicial em termos de DQO da manipueira, de 10 a 40 g de O_2 /L, resultou em maior duração da fase de adaptação dos microrganismos. No entanto, o tipo de inóculo teve um efeito mais forte na duração da fase *lag* do que a concentração do substrato. O lodo têxtil anaeróbio, rico em *Clostridium* sp., resultou em uma adaptação mais rápida, enquanto que quando rúmen bovino foi utilizado, tempo mais longo de adaptação foi requerido.

4.2 ARTIGO 2: PRODUÇÃO DE ÁCIDO CAPRÓICO POR ALONGAMENTO DA CADEIA DE CARBONO DURANTE A PRODUÇÃO FERMENTATIVA DE HIDROGÊNIO A PARTIR DA MANIPUEIRA

Resumo

A produção de biohidrogênio a partir de resíduos é acompanhada por acumulação de ácidos orgânicos e álcoois. O alongamento da cadeia de carbono é uma alternativa para a produção de ácidos graxos de cadeia média a partir da fermentação secundária de etanol e ácido acético. A associação da produção de hidrogênio com o alongamento da cadeia de carbono possibilita o tratamento de resíduos, geração de bioenergia e produção de produtos químicos de valor agregado associado. A manipueira é um resíduo líquido gerado durante o processamento da mandioca (*Manihot esculenta Crantz*) para produção de farinha, fécula ou povilho. É um resíduo com elevado potencial poluidor e seu descarte sem tratamento prévio resulta em grande impacto ambiental devido à elevada concentração de matéria orgânica e teor de cianeto. Neste trabalho, a manipueira foi avaliada quanto à produção de hidrogênio e posterior produção de ácido capróico a partir do alongamento da cadeia de carbono de acetato, com adição externa de etanol como doador de elétrons. Os reatores em batelada foram alimentados com manipueira diluída até atingir as concentrações, em termos de Demanda Química Oxigênio (DQO), de 10 e 20 g de O₂/L (experimentos A10 e A20). O pH inicial foi de 5,5 para inibir o crescimento de microrganismos metanogênicos que poderiam vir a consumir o hidrogênio. Os reatores auto-fermentativos foram operados a 40 ± 1 °C. Os rendimentos da produção de hidrogênio foram 1,01 e 1,98 mol H₂/mol glicose para A10 e A20, respectivamente. Os principais metabólitos observados foram o etanol e os ácidos acético, butírico, propiônico e capróico. O alongamento da cadeia de carbono foi realizado por adição estequiométrica de etanol e ajuste de pH para 7,0. A concentração máxima de ácido capróico foi de 4,2 e 7,2 g/L para A10 e A20, respectivamente. Onde 84% e 90%, respectivamente, dessa concentração foi proveniente do processo de alongamento da cadeia de carbono.

Introdução

A produção de hidrogênio por fermentação ocorre durante a fase acidogênica da digestão anaeróbia. Nessa fase também ocorre a conversão de resíduos orgânicos complexos em ácidos orgânicos e álcoois (Valdez-Vazquez e Poggi-Varaldo, 2009; Wang e Wan, 2009). Para evitar o consumo de hidrogênio pelos processos de acetogênese e metanogênese hidrogenotrófica, em geral, são adotados métodos e condições operacionais (tratamento do inóculo e pH) que favoreçam a produção de hidrogênio (Van Ginkel et al., 2001; Wang e Wan, W. 2009a).

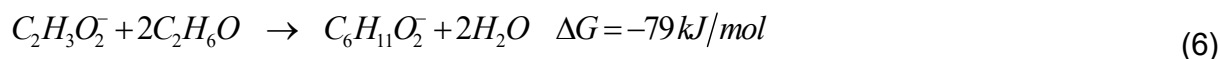
Com a adoção de medidas de inibição da metanogênese e o acúmulo de ácidos orgânicos e álcoois, a formação de ácidos orgânicos de cadeia média, como caproato, valerato e heptanoato, começou a ser observada nos estudos que tinham como objetivo a produção de hidrogênio (Ding et al., 2010).

O alongamento da cadeia de carbono tem se tornado uma opção interessante por seus produtos, ácidos carboxílicos de cadeia média, possuírem aplicações diretas como antimicrobianos, alimentação animal e inibidores de corrosão (Agler et al., 2011; Kim e Rhee, 2013), e aplicações indiretas, como precursores da produção de biodiesel, de bioplásticos e de produtos químicos (Marshall et al., 2013).

Além disso, os ácidos carboxílicos de cadeia média, por terem uma cadeia de carbono mais longa, hidrofóbica, com proporção oxigênio-carbono menor (de 0,33 a 0,25) do que os carboxilatos de cadeia curta, são mais fáceis de serem extraídos do caldo de fermentação (por meio de extração líquido-líquido, cristalização, permuta iônica ou eletrodiálise), sendo intermediários de interesse da indústria química (Steinbusch et al., 2011; Huang e Ramaswamy, 2013).

Dentre os produtos intermediários com valor agregado associado, observa-se que o ácido capróico é o principal produto gerado a partir do alongamento da cadeia carbônica. A formação do ácido capróico ocorre principalmente através da rota de β -oxidação reversa do ácido acético com etanol (Equação 6), sendo esta a rota mais relatada em estudos que visam o alongamento da cadeia de carbono. Neste caso, o

ácido acético funciona como substrato e o etanol atua como doador de elétrons (Steinbusch et al., 2008).



A utilização de etanol, que é um combustível, para converter o ácido acético gerado na primeira fermentação em ácido capróico é justificada pelo aumento da quantidade total de energia a ser recuperada a partir da biomassa. O poder calorífico de 1 mol de ácido capróico (3452 kJ) é mais elevado do que o poder calorífico dos 2 mols de etanol (2638 kJ), requeridos para produzir ácido capróico. Dessa forma, o poder calorífico do ácido capróico combinado com a extração mais simples torna o alongamento da cadeia de carbono uma opção atrativa (Steinbusch et al., 2011).

Porém, viabilidade econômica da produção sustentável de produtos químicos depende do desenvolvimento de rotas de separação mais seletivas, eficientes e curtas, já que a maior parte do custo de fabricação de produtos químicos valiosos a partir da bioconversão de resíduos agrícolas e alimentares estão concentrados nas etapas de separação e purificação dos produtos gerados (Karumanchi et al., 2000).

Para Spirito et al. (2014) quando a produção de ácidos carboxílicos de cadeia média a partir de uma comunidade microbiana se tornar viável economicamente, um novo mercado se abrirá e a comercialização de ácido capróico produzido de forma sustentável substituirá a produção realizada por métodos petroquímicos.

A manipueira é um resíduo líquido gerado no processamento da mandioca (*Manihot esculenta Crantz*), que é um produto agrícola tipicamente brasileiro. Sua produção é de aproximadamente 6 litros de manipueira por quilograma de mandioca processada. Por ser um resíduo rico em carboidratos (20-40 g/L), a manipueira é considerada atrativa para produção fermentativa de hidrogênio (Cappelletti et al., 2011). Vários trabalhos utilizaram a manipueira na produção de hidrogênio (Cappelletti et al., 2011; Intanoo et al., 2016; Rosa et al., 2016), porém ainda não foi realizado o alongamento da cadeia de carbono como etapa posterior à produção de hidrogênio utilizando esse resíduo.

A produção de ácido capróico como etapa posterior à produção de hidrogênio ao invés da produção de metano pode ser justificada pela aplicação mais restita do biogás (principalmente como biocombustível gasoso) em comparação às aplicações do ácido capróico (que tem uma vasta aplicação direta e indireta na indústria). Além disso, há a necessidade de utilização do biogás diretamente no local produzido para tornar o processo economicamente viável. Dessa forma, o valor agregado associado ao átomo de carbono do metano é menor que o do ácido capróico (Grootscholten et al, 2013).

Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a produção de ácido capróico durante a autofermentação da manipueira para produção de hidrogênio, e promover o alongamento da cadeia de carbono como etapa posterior à produção de hidrogênio através da adição de etanol no meio.

Material e métodos

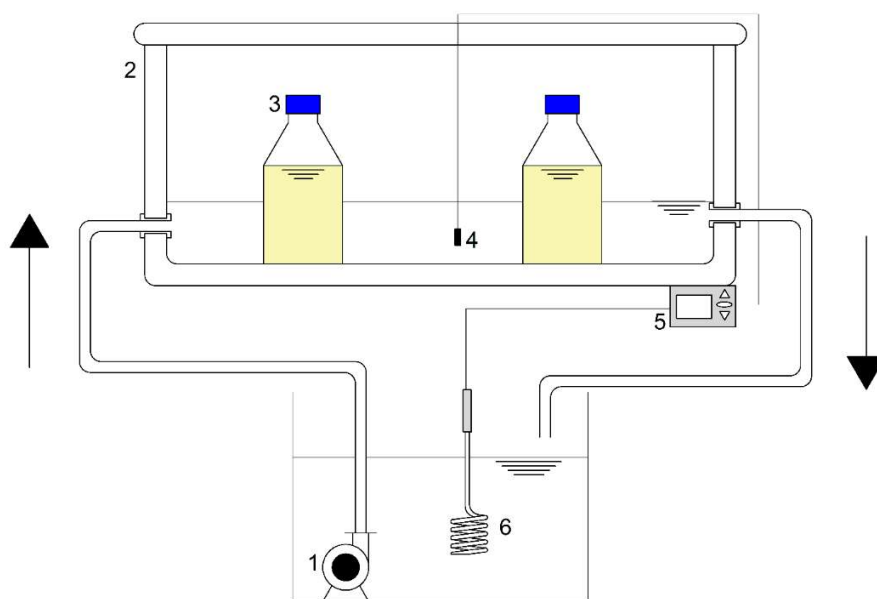
Meio fermentativo

O meio fermentativo foi constituído por manipueira, proveniente de uma fábrica de farinha de mandioca (Taquarana, Alagoas, Brasil). A manipueira bruta possuía as seguintes características: pH 5,5, sólidos totais 103,28 g ST/L, sólidos voláteis de 75,82 g STV/L, carboidratos totais 87,08 g glicose/L, demanda química de oxigênio (DQO) 91,30 g O₂/L. Os seguintes nutrientes foram adicionados ao meio fermentativo (mg/L): CH₄N₂O (6,00); NiSO₄.6H₂O (0,15); FeSO₄.7H₂O (0,75); FeCl₃.6H₂O (0,075); CoCl₂.2H₂O (0,012); CaCl₂.6H₂O (0,618); SeO₂ (0,0108); KH₂PO₄ (1,608); K₂HPO₄ (0,39); Na₂HPO₄.2H₂O (0,828) (Fernandes et al., 2010).

Procedimento Experimental

A Figura 11 apresenta o esquema ilustrativo do aparato experimental. Uma caixa térmica de isopor de 180 L, impermeabilizada com manta líquida branca quartzolit (impermeabilizante elastomérico) (Weber Saint-Gobain do Brasil Produtos Industriais e para construções LTDA, Jandira, São Paulo – Brasil), funcionou como banho térmico para manter a temperatura de operação dos reatores. Água de torneira era aquecida (aquecedor elétrico Granlux) em um reservatório de 50 L e recirculada (bomba submersa do tipo Resun S-1000 – Guangdong, China) para manter a temperatura do banho térmico em $40 \pm 1^\circ\text{C}$ (controlador de temperatura digital FullGalse modelo MT-512RI plus – Canoas, Rio Grande do Sul, Brazil).

Figura 11 – Esquema do banho térmico: 1 – bomba submersa; 2 – caixa térmica de isopor; 3 – frascos reatores; 4 – sensor de temperatura; 5 – controlador de temperatura digital; 6 – aquecedor elétrico.



Monitoramento e operação

Foram utilizados frascos de vidro Duran® Schott (Wertheim, Main, Alemanha) como reatores, que foram vedados com rolhas de butila e tampa plástica para garantir ambiente anaeróbio. O volume total de cada reator foi de 2,3 L e o volume reacional foi de 1,725 L. O ensaio foi realizado em batelada única, em duplicata. A produção de hidrogênio, distribuição dos metabólitos e o alongamento da cadeia de carbono foram avaliados a partir do processo de autofermentação da manipueira. Duas concentrações iniciais de substrato (em termos de DQO) foram aplicadas 10 g O₂/L (experimento A10) e 20 g O₂/L (experimento A20), a partir da diluição da manipueira com água de torneira. O pH inicial foi 5,5, porém quando a fase acidogênica foi finalizada, o pH foi ajustado para 7,0 para promover o adequado início do alongamento da cadeia de carbono para produção de ácido capróico. Os ajustes do pH foram realizados com soluções de NaOH 2M ou HCl 2M utilizando seringa descartável.

Para realizar o alongamento da cadeia de carbono, etanol foi injetado nos reatores utilizando uma seringa descartável. O volume de etanol injetado foi determinado pela diferença estequiométrica obtida a partir da Equação 6, em função da concentração de ácido acético e etanol medida no meio.

Os reatores foram operados por aproximadamente 190 dias e o monitoramento foi realizado a partir das seguintes análises: DQO, pH, carboidratos, ácidos orgânicos voláteis e álcoois, e conteúdo do biogás. As amostras líquidas foram coletadas através uma seringa descartável, com flambagem da rolha de butila.

DQO e pH foram analisados de acordo do metodologia descrita no Standard Methods for Water and Wastewater Examination (2012). A concentração de carboidratos foi medida a partir da metodologia desenvolvida por Dubois et al. (1956). Já a concentração dos ácidos orgânicos e álcoois foram determinadas por cromatografia gasosa (modelo Shimadzu GC-2010-Plus), utilizando detector de ionização de chama, e método descrito por Moraes et al. (2000). A coluna utilizada foi a HP-INNOWAX (30 m de comprimento, diâmetro interno de 0,25 mm e 0,25 mm de espessura de filme).

Hidrogênio no biogás foi medido usando o mesmo cromatógrafo a gás (Shimadzu GC-2010-Plus), com detector de condutividade térmica e argônio como gás de arraste. As temperaturas do injetor, detector e coluna foram mantidas a 30 °C, 200 °C e 230 °C, respectivamente. A coluna utilizada foi a Supelco Carboxen 1010 (30 m de comprimento e diâmetro interno de 0,53 mm).

Parâmetros cinéticos

O modelo de regressão de Gompertz (Equação 8) foi utilizado para determinar o potencial de produção de hidrogênio, a taxa máxima de produção de hidrogênio e a duração da fase de adaptação (fase *lag*) (Chen et al., 2006).

$$H(t) = P \exp \left\{ -e \exp \left[\frac{R_m}{P} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (8)$$

Onde:

$H(t)$ é a produção acumulada de hidrogênio (mL);

P é o potencial máximo de produção de hidrogênio (mL H_2 /L_{reacional});

R_m é a taxa máxima de produção de hidrogênio (mL/h);

λ é o intervalo de tempo necessário para o início da produção exponencial de hidrogênio (h);

t é o tempo (h);

e é constante adimensional de Euler (2,718).

O rendimento da produção de hidrogênio (HY) foi determinado através da Equação 9, que relaciona a quantidade de hidrogênio produzida com a quantidade de glicose consumida.

$$HY = \frac{\text{Quantidade (mol) de } H_2 \text{ produzido}}{\text{Quantidade (mol) de glicose consumida}} \quad (9)$$

A eficiência de conversão teórica de hidrogênio foi determinada considerando a produção máxima de hidrogênio de 4 mol H_2 /mol glicose obtida pela rota metabólica do ácido acético (Equação 1 – Amorim et al., 2012).



Resultados e discussão

Produção de hidrogênio a partir da manipueira

A Tabela 7 apresenta os parâmetros gerados a partir do modelo Gompertz, o consumo de carboidratos, o rendimento da produção de hidrogênio e o pH, obtidos ao longo do período experimental.

Tabela 7 – Parâmetros gerados a partir do modelo Gompertz, consumo de carboidratos, rendimento da produção de hidrogênio e pH

Condição experimental	Parâmetros cinéticos do modelo Gompetz				Consumo de carboidratos (%)	HY (mol H ₂ /mol glicose)	pH
	P	R _m	λ	R ²			
	(mL H ₂ /L _{reacional})	(mL/h)	(h)				
A10	497	1,69	22	0,99	98	1,01	6,7 ± 0,6
A20	2471	2,01	187	0,99	97	1,98	6,6 ± 0,8

P – potencial máximo de produção de hidrogênio; R_m – taxa máxima de produção de hidrogênio; λ – intervalo de tempo (fase *lag*) necessário para o início da produção exponencial de hidrogênio; HY – rendimento de hidrogênio.

Os maiores valores do potencial de produção de hidrogênio (P) foram obtidos quando a concentração inicial do substrato foi igual a 20 g O_2 /L (2.471 mL H_2 /L_{reacional} ou

4.262 mL H₂). A taxa de produção de hidrogênio (R_m) passou de 1,69 para 2,01 mL/h quando a concentração inicial da manipueira aumentou de 10 para 20 g O₂/L. Enquanto que o conteúdo máximo de hidrogênio no biogás aumentou de 16% para 27%, para A10 e A20, respectivamente.

O valor de P obtido neste trabalho para A10 foi 830% superior ao valor encontrado por Cappelletti et al. (2011), igual a 92,20 mL, quando os autores utilizaram concentração inicial de manipueira de 10,7 g/L e operaram reator em batelada a 36 °C. No entanto, a taxa de produção de hidrogênio obtida pelos autores foi igual a 25,9 mL H₂/h, que foi 93% superior à obtida na condição A10 do presente trabalho, e é creditada ao uso de cultura pura de *Clostridium acetobutylicum*.

Por outro lado, Lucas et al. (2015) obtiveram valor de P igual a 97,85 mL, valor próximo ao obtido por Cappelletti et al. (2011) e 776% inferior ao obtido na condição A10 do presente trabalho. Os autores (Lucas et al., 2015) utilizaram concentração inicial de manipueira de 3 g/L em reator em batelada operado a 37 °C, inoculado com cultura mista anaeróbia proveniente de reator UASB que tratava resíduos de matadouro de aves. Apesar de terem obtido potencial (P) próximo àquele observado por Cappelletti et al. (2011), a taxa de produção de hidrogênio foi inferior ($R_m = 0,32$ mL/h) (Lucas et al., 2015) e parece indicar que o uso de inóculo especializado, como *Clostridium*, tem mais influência na taxa de produção de hidrogênio do que no próprio potencial de produção, como também indicam os resultados do presente trabalho em que nenhum inóculo foi utilizado.

É importante destacar que o alto potencial de produção de hidrogênio observado no presente trabalho deve ter sido favorecido pela temperatura mais elevada (40 ± 1 °C) do que a utilizada pelos citados autores (36 °C – Cappelletti et al., 2011; 37 °C – Lucas et al., 2015), já que o aumento da temperatura facilita a separação do biogás da fase líquida (Metcalf e Eddy, 1979). A característica da manipueira também pode ter influenciado a produção de hidrogênio, já que esse resíduo apresenta característica variável.

O processo de autofermentação resultou em rendimentos de produção de hidrogênio de 1,01 e 1,98 mol H₂/mol glicose, para concentração inicial de DQO da manipueira de 10 e 20 g O₂/L, respectivamente. Destaca-se que para a condição A20, a

produção de hidrogênio atingiu 50% do valor teórico (considerando o rendimento máximo de 4 mol H₂/mol glicose obtido a partir da rota metabólica do ácido acético, equação 1), o que é extremamente satisfatório para um reator que não foi inoculado.

Penteado et al. (2013) compararam o desempenho da autofermentação de água residuária sintética a base de sacarose (DQO inicial de 2 g/L) em relação ao uso de inóculos anaeróbios provenientes de reatores UASB que tratavam resíduos de abatedouro de aves e resíduos da suinicultura. Choque térmico e ácido foram utilizados pelos autores como forma de inibição do desenvolvimento de microrganismos consumidores de hidrogênio. Segundo os autores, o rendimento da produção de hidrogênio para autofermentação (HY = 2,1 mol H₂/mol sacarose) foi compatível com o obtido quando lodo de reator anaeróbio pré-tratado termicamente foi utilizado (HY = 2,0 mol H₂/mol sacarose). Os resultados do presente trabalho (HY = 1,98 mol H₂/mol glicose) também indicam que a autofermentação é uma alternativa interessante, uma vez que dispensa a etapa de pré-tratamento do inóculo.

As Figuras 12 e 13 apresentam os principais metabólitos produzidos durante a fermentação nas condições experimentais A10 e A20, respectivamente. A fase acidogênia na condição A10 durou aproximadamente 55 dias e os principais metabólitos observados foram os ácidos acéticos, butírico, propiônico e capróico, além do etanol.

Os resultados obtidos no experimento A10 indicam que o hidrogênio acumulou no meio nos primeiros 14 dias (com produção máxima de 117 mL de H₂ no dia 7 – Figura 12). A concentração dos ácidos acético e butírico aumentou significativamente entre o dia 1 e o dia 21, quando passou de 151 para 1330 mg/L, para o acético, e de 223 para 1496 mg/L, para o butírico. Esses resultados indicam que a produção de hidrogênio ocorreu por meio das rotas apresentadas nas equações 1 e 2, respectivamente.

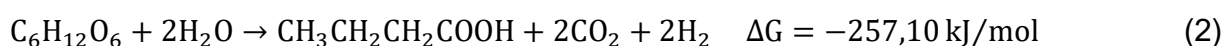


Figura 12 – Hidrogênio e metabólitos de degradação produzidos durante o período experimental do reator alimentado com manipueira na concentração inicial de 10 g O₂/L: (●) EtOH; (■) HAc; (▲) HBU; (○) HPr; (□) HCa; (Δ) H₂

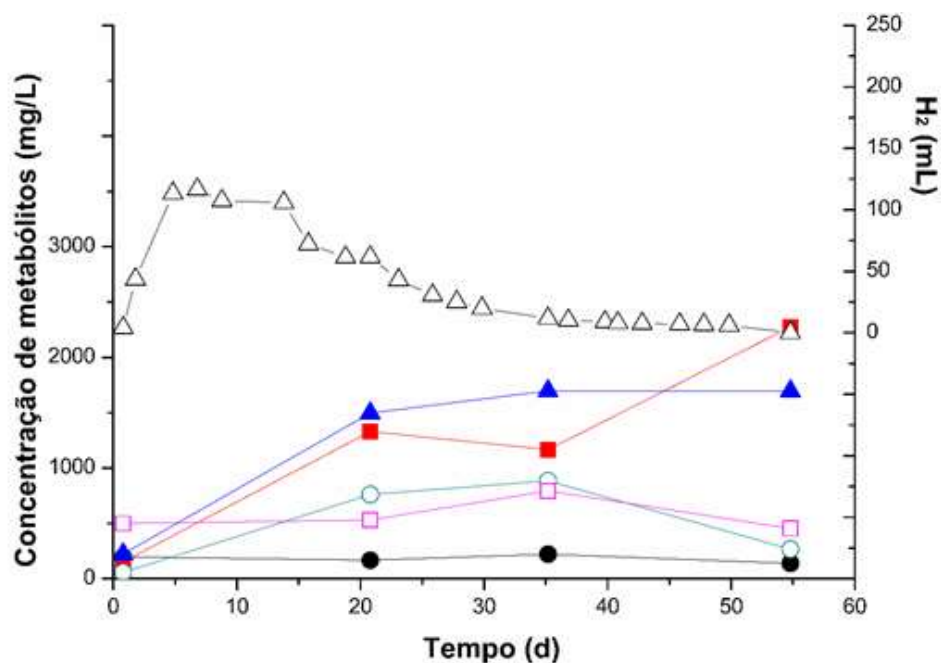
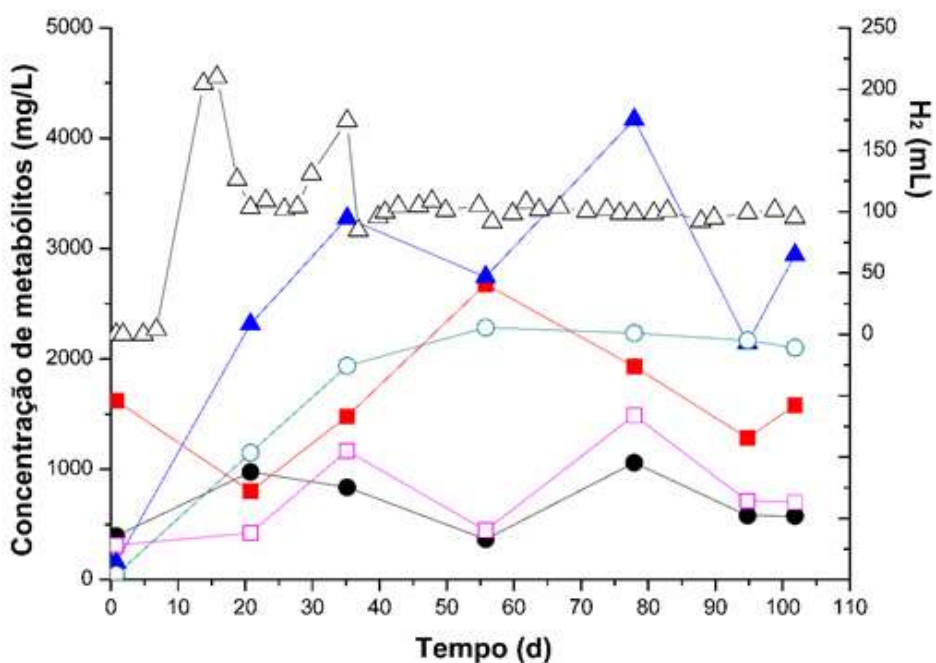
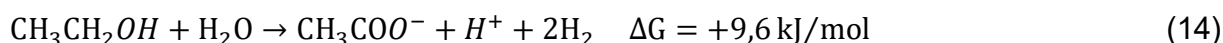


Figura 13 – Hidrogênio e metabólitos de degradação produzidos durante o período experimental do reator alimentado com manipueira na concentração inicial de 20 g O₂/L: (●) EtOH; (■) HAc; (▲) HBU; (○) HPr; (□) HCa; (Δ) H₂



Entre os dias 15 e 20 se observa consumo de hidrogênio com acúmulo de ácido propiônico, considerado um metabólito indesejado, pois sua produção está vinculada ao consumo de hidrogênio (Equação 3). A concentração de ácido propiônico aumentou gradativamente, desde o dia 1 até o dia 35 (passando de 58 para 884 mg/L). Em seguida, 618 mg/L de ácido propiônico foram consumidos entre os dias 35 e 55, por meio do deslocamento da rota metabólica apresentada na equação 13, para formação de ácido acético, que foi favorecida pela diminuição na pressão parcial de hidrogênio no meio. A concentração de ácido acético aumentou de 1167 mg/L (dia 35) para 2275 mg/L (dia 55), indicando que 45% do acético formado foi proveniente do consumo de propiônico. Apesar de termodinamicamente desfavorável, a oxidação de ácido propiônico à acético torna-se favorável quando a pressão parcial de hidrogênio se torna inferior à 10^{-4} atm (Harper e Pohland, 1986). A partir do dia 50, o volume de hidrogênio no headspace do reator se manteve abaixo de 6 mL. O consumo de etanol e ácido capróico (83 e 342 mg/L, respectivamente) contribuíram para a formação de 26% do ácido acético pelas rotas descritas nas equações 14 e 6, respectivamente.



As concentrações de etanol e de ácido capróico sofreram pequenas variações ao longo do experimento, com valores médios de 181 ± 36 mg/L e 570 ± 153 mg/L, respectivamente. Como a formação do ácido capróico está vinculada a disponibilidade de etanol e de ácido acético no meio (Equação 6), pode-se afirmar que a produção deste ácido foi limitada pelo baixo teor de etanol formado.

Na condição A20 (Figura 13), a fase acidogênica foi mais longa, com aproximadamente 102 dias de duração. A produção de ácido butírico foi predominante sobre o ácido acético. A produção de hidrogênio foi maior do que em A10 (210 mL no dia 16 e 174 mL no dia 35) e esteve vinculada à maior produção de ácido butírico (2315 mg/L no dia 20, e 3276 mg/L no dia 35 – rota metabólica apresentada na Equação 2). O maior teor de ácido acético foi detectado no dia 56 (2677 mg/L), quando a produção de hidrogênio havia estabilizado em torno de 100 mL. Desta forma, a máxima produção de

ácido acético ocorreu pelo consumo de etanol e ácido capróico entre os dias 35 e 56 (470 e 720 mg/L, respectivamente – Equações 14 e 6) e não pela rota que produz ácido acético e hidrogênio simultaneamente (Equação 1). Ou seja, 51% do ácido acético foi gerado a partir do consumo de etanol, enquanto que o consumo de ácido capróico foi responsável pela produção de 31%.

O ácido propiônico acumulou no meio, com aumento na concentração de 44 mg/L, no início do experimento, para 2103 mg/L, no final do experimento, o que deve estar associado ao acúmulo de hidrogênio no meio (cerca de 100 mL), com pressão parcial em nível que não favoreceu o deslocamento da rota (equação 3). A concentração de etanol foi maior do que na condição A10 (máximo de 221 mg/L), e atingiu 1061 mg/L no dia 78. A maior disponibilidade de etanol no meio resultou em maior concentração de ácido capróico (1488 mg/L), também detectada no dia 78. Comparando os dois experimentos, foi observada produção de ácido capróico 87% maior na condição A20 em relação à A10.

Alguns trabalhos (O-Thong et al., 2008a; Luo et al, 2010a; Wang et al., 2013) indicam microrganismos do gênero *Thermoanaerobacterium sp.* como dominantes na produção fermentativa de hidrogênio em condições termofílicas com ácido butírico como produto final predominante, fato que pode estar associado à predominância deste metabólito no presente trabalho.

A presença de microrganismos desse gênero, inclusive, já foi relatada por O-Thong et al (2008a) quando a manipueira foi utilizada como substrato. Luo et al. (2010) utilizaram 5 tipos de inóculo para produção de hidrogênio a partir da manipueira e observaram que microrganismos do gênero *Thermoanaerobacterium sp.* se estabeleceram como comunidades dominantes em condições termofílicas, independente do inóculo utilizado. Isso pode indicar que esses microrganismos estejam presentes na própria manipueira e não apenas no inóculo. Essa hipótese ganha força ao observar o trabalho de Wang et al. (2013) que avaliaram o desempenho da produção autofermentativa de hidrogênio a partir da manipueira, utilizando 4 tipos de co-substratos em condições termofílicas e também observaram a presença de microrganismos do gênero *Thermoanaerobacterium sp.* em todas as condições experimentais. Em relação

à rota metabólica predominante, Luo et al. (2010) observaram a predominância do ácido butírico em todos experimentos, enquanto que Wang et al. (2013) indicaram os ácidos butírico e láctico como metabólitos predominantes.

Onyenwoke e Wiegel (2009) afirmam que microrganismos do gênero *Thermoanaerobacterium* podem crescer em faixa de temperatura que varia de 35 a 75 °C, enquanto que a faixa ótima do pH para o crescimento celular está entre 5,2 e 8,0. Os autores afirmam ainda que as espécies *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* geram produtos de fermentação que incluem ácido acético, ácido butírico, ácido láctico, ácido succínico, etanol e hidrogênio. Dessa forma, a autofermentação, a temperatura de 40 °C e pH em torno de 5,5, aplicados no presente trabalho, devem ter favorecido o desenvolvimento de microrganismos produtores de hidrogênio, o desprendimento do biogás da fase líquida e a predominância da rota fermentativa de produção de ácido butírico.

O alongamento da cadeia de carbono durante a fermentação da manipueira foi testado nas duas condições operacionais aplicadas, uma vez que a produção de ácido capróico foi limitada pela disponibilidade de etanol no meio. A utilização de etanol, que é um combustível, para alongar a cadeia de carbono do ácido acético gerado na primeira fermentação é, segundo Steinbusch et al. (2011) justificada pelo aumento da quantidade total de energia que se pode recuperar com a produção de ácido capróico.

Produção de ácido capróico a partir do alongamento da cadeia de carbono

A Figura 14 apresenta o comportamento dos ácidos acético e capróico, do etanol, do hidrogênio e metano no experimento com concentração inicial de manipueira de 10 g O₂/L. Ao todo, foram realizadas 4 injeções de etanol (dias 56, 123, 148 e 169 – setas indicativas, Figura 14). A primeira delas foi logo após a acidogênese (dia 56), onde a concentração de etanol no meio passou de 138 para 4623 mg/L após a injeção. Após 16 dias da injeção de etanol (dia 71), já foi possível notar um aumento da produção do ácido capróico, cuja concentração passou de 670 para 2376 mg/L, que ocorreu como

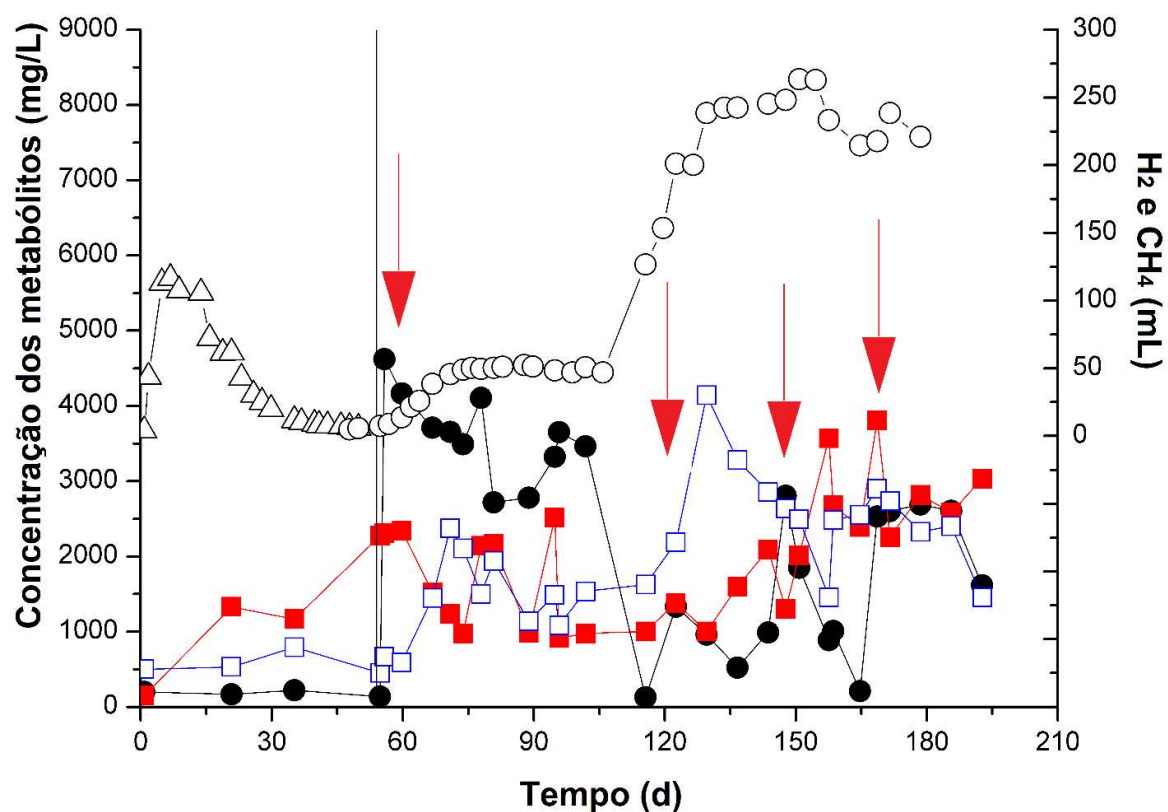
consequência da conversão de 968 mg/L de etanol e 1106 mg/L de ácido acético (Equação 6).

Após a segunda injeção de etanol, que ocorreu no dia 123, foi atingida a maior produção do ácido capróico no experimento A10 (4142 mg/L, detectada no dia 130). É importante destacar que o ácido capróico não acumulou no meio, tendo sua concentração diminuída para 2856 mg/L no dia 144, ao mesmo tempo em que o ácido acético passou de 1004 (dia 130) para 2090 mg/L (dia 144). Ou seja, o consumo do ácido capróico foi responsável por 61% do ácido acético produzido pela reação inversa descrita pela Equação 6.

A terceira injeção foi realizada no dia 148, quando a concentração de ácido capróico estava em 2637 mg/L, porém não houve grandes alterações, permanecendo nessa faixa mesmo após mais uma injeção de etanol, no dia 169. A ineficiência da produção de ácido capróico após a terceira e quarta injeções de etanol pode ser justificada: (i) pelo aumento da produção de metano, já que a metanogênese é considerada um processo competitivo do alongamento da cadeia de carbono (Agler et al., 2011); (ii) pela redução da pressão parcial de hidrogênio promovendo a oxidação excessiva de etanol em acetato (Grootscholten et al., 2014). Essa hipótese ganha força quando observamos o consumo de 1919 mg/L de etanol e a produção de 2270 mg/L de ácido acético entre os dias 148 e 158. No período compreendido entre os dias 171 e 193, observou-se que aproximadamente 60% do etanol consumido (596 mg/L) foram convertidos em ácido acético (um aumento de 776 mg/L).

A metanogênese se estabeleceu após 70 dias de operação. No momento da terceira (dia 148) e quarta (dia 169) injeções, a produção de metano havia atingindo os valores máximos (248 e 218 mL, respectivamente). A menor eficiência da terceira injeção e a ineficiência da quarta injeção pode ser justificada pelo caráter competitivo que a produção de metano representa ao alongamento da cadeia de carbono. Isso porque a metanogênese acetoclástica utiliza o mesmo substrato usado no alongamento da cadeia de carbono, o acetato. Já a metanogênese hidrogenotrófica pode ter um efeito indireto sobre o alongamento da cadeia, já que reduz a pressão parcial de hidrogênio permitindo a oxidação do etanol em acetato (Grootscholten et al., 2014).

Figura 14 – Concentração dos ácidos acético e capróico, etanol, hidrogênio e metano durante o alongamento da cadeia de carbono no experimento de concentração inicial de substrato de 10 g O₂/L: (●) EtOH; (■) HAc; (□) HCa; (Δ) H₂; (○) CH₄



A Tabela 8 apresenta o balanço em termos de DQO dos pontos de injeção de etanol e de máxima produção de ácido capróico após a injeção. Observa-se que na terceira e quarta injeções (dias 148 e 169, respectivamente), a contribuição dos metabólitos detectados (DQO intermediários) para a DQO medida ($DQO_{(int)}/DQO_{(med)}$) foi inferior (47% e 65%, nos dias 165 e 169, respectivamente) quando comparada com os dados provenientes das duas primeiras injeções de etanol (85% e 71%, nos dias 71 e 130, respectivamente). Ou seja, a contribuição da produção de outros metabólitos não quantificados, como os ácidos láctico e fórmico, que podem interferir na estabilidade do

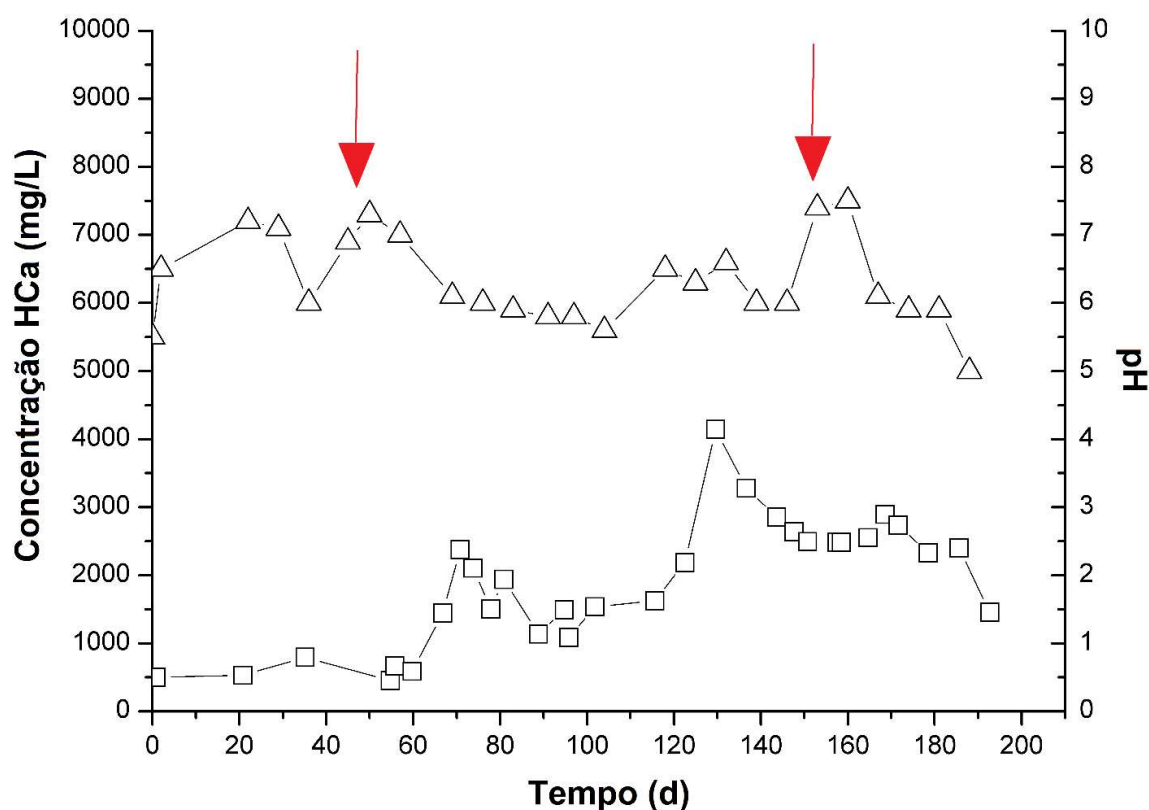
Tabela 8 – DQO teórica dos metabólitos e DQO medida durante a fase de alongamento da cadeia na condição A10, antes e após as adições de etanol

Tempo (dia)	pH	EtOH (g/L)	HAc (g/L)	HPr (g/L)	HBu (g/L)	HCa (g/L)	DQO _(int) (g/L)	DQO _(med) (g/L)	Outros (g/L)	DQO _(int) /DQO _(med) (%)
56 (Adição de Etanol)	6,7	9,7	2,5	0,5	3,7	1,5	17,7	22,7	5,0	78
71	6,2	7,6	1,3	0,2	4,1	5,2	18,5	21,6	3,1	85
Consumo ou produção		2,1	1,2	0,3	0,4	3,7	0,8	1,1	1,9	
123 (Adição de Etanol)	6,3	2,8	1,5	0,1	2,3	4,8	11,5	20,8	9,4	55
130	6,6	2,0	1,1	0,4	2,8	9,1	15,4	21,8	6,4	71
Consumo ou produção		0,8	0,4	0,3	0,5	4,3	3,9	1,0	3,0	
148 (Adição de Etanol)	7,1	5,9	1,4	0,2	1,9	5,8	15,1	26,7	11,6	57
165	6,1	0,4	2,5	0,1	2,9	5,6	11,5	24,6	13,1	47
Consumo ou produção		5,5	1,1	0,1	1,0	0,2	3,6	2,1	1,5	
169 (Adição de Etanol)	6,0	5,3	4,1	0,2	3,3	6,4	19,2	29,5	10,3	65
193	5,0	3,4	3,2	0,1	1,7	3,2	11,5	18,6	7,1	62
Consumo ou produção		1,9	0,9	0,1	1,6	3,2	7,7	10,9	3,2	

sistema foi maior nas duas últimas injeções (dias 165 e 169) em relação às duas primeiras (dias 71 e 130).

Outro fator que pode ter interferido na produção de ácido capróico foi o pH. Spirito et al. (2014) recomendam a manutenção do pH em torno de 7 quando não se pretende extrair o produto do alongamento do caldo de fermentação. Nesse experimento, não houve controle automático do pH, porém foi observado que a formação do ácido capróico promoveu diminuição no pH do meio (Figura 15 – Equação 6).

Figura 15 – Concentração do ácido capróico ($\square$) e comportamento do pH (Δ) durante o alongamento da cadeia de carbono no experimento de concentração inicial de substrato de 10 gO₂/L

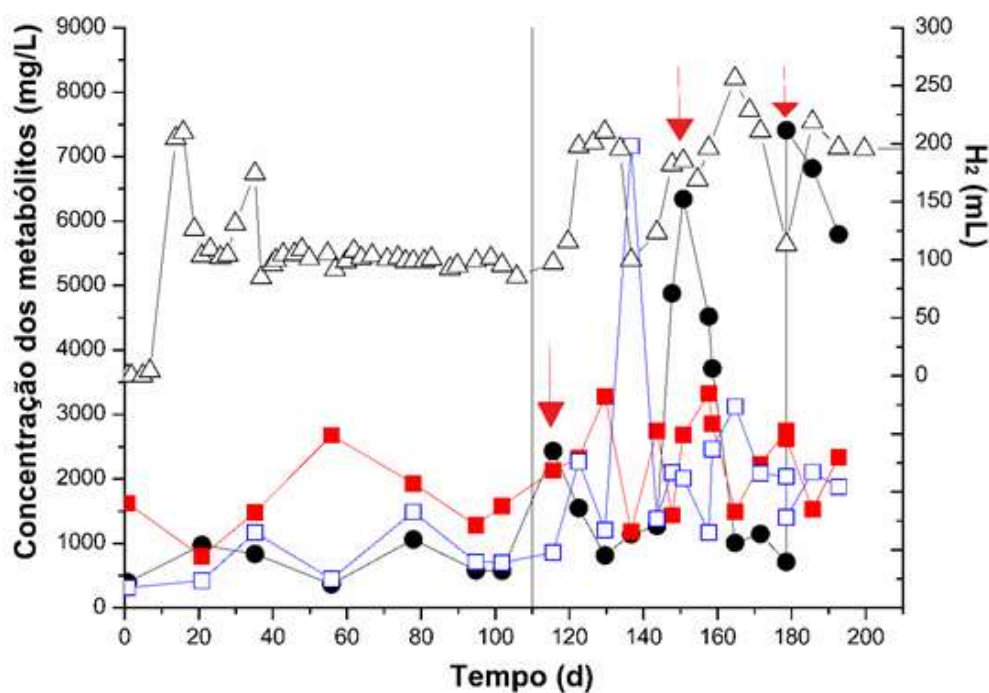


Como o pH próximo à neutralidade fornece condições de maior estabilidade da produção de ácido capróico, houve necessidade de ajustar manualmente o pH para 7,0 por duas vezes: uma antes da primeira injeção de etanol (dia 56), e outra após a terceira injeção de etanol (dia 148) (setas, Figura 15). Nota-se que o ajuste do pH para 7,0 no dia 148 proporcionou condições favoráveis à manutenção da concentração do ácido

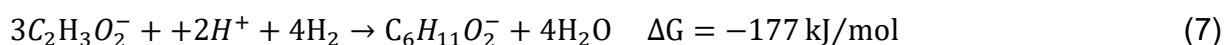
capróico em torno de 2600 mg/L e, quando o pH voltou a diminuir (pH = 5,9, a partir do dia 186), a concentração deste ácido também diminuiu (2404 mg/L), atingindo o mínimo de 1454 mg/L quando o pH chegou a 5,0 (dia 193).

A Figura 16 apresenta os resultados do alongamento da cadeia de carbono na condição A20. Nesse experimento foram realizadas três injeções de etanol (dias 116, 148 e 179 – setas, Figura 6), sendo a primeira injeção efetuada antes que a produção de hidrogênio estivesse finalizada com o objetivo de manter a pressão parcial de hidrogênio mais elevada durante o alongamento da cadeia de carbono e evitar a competição com a metanogênese durante o alongamento da cadeia de carbono. Como resultado, nesse experimento não foi detectada produção de metano.

Figura 16 – Concentração dos ácidos acético e capróico, etanol, hidrogênio e metano durante o alongamento da cadeia de carbono no experimento de concentração inicial de substrato de 20 g O₂/L: (●) EtOH; (■) HAc; (□) HCa; (Δ) H₂



No período em que não houve adição externa de etanol (até o dia 102), a concentração de etanol máxima detectada foi de 1061 mg/L (dia 78). A primeira injeção de etanol, realizada no dia 116, promoveu aumento da concentração de etanol de 577 mg/L para 1548 mg/L (dia 102 e 116, respectivamente). Sete dias após a injeção de etanol (dia 130), o sistema já apresentou resposta e a produção de ácido capróico atingiu 2270 mg/L. A produção máxima de ácido capróico ocorreu 21 dias após a primeira injeção de etanol, atingindo 7169 mg/L (dia 137). Observa-se que esse pico na concentração de ácido capróico coincide com uma redução de aproximadamente 96 mL do volume de hidrogênio, assim como da concentração do ácido acético que sofreu uma redução de 2091 mg/L. Este comportamento pode ser explicado pela ocorrência da rota de produção do ácido capróico a partir do ácido acético e hidrogênio (Equação 7).



Após a máxima produção de ácido capróico ter sido atingida (7169 mg/L no dia 137 – Figura 16), o volume de hidrogênio voltou a aumentar e a concentração de ácido capróico diminuiu drasticamente (de 7169 para 1384 mg/L). A produção de capróico só voltou a aumentar após a segunda injeção de etanol (dia 148), quando 4880 mg/L de ácido capróico foram detectados. Após 171 dias de operação, a concentração de ácido capróico se estabilizou e não apresentou grandes alterações, mesmo após a terceira injeção de etanol (dia 179) ficando em torno de 2000 mg/L.

A Tabela 9 apresenta o balanço em termos de DQO dos pontos de injeção de etanol e de máxima produção de ácido capróico após a injeção na condição A20. A primeira injeção de etanol (dia 116) foi a mais eficiente na produção de ácido capróico, resultando na conversão de 26% do etanol adicionado em ácido capróico pela rota descrita na equação 6 (dia 137).

Após a segunda injeção no dia 148, 79% do etanol foi consumido (até o dia 165). No entanto, apenas 21% do etanol consumido (1623 mg/L) foi utilizado para produção de ácido capróico (dia 165). O consumo do etanol pode ter iniciado uma sequência de rotas que levam à produção de outros produtos intermediários não medidos, tais como ácidos láctico, succínico, valérico, dentre outros. Essa hipótese ganha força pela baixa

contribuição dos metabólitos medidos (49%) para a DQO efluente no dia 165, que indica a presença de outros metabólitos não determinados. O consumo de etanol pela rota competitiva ocorrida entre os dias 148 e 165 de operação fica clara pelo aumento na produção de 0,003 mols de hidrogênio (75 mL - Figura 16), que resulta do consumo estequiométrico de 37 mg/L de etanol (Equação 14).

Após a terceira injeção no dia 179, a relação $DQO_{(intermediários)}/DQO_{(medida)}$ aumentou, indicando acúmulo dos intermediários medidos no meio, porém pouco etanol foi consumido (22% - 1616 mg/L), sendo apenas 808 mg/L utilizada para produção de ácido capróico.

Figura 17 – Concentração do ácido capróico ($\square$) e comportamento do pH (Δ) durante o alongamento da cadeia de carbono no experimento de concentração inicial de substrato de 20 gO₂/L

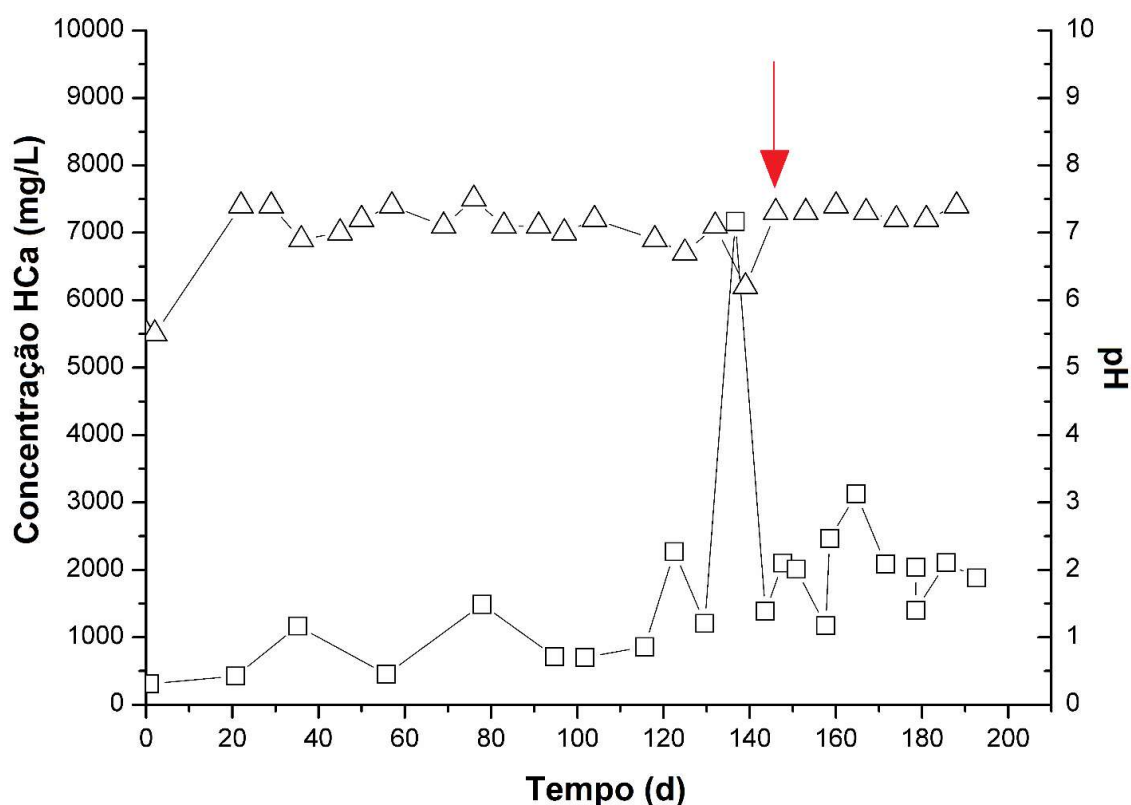


Tabela 9 – DQO teórica dos metabólitos e DQO medida durante a fase de alongamento da cadeia na condição A20, antes e após as adições de etanol

Tempo (dia)	pH	EtOH (g/L)	HAc (g/L)	HPr (g/L)	HBu (g/L)	HCa (g/L)	DQO _(int) (g/L)	DQO _(med) (g/L)	Outros (g/L)	DQO _(int) /DQO _(med) (%)
116 (Adição de Etanol)	6,9	5,1	2,3	4,1	5,9	1,9	19,2	32,1	12,9	60
137	6,2	2,4	1,3	3,0	5,1	15,8	27,6	29,3	1,7	94
Consumo ou produção		2,7	1,0	0,9	0,8	13,9	8,4	2,8	11,2	
148 (Adição de Etanol)	6,8	10,2	1,5	1,8	4,5	4,6	22,7	28,3	5,6	80
165	7,3	2,1	1,6	1,3	4,8	6,9	16,7	34,2	17,5	49
Consumo ou produção		8,1	0,1	0,5	0,3	2,3	6,0	5,9	11,9	
179 (Adição de Etanol)	7,2	15,5	2,8	1,4	3,7	3,1	26,5	30,4	3,9	87
193	7,4	12,1	2,5	1,6	4,8	4,1	25,2	31,7	6,5	79
Consumo ou produção		3,4	0,3	0,2	1,1	1,0	1,3	1,3	2,6	

Uma possível razão para o alongamento da cadeia de carbono ter cessado pode ser a toxicidade gerada pelas altas concentrações de ácidos carboxílicos não dissociados. O próprio ácido capróico apresenta toxicidade em concentração entre 800 e 870 mg/L em pH ácido ($\approx 5,5$) (Weimer et al., 2015). Para minimizar os riscos de toxicidade pelo excesso de ácido capróico, pode-se adotar um sistema de extração em linha associado ao reator anaeróbio (Agler et al., 2012) ou adotar um sistema de duas fases separando a acidificação do alongamento da cadeia (Grootscholten et al., 2013).

Para Grootscholten et al. (2014) o sistema de duas fases também otimiza a produção dos ácidos carboxílicos de cadeia média. Os autores obtiveram produção máxima de ácido capróico de 12 g/L a partir fração orgânica dos resíduos sólidos urbanos, aproximadamente 4 vezes maior do que a produção obtida quando operaram o sistema em uma única fase. Os autores ressaltam a importância do controle do pH para assegurar estabilidade ao processo.

No presente trabalho, não houve extração do ácido capróico produzido, o que pode explicar a falta de recuperação da produção de ácido capróico a partir da segunda injeção de etanol. O pico da produção de ácido capróico no dia 137 fez com que o pH baixasse de 7,1 para 6,2 (Figura 17). Nesse momento o pH foi corrigido para 7 com o objetivo de evitar inibição da atividade microbiana pelo pH. Depois da correção do pH, este se manteve praticamente estável e a concentração de ácido capróico sofreu menor variação.

Os resultados apontam que a resposta do sistema em acumular ácido capróico no meio levou 15 e 7 dias, respectivamente após a injeção de etanol, respectivamente para as condições A10 e A20. No entanto, os resultados reportados por Smith e McCarty (1989) e Grootscholten et al. (2013a) indicam uma fase de latência mais curta, de 2,3 e 2,0 dias, respectivamente, entre a injeção de etanol e o início da produção de ácido capróico.

No geral, foi observada concentração de ácido capróico 5 e 6 vezes maior na fase de alongamento, em relação à fase acidogênica nas condições A10 e A20, respectivamente.

Em relação à energia envolvida no processo, as Tabelas 10 e 11 apresentam o balanço de energia a partir do consumo de etanol e formação do ácido capróico durante o processo de alongamento da cadeia de carbono.

Tabela 10 – Balanço de energia a partir do consumo de etanol e produção de ácido capróico durante o alongamento da cadeia de carbono na condição A10

Etapas	Consumo ou produção (mg/L)		Energia consumida e produzida (kJ)		DQO _{HCA} /DQO _{EtOH}
	EtOH	HCA	EtOH	HCA	
1ª Injeção	968	1706	48	87	1,76
2ª Injeção	372	1954	18	100	5,53
3ª Injeção	2598	NP	128	NP	-
4ª Injeção	915	NP	45	NP	-
Total	4852	3660	240	188	

NP – não produzido

Tabela 11 – Balanço de energia a partir do consumo de etanol e produção de ácido capróico durante o alongamento da cadeia de carbono na condição A20

Etapas	Consumo ou produção (mg/L)		Energia consumida e produzida (kJ)		DQO _{HCA} /DQO _{EtOH}
	EtOH	HCA	EtOH	HCA	
1ª Injeção	1292	6310	64	323	5,14
2ª Injeção	3871	1023	191	52	0,28
3ª Injeção	1616	476	80	24	0,31
Total	6778	7808	335	400	-

Na condição A10 (Tabela 10) a relação entre o etanol consumido e o ácido capróico formado é satisfatória até a segunda injeção de etanol, já que houve consumo de 66 kJ de energia proveniente do etanol (Equação 15) para a produção de 187 kJ de energia a partir do ácido capróico (Equação 16) nas duas primeiras injeções, resultando num aumento energético de 2,8 vezes.

Na condição A20, a primeira injeção foi a mais eficiente, com um ganho 5,1 vezes de energia com a produção de ácido capróico a partir do etanol (64 kJ consumidos e 323 kJ produzidos a partir da conversão de etanol em ácido capróico). As outras injeções não foram compensatórias em termos de energia, porém o balanço geral foi levemente positivo com aumento energético de 20%. No entanto, é interessante desenvolver alternativas para melhorar a estabilidade do processo e aumentar a produção de ácido capróico.

A relação entre o ácido capróico produzido e o etanol consumido em termos de DQO também pode ser observada nas Tabelas 10 e 11. Quando essa relação é maior que 1, indica que houve consumo do etanol, e contribuição da hidrólise e da acidogênese para a formação do produto (ácido capróico) (Ge et al., 2015). Na condição A10, essa relação esteve acima de 1 na primeira e segunda injeções (Tabela 10), sendo a maior relação DQO_{HCa}/DQO_{EtOH} de 5,53, ocorrida na segunda injeção de etanol, quando houve maior produção de ácido capróico. Na condição A20, a maior relação DQO_{HCa}/DQO_{EtOH} (5,14) também coincidiu com o momento em que houve maior produção de ácido capróico (após a primeira injeção de etanol). Porém, essa relação caiu drasticamente durante a segunda e terceira injeções (0,28 e 0,31, respectivamente), ficando abaixo de 1 (Tabela 11).

$$Energia_{Consumida} = mols\ de\ EtOH\ consumidos \times Poder\ calorífico\ do\ EtOH \quad (15)$$

$$Energia_{Produzida} = mols\ de\ HCa\ produzidos \times Poder\ calorífico\ do\ HCa \quad (16)$$

Conclusão

Nesse trabalho, foi avaliada a co-produção de hidrogênio e ácido capróico utilizando a manipueira como substrato. O rendimento da produção de hidrogênio foi extremamente satisfatório, considerando que os reatores não foram inoculados. O rendimento da produção de hidrogênio aumentou de 1,01 para 1,98 mol H_2 /mol glicose para as concentrações iniciais de manipueira de 10 e 20 g O_2 /L, respectivamente, valores que correspondem a 25% e 50% da produção máxima teórica. Os principais metabólitos

observados foram o etanol e os ácidos acético, butírico, propiônico e capróico. Ainda durante a acidogênese, houve consumo de etanol para produção de ácido capróico. A produção de ácido capróico a partir do alongamento da cadeia de carbono, com adição externa de etanol, foi mais eficiente para a concentração inicial em termos de DQO da manipueira igual a 20 g O₂/L. A injeção de etanol foi feita antes do final da acidogênese e resultou em valor máximo de ácido capróico de 7,2 g/L. Quando a injeção de etanol foi feita no final da acidogênese, a produção máxima de ácido capróico foi de 4,2 g/L (DQO inicial de manipueira de 10 g O₂/L). O balanço de energia resultou em um ganho energético de 2,8 e 5,1 vezes com a produção de ácido capróico a partir do etanol nas condições A10 e A20, respectivamente.

5 CONCLUSÃO GERAL

Os resultados obtidos apresentados no artigo 1 demonstraram a eficiência dos dois métodos de inibição da metanogênese adotados (acetileno e tratamento térmico), com nenhum metano sendo detectado. Os métodos de inibição adotados não promoveram diferenças em relação ao rendimento da produção de hidrogênio, à taxa máxima de produção de hidrogênio e na distribuição dos metabólitos, sendo o ácido butírico predominante nos dois casos. Porém, foi observada grande diferença em relação ao potencial máximo de produção de hidrogênio e a duração da fase *lag*, que apresentaram valores superiores quando adotado o tratamento térmico do inóculo. Apesar da adaptação mais longa, o tratamento térmico foi adotado na etapa posterior, levando em consideração o maior potencial máximo de produção de hidrogênio obtido com este método de inibição.

Ainda no artigo 1, os resultados da avaliação da influência do tipo de inóculo e da concentração inicial da manipueira, indicaram que o aumento da concentração inicial do substrato tende a inibir a produção de hidrogênio. Porém, o uso de diferentes tipos de inóculo resultou em comportamentos distintos de conversão da matéria orgânica e produção de hidrogênio, como foi o caso do rúmen em que se observou aumento do HY quando a concentração inicial da manipueira passou de 10 para 20 g O₂/L. O aumento da concentração inicial do substrato resultou no aumento da fase *lag* independente do tipo de inóculo utilizado, porém a composição dos microrganismos do inóculo é determinante na duração da fase *lag*. A produção de ácido capróico foi observada em todas as condições experimentais, indicando a possibilidade do alongamento da cadeia de carbono durante a fermentação da manipueira.

Já os resultados apresentados no artigo 2 indicam que a autofermentação da manipueira foi eficiente na produção de hidrogênio, com percentual máximo de 50% de eficiência de conversão teórica da produção de hidrogênio tendo sido alcançado para a DQO inicial da manipueira igual a 20g O₂/L. Este valor é, inclusive, maior do que a eficiência máxima observada nos experimentos que foram inoculados (42%, na condição R20 – Artigo 1). Em relação ao alongamento da cadeia de carbono, houve um aumento

da concentração do ácido capróico de aproximadamente 5 e 6 vezes em relação à fase acidogênica, nas condições de concentração inicial do substrato de 10 e 20 g O_2/L , respectivamente. Enquanto que o balanço de energia resultou em um ganho energético de 2,8 e 5,1 vezes com a produção de ácido capróico a partir do etanol nas condições de concentração inicial do substrato de 10 e 20 g O_2/L , respectivamente.

Os resultados deste trabalho indicam que o tratamento térmico do inóculo e a adição de acetileno foram eficientes na inibição da metanogênese. No entanto, a aplicação do tratamento térmico do inóculo resultou em maior potencial máximo de produção de hidrogênio em relação ao uso do acetileno.

O aumento da concentração inicial da manipueira resultou na inibição da produção de hidrogênio. Entre os inóculos avaliados, o rúmen bovino apresentou melhor desempenho na produção de hidrogênio e ácido capróico, apesar do longo tempo de adaptação. A autofermentação da manipueira foi eficiente na produção de hidrogênio, podendo ser uma alternativa ao uso de inóculo.

A produção de ácido capróico durante a produção fermentativa de hidrogênio a partir da digestão anaeróbia da manipueira ocorreu em todas as condições experimentais avaliadas. A adoção da etapa de alongamento da cadeia de carbono posterior à produção de hidrogênio a partir da manipueira apresentou resultados promissores e novas pesquisas devem ser realizadas com o objetivo de otimizar a produção ácido capróico.

REFERÊNCIAS

- Agler, M.T.; Wrenn, B.A.; Zinder, S.H.; Angenent, L.T. Waste to bioproduct conversion with undefined mixed cultures: the carboxylate platform. **Trends in Biotechnology: Special Issue – Applied Microbiology**, v. 29, n. 2, p. 70-78, 2011.
- Agler, M.T.; Spirito, C.M.; Usack, J.G.; Wernerab, J.J.; Angenent, L.T. Chain elongation with reactor microbiomes: upgrading dilute ethanol to medium-chain carboxylates. **Energy and Environmental Science**, v. 5, p. 8189-8192, 2012.
- Agler, M.T.; Spirito, C.M.; Usack, J.G.; Werner, J.J.; Angenent, L.T. Development of a highly specific and productive process for n-caproic acid production: applying lessons from methanogenic microbiomes. **Water Science Technology**, v. 69, p. 62-68, 2014.
- Amorim, E.L.C.; Barros, A.R.; Damianovic, M.H.R.Z.; Silva, E.L. Anaerobic fluidized bed reactor with expanded clay as support for hydrogen production thorough dark fermentation of glucose. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, p. 783-790, 2009.
- Amorim, E.L.C.; Sader, L.T.; Silva, E.L. Effect of Substrate Concentration on Dark Fermentation Hydrogen Production Using an Anaerobic Fluidized Bed. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 166, p. 1248–1263, 2012.
- Amorim, N.C.S.; Alves, I.; Martins, J.S.; Amorim, E.L.C. Biohydrogen production from cassava wastewater in an anaerobic fluidized bed reactor. **Brazilian journal of chemical engineering**, v. 31, n. 3, p. 603-612, 2014.
- Andersen, S.J.; Candry, P.; Basadre, T.; Khor, W. C.; Roume, H.; Hernandez-Sanabria, E.; Coma, M.; Rabaey, K. Electrolytic extraction drives volatile fatty acid chain elongation through lactic acid and replaces chemical pH control in thin stillage fermentation. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, p. 221, 2015.
- Angenent, L.T.; Karim, K.; Al-Dahhan, M.H.; Wrenn, B.A.; Domínguez-Espinosa, R. Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. **Trends in biotechnology**, v. 22, n. 9, p. 477-485, 2004.
- APHA, Standard methods for the examination for water and wastewater (2012) 20th Ed. Washington, DC, American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environmental Federation.
- Araújo, N.C.; Guimarães, P.L.F.; Oliveira, S.J.C.; Lima, V.L.A.; Bandeira, F.A.; Araújo, F.A.C. Quantificação da geração de resíduos em uma casa de farinha no Estado da Paraíba. **Revista Monografias Ambientais – REMOA**, v. 13, n. 5, p. 3793-3799, 2014.
- Argun, H.; Kargi, F. Effects of sludge pre-treatment method on bio-hydrogen production by dark fermentation of waste ground wheat. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, p. 8543-8551, 2009.
- Archer, D.B.; Kirsop, B.H. The microbiology and control of anaerobic digestion. In: Wheatley A (ed) Anaerobic digestion: a waste treatment technology. **Elsevier Applied Science**, London, pp 43-91, 1990.

Bungay, H.R. Confessions of a bioenergy advocate. **Trends biotechnol**, v. 22, p. 67-71, 2004.

Butkus, M.A.; Hughes, K.T.; Bowman, D.D.; Liotta, J.L.; Jenkins, M.B.; Labare, M.P. Inactivation of ascaris suum by short-chain fatty acids. **Appl environ microbiol**, v. 77, p. 363-366, 2011.

Cappelletti, B.M.; Reginatto, V.; Amante, E.R.; Antônio, R.V. Fermentative production of hydrogen from cassava processing wastewater by clostridium acetobutylicum. **Renewable energy**, v. 36, n. 12, p. 3367-3372, 2011.

Cardoso, G.M. **Uso da manipueira como biofertilizante no cultivo do milho: avaliação do efeito no solo, nas águas subterrâneas e na produtividade do milho**. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2005. 53 f.

Cereda, M. P. et al. **Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca**. São Paulo. Fundação Cargill. 2001. 320p.

Chaganti, S.R.; Kimb, D-H; Lalman, J.A. Dark fermentative hydrogen production by mixed anaerobic cultures: effect of inoculum treatment methods on hydrogen yield. **Renewable energy**, v. 48, p. 117-121, 2012.

Chang, J-J.; Lin, J-J.; Ho, C-Y.; Chin, W-C.; Huang, C-C. Establishment of rumen-mimic bacterial consortia: A functional union for bio-hydrogen production from cellulosic bioresource. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, p. 13399-13406, 2010.

Chen, C.C.; Lin, C.Y.; Lin, M.C. Acid-base enrichment enhances anaerobic hydrogen production process. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 58, p. 224-228, 2002.

Chen, W-H.; Chen, S-Y.; Khanal, S.K.; Sung, S. Kinetic study of biological hydrogen production by anaerobic fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 31, p. 2170-2178, 2006.

Chidthaisong, A.; Conrad, R. Specificity of chloroform, 2-bromoethanosulfonate and fluoroacetate to inhibit methanogenesis and other anaerobic processes in anoxic rice field soil. **Soil Biol Biochem**, v. 32, n. 7, p. 977-988, 2000.

Choi, K.; Jeon, B.S.; Kim, B.C.; Oh, M.K.; Um, Y.; Sang, B.I. In situ biphasic extractive fermentation for hexanoic acid production from sucrose by *Megasphaera elsdenii* NCIMB 702410. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v.171, p. 1094-1107, 2013.

Cisneros-Perez, C.; Carrillo-Reyes, J.; Celis, L.B.; Alatraste-Mondragon, F.; Etchebehere, C.; Razo-Flores, E. Inoculum pretreatment promotes differences in hydrogen production performance in EGSR reactors. **International journal of hydrogen energy**, v. 40, p. 6329-6339, 2015.

Conab (Companhia Nacional de Abastecimento). Mandioca. Período de 01/03 a 31/03/2016. **Conjuntura mensal**. Disponível em <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_04_01_09_37_05_mandiocam arco2016.pdf>. Acesso em: 03/02/2018.

Das, D.; Veziroglu, T. N. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 26, p. 13-28, 2001.

Das, D.; Khanna, N.; Veziroglu, N.T. Recent developments in biological hydrogen production processes. **Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly**, v. 14, n. 2, p. 57–67, 2008.

De Gioannis, G.; Muntoni, A.; Polettini, A.; Pomi, R. A review of dark fermentative hydrogen production from biodegradable municipal waste fractions. **Waste management**, v. 33, p. 1345-1361, 2013.

Del Bianchi, B.L.; Cereda, M.M. Balanço de massa de uma fábrica de farinha de mandioca de médio porte do estado de São Paulo. **Energia na Agricultura** (Botucatu), v. 14, n. 3, p. 34-38, 1999.

Dias, L.T.; Leone, M. Caracterização físico-química de farinhas de mandioca de diferentes localidades do Brasil. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 30, n. 4, p. 692-700, 2006.

Ding, H-B.; Tan, G-Y. A.; Wang, J-Y. Caproate formation in mixed-culture fermentative hydrogen production. *Bioresour Technol*, v. 101, p. 9550-9559, 2010.

Dubois, S.M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.L.; Rebers, P.A.; Smith, F. Colorimetric methods for determination of sugar and related substance. *Anal Chem*, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

Eker, S.; Sarp, M. Hydrogen Gas Production From Waste Paper By Dark Fermentation: Effects Of Initial Substrate And Biomass Concentrations. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 4, p. 2562-2568, 2017.

Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). Mandioca – A raiz do Brasil. Mandioca e Fruticultura, 2013. Disponível em <<http://www2.camara.leg.br/atividade-legislativa/comissoes/comissoes-permanentes/capadr/audiencias-publicas/audiencias-publicas-2013/audiencia-publica-16-de-abril-de-2013-embrapa-mandioca>>. Acesso em: 03/02/2018.

Favaro, L.; Alibardi, L.; Lavagnolo, M. C.; Casella, S.; Basaglia, M. Effects of inoculum and indigenous microflora on hydrogen production from the organic fraction of municipal solid waste. **International journal of hydrogen energy**, v. 38, p. 11774-11779, 2013.

Fernandes, B.S.; Peixoto, G.; Albrecht, F.R.; Saavedra del Aguila, N.K.; Zaiat, M. Potential to produce biohydrogen from various wastewaters. **Energy for Sustainable Development**, v. 14, n. 2, p. 143-148, 2010.

Fuess, L.T.; Kiyuna, L.S.M.; Garcia, M.L.; Zaiat, M. 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, 2016.

Gadow, S.I.; Li, Y-Y.; Liu, Y. Effect of temperature on continuous hydrogen production of cellulose. **International jornal of hydrogen energy**, v. 37, p. 15465-15472, 2012.

Ge, S.; Usack, J.; Spirito, C.M.; Angenent, L.T. Long-term n-caproic acid production from yeast-fermentation beer in an anaerobic bioreactor with continuous product extraction. **Environmental and Science Technology**, v. 49, n. 13, p. 8012–8021, 2015.

GIJZEN, H. J.; BERNAL, E. ; FERRER, H. Cyanide toxicity and cyanide degradation in anaerobic wastewater treatment. **Wat. Res.**, v. 34, n. 9, p. 2447–2454, 2000.

Gonzalez-Cabaleiro, R.; Lema, J.M.; Rodriguez, J.; Kleerebezem, R. Linking thermodynamics and kinetics to assess pathway reversibility in anaerobic bioprocesses. **Energy and environmental Science**, v. 6, p. 3780-3789, 2013.

Gonzaga, A.D.; Garcia,M.V.B.; Sousa, S.G.A.; PY-Daniel, V.; Correa, R.S.; Ribeiro, J.D'arc. Toxicidade de manipueira de mandioca (*Manihot esculenta Crantz*) e ervade-rato (*Palicourea marcgravii* St. Hill) a adultos de Toxoptera citricida Kirkaldy (Homoptera: Aphididae). **Acta Amazonica**, v. 38, n. 1, p. 101–106, 2008.

Gokfiliz, P.; Karapinar, I. The effect of support particle type on thermophilic hydrogen production by immobilized batch dark fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.42, n. 4, p. 2553-2561, 2016.

Grootscholten, T.I.M.; Steinbusch, K.J.J.; Hamelers, H.V.M.; Buisman, C.J.N. Improving medium chain fatty acid productivity using chain elongation by reducing the hydraulic retention time in an upflow anaerobic filter. **Bioresource technology**, v. 136, p. 735-738, 2013.

Grootscholten, T.I.M.; Kinsky Dal Borgo, F.; Hamelers, H.V.M.; Buisman, C.J.N. Promoting chain elongation in mixed culture acidification reactors by addition of ethanol. **Biomass bioenergy**, v. 48, p. 10-16, 2013a.

Grootscholten, T.I.M.; Steinbusch, K.J.J.; Hamelers, H.V.M.; Buisman, C.J.N. Chain elongation of acetate and ethanol in an upflow anaerobic filter for high rate MCFA production. **Bioresour technology**, v. 135, p. 440-445, 2013B.

Grootscholten, T.I.M.; Steinbusch, K.J.J.; Hamelers, H.V.M.; Buisman, C.J.N. High rate heptanoate production from propionate and ethanol using chain elongation. **Bioresource Technology**, v. 136, 715-718, 2013c.

Grootscholten, T.I.M.; Strik, D.P.B.T.B.; Steinbusch, K.J.J.; Buisman, C.J.N.; Hamelers, H.V.M. Two-stage medium chain fatty acid (MCFA) production from municipal solid waste and etanol. **Applied energy**, v. 116, p. 223-229, 2014.

Han, W.; Ye, M.; Zhu, A.J.; Zhao, H.T.; Li, Y.F. Batch dark fermentation from enzymatic hydrolyzed food waste for hydrogen production. **Bioresource Technology**, v.191, p. 24-29, 2015.

Harper, S.R.; Pohland, F.G. Recent development in hydrogen management during wastewater treatment. **Biotechnology and Bioenergy**, v. 28, p. 585-602, 1986.

Hess, M.; Sczyrba, A.; Egan, R.; Kim, T. W.; Chokhawala, H.; Schroth, G.; Luo, S.; Clark, D. S.; Chen, F.; Zhang, T.; Mackie, R. I.; Pennacchio, L. A.; Tringe, S.G.; Visel, A.; Woyke, T.; Wang, Z.; Rubin, E. M. Metagenomic discovery of biomass-degrading genes and genomes from cow rumen. **Science**, v. 331, p. 463-467, 2011.

Ho, C-Y.; Chang, J-J.; Lin, J-J.; Chin, T-Y.; Mathew, G.M.; Huang, C-C. Establishment of functional rumen bacterial consortia (FRBC) for simultaneous biohydrogen and

bioethanol production from lignocellulose. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, p. 12168-12176, 2011.

Hosseini, S.E.; Wahid, M.A.; Jamil, M.M.; Azli, A.A.M.; Misbah, M.F. A review on biomass-based hydrogen production for renewable energy supply. **International Journal of Energy Research**, v. 39, p. 1597–1615, 2015.

Huang, H-J.; Ramaswamy, S. Overview of biomass conversion processes and separation and purification technologies in biorefineries. **Separation and Purification Technologies in Biorefineries**. John Wiley & Sons, Ltd., pp. 1–36, 2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Banco de dados agregados**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 30 janeiro 2018.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Levantamento sistemático da produção agrícola. Pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. Janeiro, 2017

Intanoo, P.; Chaimongkol, P.; Chavadej, S. Hydrogen and methane production from cassava wastewater using two-stage upflow anaerobic sludge blanket reactors (UASB) with an emphasis on maximum hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, p. 6107-6114, 2016.

Jeon, B.S.; Moon, C.; Kim, B-C.; Kim, H.; Um, Y.; Sang, B-I. In situ extractive fermentation for the production of hexanoic acid from galactitol by *Clostridium* sp. BS-1. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 53, p. 143–151, 2013.

Kargi, F.; Eren, N.S.; Ozmihci, S. Bio-hydrogen production from cheese whey powder (CWP) solution: Comparison of thermophilic and mesophilic dark fermentations. **International journal of hydrogen energy**, v. 37, p. 8338-8342, 2012.

Kapdan IK, Kargi F. Bio-hydrogen production from waste materials. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 5, p. 569–582, 2006.

Karumanchi, R.S.M.S.; Doddamane, S.N.; Sampangi, C.; Todd, P.W. Field-assisted extraction of cells, particles and macromolecules. **Trends biotechnology**, v. 20, p. 72-78, 2000.

Kenealy, W.R.; Cao, Y.; Weimer, P.J. Production of caproic acid by cocultures of ruminal cellulolytic bacteria and *Clostridium kluyveri* grown on cellulose and ethanol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 44, p. 507-513, 1995.

Khan, M.A.; Ngo, H.H.; Guo, W.S.; Liu, Y.; Nghiem, L.D.; Hai, F.I.; Deng, L.J.; Wang, J.; Wu, y. Optimization of process parameters for production of volatile fatty acid, biohydrogen and methane from anaerobic digestion. **Bioresource Technology**, v. 219, p. 738-748, 2016.

Kim, S.H.; Han, S.K.; Shin, H.S. Feasibility of biohydrogen production by anaerobic co-digestion of food waste and sewage sludge. **International journal of hydrogen energy**, v. 29, n. 15, p. 1607-16, 2004.

Kim, S.; Choi, K.; Kim, J.-O.; Chung, J. Biological hydrogen production by anaerobic digestion of food waste and sewage sludge treated using various pretreatment technologies. **Biodegradation**, v. 24, p. 753–764, 2013.

KIM, S.A.; RHEE, M.S. Marked synergistic bactericidal effects and mode of action of medium-chain fatty acids in combination with organic acids against escherichia coli O157:H7. **Applied environmental and microbiology**, v. 79, p. 6552-6560, 2013.

Köchling, T.; Ferraz Jr, A.D.; Florencio, L.; Kato, M.T.; Gavazza, S. Pyrosequencing analysis of highly adapted azo dye-degrading microbial communities in a two-stage anaerobic-aerobic bioreactor treating textile effluent. **Environmental Technology**, v. 38, n. 6, p. 687-693, 2017.

Kumar, G.; Sivagurunathan, P.; Kim, S.H.; Bakonyi, P.; Lin, C.Y. Modeling and optimization of biohydrogen production from de-oiled Jatropha using the response surface method. **Arabian Journal for Science and Engineering**, v. 40, p. 15-22, 2015.

Lamaison, F.C. **Aplicação da água residuária do processamento da mandioca como substrato para a produção de hidrogênio por processo fermentativo**. Dissertação (mestrado em engenharia hidráulica e saneamento) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009. 83 f.

Lamaison, F. C.; Reginatto, V.; Antônio, R. Efeito de Diferentes pré-tratamentos de cultura mista para o enriquecimento em bactérias produtoras de hidrogênio. **XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, v. 1, n. 2, p. 717-724.

Lay, C-H.; Sen, B.; Huangm S-C. Chen, C-C.; Lin, C-Y. Sustainable bioenergy production from tofu-processing wastewater by anaerobic hydrogen fermentation for onsite energy recovery. **Renewable Energy**, v. 58, p. 60-67, 2013.

Laufenberg, G.; Kunz, B.; Nystroem, M. Transformation of vegetable waste into value added products: (a) the upgrading concept; (b) practical implementations. **Bioresource Technology**, v. 87, p. 167-198, 2003.

Lee, K-S.; Hsu, Y-F.; Lo, Y-C.; Lin P-J.; Lin, C-Y.; Chang, J-S. Exploring optimal environmental factors for fermentative hydrogen production from starch using mixed anaerobic microflora, **International Journal of Hydrogen Energy**, v.33, p. 1565-1572, 2008.

Levin, D.B.; Zhu, H.; Beland, M.; Cicek, N.; Holbein, B.E. Potential for hydrogen and methane production from biomass residues in Canada. **Bioresource technology**, v. 98, n. 3, p. 654-660, 2007.

Li, C.L.; Fang, .H.H.P. Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 37, n. 1, p. 1-39, 2007.

Liang, S.; Wan, C. Carboxylic acid production from brewer's spent grain via mixed culture fermentation. **Bioresource Technology**, v. 182, p. 179–183, 2015.

Lin, C-Y.; Lay, C-H.; Sen, B.; Chu, C-Y.; Kumar, G.; Chen, C-C.; Chang, J-S. Fermentative hydrogen production from wastewaters: a review and prognosis. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, p. 15632-15642, 2012.

Liu, H.; Wang, J.; Wang, A.; Chen, J. Chemical inhibitors of methanogenesis and putative applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 5, p. 1333-1340, 2011.

Logan, B.E.; Call, D.; Cheng, S.; Hamelers, H.V.M.; Sleutels, T.; Jeremiasse, A.W.; Rozendal, R.A. Microbial electrolysis cells for high yield hydrogen gas production from organic matter. **Environmental Science and Technology**, v. 42, p. 8630-8640, 2008.

Lucas, S.D.M.; Peixoto, G.; Mockaitis, G.; Zaiat, M.; Gomes, S.D. Energy recovery from agro-industrial wastewaters through biohydrogen production: Kinetic evaluation and technological feasibility. **Renewable Energy**, v. 75, p. 496-504, 2015.

Lucena, R.M.; Gavazza, S.; Florencio, L.; Kato, M.T.; Morais Jr, M.A. Study of the microbial diversity in a full-scale UASB reactor treating domestic wastewater. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 12, p. 2893-2902, 2011.

Luo, G.; Xie, L.; Zou, Z.; Zhou, Q.; Wang, J.Y. Fermentative hydrogen production from cassava stillage by mixed anaerobic microflora: effects of temperature and pH. **Applied energy**, v. 87, n 12, p. 3710-3717, 2010.

Luo, G.; Xie, L.; Zou, Z.; Wang, W.; Zhou, Q. Exploring optimal conditions for thermophilic fermentative hydrogen production from cassava stillage. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, p. 6161-6169, 2010.

Madeira, J.G.F.; Boloy, R.A.M.; Delgado, A.R.S.; Lima, F.R.; Coutinho, E.R.; Pereira Filho, R.C. Ecological analysis of hydrogen production via biogas steam reforming from cassava flour processing wastewater. **Journal of Cleaner Production**, v. 162, p. 709-716, 2017.

Mäkinen, A.E.; Nissila, M.E.; Puhakka, J.A. Dark fermentative hydrogen production from xylose by a hot spring enrichment culture. **International journal of hydrogen energy**, v. 37, p. 12234-12240, 2012.

Marone, A.; Varrone, C.; Fiocchetti, F.; Giussani, B.; Izzo, G.; Mentuccia, L.; Rosa, S.; Signorini, A. Optimization of substrate composition for biohydrogen production from buffalo slurry co-fermented with cheese whey and crude glycerol, using microbial mixed culture. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, p. 209-218, 2015.

Marshall, C. W.; Labelle, E. V.; May, H. D. Production of fuels and chemicals from waste by microbiomes. **Current opinion in biotechnology**, v. 24, p. 391-397, 2013.

McCARTY, P.L. Anaerobic waste treatment fundamentals – Part one: Chemistry and microbiology. **Public works**, v. 95, n. 9, p. 107-112, 1964.

Moraes, E.M.; Adorno, M.A.T.; Zaiat, M.; Foresti, E. Determinação de ácidos voláteis por cromatografia gasosa em efluentes de reatores anaeróbios tratando resíduos líquidos e sólidos. In: **VI Oficina e Seminário Latino-Americano de Digestão Anaeróbia**. Anais da VI Oficina e Seminário Latino-Americano de Digestão Anaeróbia, v 2. Recife – PE: Universitária – UFPE, 235-238 [in Portuguese], 2000.

Nandi, R.; Sengupta, S. Microbial production of hydrogen: an overview. **Critical Reviews Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 61-84, 1998.

Nicodemos, R. M.; Lima, A. M.; Assis, A. M. Produção de hidrogênio a partir da fermentação de compostos orgânicos. **In: Encontro interno, 7; Seminário de Iniciação Científica**, 12. Uberlândia. Anais... Uberlândia: UFU, 2008.

Nissila, M.E.; Tahti, H.P.; Rintala, J.A.; Puhakka, J.A. Thermophilic hydrogen production from cellulose with rumen fluid enrichment cultures: Effects of different heat treatments. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, p. 1482-1490, 2011.

Nocek, J.E.; Russell, J.B. Protein and energy as an integrated system. Relationship of ruminal protein and carbohydrate availability to microbial synthesis and milk production. *Journal of Dairy Science*, v. 71, p. 2070-2107, 1988.

O-Thong, S.; Prasertsan, P.; Karakashev, D.; Angelidaki, I. Thermophilic fermentative hydrogen production by the newly isolated *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* PSU-2. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 4, p. 1204-1214, 2008.

Onyenwoke, R.U.; Wiegel, J. *Thermoanaerobacter*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. **Springer Verlag**, New York, Heidelberg, v. 3, p. 1225-1239, 2009.

Ottaviano, L.M.; Ramos, L.R.; Botta, L.S.; Varesche, M.B.A.; Silva, E.L. Continuous thermophilic hydrogen production from cheese whey powder solution in an anaerobic fluidized bed reactor: Effect of hydraulic retention time and initial substrate concentration. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 8, 4848-4860, 2017.

Pakarinen, O.; Lehtoma, A.; Rintala, J. Batch dark fermentative hydrogen production from grass silage: the effect of inoculum, pH, temperature and vs ratio. **International journal of hydrogen energy**, v. 33, p. 594-601, 2008.

Penteado, E. D.; Lazaro, C. Z.; Sakamoto, I. K.; Zaiat, M. Influence of seed sludge and pretreatment method on hydrogen production in packed-bed anaerobic reactors. **International journal of hydrogen energy**, v. 38, p. 6137-6145, 2013.

Phowan, P.; Danvirutai, P. Hydrogen production from cassava pulp hydrolysate by mixed seed cultures: effects of initial pH, substrate and biomass concentrations. **Biomass and bioenergy**, v. 64, p. 1-10, 2014.

Portela, A. L. **Caracterização do processo produtivo, aspectos da qualidade da farinha de mandioca e percepção dos agentes da cadeia na região central do estado de Roraima**. Dissertação (Mestrado Profissional em Defesa Sanitária Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2015. 105 f.

Reis, C.M.; Silva, E.L. Effect of upflow velocity and hydraulic retention time in anaerobic fluidized-bed reactors used for hydrogen production. **Chemical engineering journal**, v. 172(1), p. 28-36, 2011.

Ren, N-Q.; Guo, W-Q.; Wang, X-J.; Xiang, W-S.; Liu, B-F.; Wang, X-Z.; Ding, J.; Chen, Z-B. Effects of different pretreatment methods on fermentation types and dominant bacteria for hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, p. 4318-4324, 2008.

Rosa, P.R.F.; Santos, S.C.; Sakamoto, I.K.; Varesche, M.B.A.; Silva, E.L. 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, p. 13118-13127, 2014.

Rosa, P.R.F.; Gomes, B.C.; Varesche, M.B.A.; Silva, E.L. Characterization and antimicrobial activity of lactic acid bacteria from fermentative bioreactors during hydrogen production using cassava processing wastewater. **Chemical engineering journal**, v. 284, p. 1-9, 2016.

Rosales-Colunga, L.M.; Razo-Flores, E.; Rodríguez, A.L. Fermentation of lactose and its constituent sugars by *Escherichia coli* WDHL: Impact on hydrogen production. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 180-184, 2012.

Sattar, A.; Arslan, C.; Ji, C.; Sattar, S.; Umair, M.; Sattar, S.; Bakht, M.Z. Quantification of temperature effect on batch production of bio-hydrogen from rice crop wastes in an anaerobic bio reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 26, p. 11050-11061, 2016.

Silva, J.L. **Desempenho do reator anaeróbio horizontal com chicanas no tratamento da manipueira em fases separadas e estabilização do pH com conchas de sururu**. Dissertação (Mestrado em Recursos Hídricos e Saneamento) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2009. 99 f.

Sivagurunathan, P.; Kumar, G.; Bakonyi, P.; Kim, S-H.; Kobayashi, T.; Xu, K.Q.; Lakner, G.; Tóth, G.; Nemestóthy, N.; Belafi-Bako, K. A critical review on issues and overcoming strategies for the enhancement of dark fermentative hydrogen production in continuous systems. **International jornal of hydrogen energy**, v. 41, n. 6, p. 3820-3836, 2016.

SEBRAE - Serviço Brasileiro de Apoio A Micro E Pequena Empresa. **Eficiência econômica e competitividade da cadeia produtiva da mandioca em alagoas**. FADE/UFPE. MACEIÓ, AL, 2005. 84p.

Shida, G. M. ; Amorim, E. L. C. ; Silva, E. L. Hydrogen and volatile fatty acids production in anaerobic fluidized bed reactor using heat-treated sludge anaerobic. In: **WORLD HYDROGEN ENERGY CONFERENCE (WHEC2008)**, 17th, Brisbane. Proceedings... Brisbane, 2008.

Smith, D.P.; McCarty, P.L. Reduced product formation following perturbation of ethanol- and propionate-fed methanogenic CSTRs. **Biotechnology and Bioengineer**, v. 34, p. 885-895, 1989.

Sparling, R.; Risbey, D.; Poggi-Varaldo, H.M. Hydrogen production from inhibited anaerobic composters. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 22, n.6, p. 563-566, 1997.

Spirito, C. M.; Richter, H.; Rabaey, K.; Stams, A. J. M.; Angenent, L. T. Chain elongation in anaerobic reactor microbiomes to recover resources from waste. **Current opinion in biotechnology**, v. 27, p. 115-122, 2014.

- Sprott, G.D.; Jarrell, K.F.; Shaw, K.M.; Knowles, R. Acetylene as an inhibitor of methanogenic bacteria. **Journal of General Microbiology**, v. 128, p. 2453-2462, 1982.
- Steinbusch, K.J.J.; Hamelers, H.V.M.; Buisman, C.J.N. Alcohol Production Through Volatile Fatty Acids Reduction With Hydrogen as Electron Donor by Mixed Cultures. **Water Research**, v.42, p. 4059-4066, 2008.
- Steinbusch, K.J.; Hamelers, H.V.M.; Plugge, C.M.; Buisman, C.J.N. Biological formation of caproate and caprylate from acetate: fuel and chemicals from low grade biomass. **Energy environmental science**, v. 4, p. 216-224, 2011.
- Sunyoto, N.M.S.; Zhu, M.; Zhang, Z.; Zhang, D. Effect of Biochar Addition and Initial pH on Hydrogen Production from the First Phase of Two-Phase Anaerobic Digestion of Carbohydrates Food Waste. **Energy Procedia. The 8th International Conference on Applied Energy – ICAE2016**, v. 105, p. 379-384, 2017.
- Tilman, D.; Socolow, R.; Foley, J. A.; Hill, J.; Larson, E.; Lynd, L.; Pacala, S.; Reilly, J.; Searchinger, T.; Somerville, C.; Williams, R. Energy, beneficial biofuels-the food, energy and environmental trilemma. **Science**, v. 325, p. 270-271, 2009.
- Turner, J.; Sverdrup, G.; Mann, M.K.; Maness, P.-C.; Kroposki, B.; Ghirardi, M.; Evans, R.J.; Blake, D. Renewable hydrogen production. **International journal of hydrogen energy**, v. 32, p. 379-407, 2008.
- Valdez-Vazquez, I.; Sparling, R.; Risbey, D.; Rinderknecht-Seijas, N.; Poggi-Varaldo, H.M. Hydrogen generation via anaerobic fermentation of paper mill wastes. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1907-1913, 2005.
- Valdez-Vazquez, I.; Poggi-Varaldo, H. M. Hydrogen production by fermentative consortia. **Renewable sustain energy rev**, v. 13, p. 1000-13, 2009.
- Van Ginkel, S.; Sung, S.; Lay, J.J. Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration. **Environmental Science Technology**, v. 35, p. 4726-4730, 2001.
- Van Ginkel, S.W.; Logan, B. Increased biological hydrogen production with reduced organic loading. **Water Research**, v. 39, n. 16, p. 3819-3826, 2005.
- Vasmara, C.; Marchetti, R. Initial pH influences in-batch hydrogen production from scotta permeate. **International journal of hydrogen energy**, v. 42, p. 14400-14408, 2017.
- Vasudevan, D.; Richter, H.; Angenent, L. T. Upgrading dilute ethanol from syngas fermentation to n-caproate with reactor microbiomes. **Bioresource technology**, v. 151, p. 378-382, 2014.
- Wallace, R.J.; Chaudhary, L.C.; Miyagawa, E.; McKain, N.; Walker, N.D. Metabolic properties of eubacterium pyruvativorans, a ruminal 'hyperammonia-producing' anaerobe with metabolic properties analogous to those of *Clostridium kluyveri*. **Microbiology**, v. 150, p. 2921-2930, 2004.
- Wang, J.; Wan, W. Factors influencing hydrogen production: a review. **International journal of hydrogen energy**, v. 34, p.799-811, 2009a.

- Wang, J.; Wan, W. Experimental design methods for fermentative hydrogen production: a review. **International journal of hydrogen energy**, v. 34, p. 235-44, 2009b.
- Wang, A.; Gao, L.; Ren, N.; Xu, J.; Liu, C.; Lee, D-J. Enrichment strategy to select functional consortium from mixed cultures: Consortium from rumen liquor for simultaneous cellulose degradation and hydrogen production. **International journal of hydrogen energy**, v. 35, p. 13413-13418, 2010.
- Wang, W.; Xie, L.; Luo, G.; Zhou, Q. Enhanced fermentative hydrogen production from cassava stillage by co-digestion: the effects of different co-substrates. **International journal of hydrogen energy**, v. 38, p. 6980-6988, 2013.
- Wang, K.; Yin, J.; Shen, D.; Li, N. Anaerobic digestion of food waste for volatile fatty acids (VFAS) production with different types of inoculum: effect of pH. **Bioresource technology**, v. 161, p. 395-401, 2014.
- Wang, S.; Zhang, T.; Su, H. Enhanced hydrogen production from corn starch wastewater as nitrogen source by mixed cultures. **Renewable Energy**, v. 96, p. 1135-1141, 2016.
- Weimer, P.J.; Stevenson, D.M. Isolation, characterization, and quantification of *Clostridium kluyveri* from the bovine rumen. **Applied Microbial and Cell Physiology**, v. 94, p. 461-466, 2012.
- Weimer, P.J.; Nerdahl, M.; Brandl, D.J. Production of medium-chain volatile fatty acids by mixed ruminal microorganisms is enhanced by ethanol in co-culture with *Clostridium kluyveri*. **Bioresource Technology**, v. 175, p. 97-101, 2015.
- Wosiacki, G.; Cereda, M. P. Valorização de resíduos do processamento da mandioca. **Publication UEPG. Exact and soil sciences, agrarian s. and engineering**, Ponta Grossa, v. 8, p.27-43, 2002.
- Wu, K.J.; Chang, C.F.; Chang, J.S. Simultaneous production of biohydrogen and bioethanol with fluidized-bed and packed bed bioreactors containing immobilized anaerobic sludge. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1165-1171, 2007.
- Zheng, H.; Zeng, R.J.; Angelidaki, I. Biohydrogen production from glucose in upflow biofilm reactors with plastic carriers under extreme thermophilic conditions (70 °C). **Biotechnology and Bioeng**, v. 100, n. 5, p. 1034-1038, 2008.
- Zhi, Z.; Wang, H. White-rot fungal pretreatment of wheat straw with *Phanerochaete chrysosporium* for biohydrogen production: simultaneous saccharification and fermentation. **Bioprocess Biosyst Eng.**, n. 37, p. 1447-1458, 2014.
- Zhu, J.; Lia, Y.; Wua, X.; Millera, C.; Chenb, P.; Ruanb, R. Swine manure fermentation for hydrogen production. **Bioresource technology**, v. 100, n. 22, p. 5472-5477, 2009.