



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro de Tecnologia e Ciências

Instituto de Química

Stella Buback dos Santos

**Produção de hidrogênio e metano em processo sequencial utilizando o
preparado enzimático sólido residual (PESR)**

Rio de Janeiro

2020

Stella Buback dos Santos

Produção de hidrogênio e metano em processo sequencial utilizando o preparado enzimático sólido residual (PESR)

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Processos Químicos, Petróleo e Meio Ambiente.

Orientadoras: Prof^ª. Dr^ª. Marta Antunes Pereira Langone
Prof^ª. Dr^ª. Viridiana Santana Ferreira-Leitão
Dr^ª. Érika Cristina Gonçalves Aguiéiras

Rio de Janeiro

2020

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC/Q

S237 Santos, Stella Buback dos.

Produção de hidrogênio e metano em processo sequencial utilizando o preparado enzimático sólido residual (PESR). – 2020.
113 f.

Orientador (a): Marta Antunes Pereira Langone
Viridiana Santana Ferreira-Leitão
Érika Cristina Gonçalves Agueiras

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro.
Instituto de Química.

1. Fermentação – Teses. 2. Digestão anaeróbia – Teses. 3. Biodiesel – Teses. 4. Lipase – Teses. 5. Hidrogênio – Teses. 6. Metano – Teses. I. Langone, Marta Antunes Pereira. II. Ferreira-Leitão, Viridiana Santana. III. Agueiras, Érika Cristina Gonçalves. VI. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Química. V. Título.

CDU 662.756.3

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.



Assinatura

30/01/2023

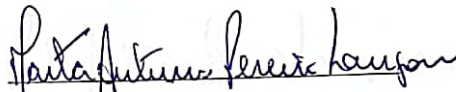
Data

Stella Buback dos Santos

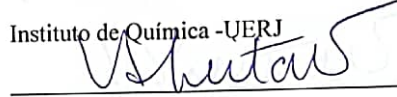
Produção de hidrogênio e metano em processo sequencial utilizando o preparado enzimático sólido residual (PESR)

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Processos Químicos, Petróleo e Meio Ambiente.

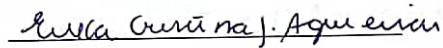
Aprovada em 19 de fevereiro de 2020
Banca examinadora


Prof.ª Dr.ª Marta Antunes Pereira Langone

Instituto de Química -UERJ

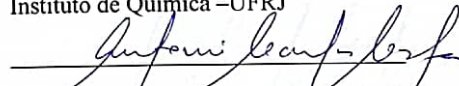

Prof.ª Dr.ª Viridiana Santana Ferreira-Leitão

Laboratório de biocatálise -INT/MCTIC

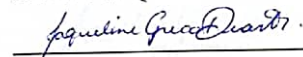


Dra. Érika Cristina Gonçalves Aguiéiras

Instituto de Química -UFRJ

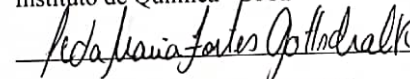

Prof. Dr. Antonio Carlos Augusto da Costa

Instituto de Química -UERJ



Dra. Jaqueline Greco Duarte

Instituto de Química -UFRJ



Dra. Leda Maria Fortes Gottschalk

Embrapa Agroindústria de Alimentos

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho

Aos meus pais Mauricio Carvalho dos Santos, Maria Elena Buback e Sandra Shirley Ximeno Chiaro, por todo amor, carinho e suporte que me levaram a sempre continuar em frente.

Aos meus irmãos Luciana Pina dos Santos, André Pina dos Santos e Raul Chiaro dos Santos por todo carinho e implicâncias, por acreditarem em mim e me incentivarem.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof^ª. Dra. Marta Antunes Pereira Langone pela confiança depositada em mim, por ter aceitado me orientar, por todo carinho, por todos os conselhos, incentivos e cobranças.

À minha orientadora Prof^ª. Dra. Viridiana Santana Ferreira-Leitão por ter me recebido de braços abertos de volta ao LABIC, por sempre estar presente para indicar a direção correta que o trabalho deveria tomar e por muitas vezes ter sido uma conselheira, me ajudando a superar os obstáculos encontrados, sempre com muita paciência e carinho. Obrigada por me manter motivada durante todo o processo.

À minha orientadora Dra. Erika Cristina Gonçalves Aguiéiras por confiar que eu seria capaz de levar a sua ideia inicial de aproveitar o PESR à frente, e por todo apoio e suporte.

À Dra. Ayla Sant'Ana da Silva, pelos conselhos, críticas construtivas e pelas contribuições dadas durante todo o processo.

À Prof^ª. Denise Maria Guimarães Freire e ao Labim pelo material e espaço cedidos para a confecção do PESR.

À Mariana Oliveira Faber, que sempre me ajudou com sua vasta experiência desde o início deste projeto de pesquisa, por todas as correções ao meu português, todos os auxílios durante os meus desesperos e por todas as risadas compartilhadas.

À Ingrid Miguez por compartilhar o seu conhecimento sobre a manana, pela ajuda na parte de caracterização da biomassa, por rir das minhas piadas sem graça, por toda a paciência e ajuda nos momentos difíceis.

À Carolina Lázaro, Marina Tomasini e Roberta Espinheira por toda a ajuda, incentivo, toda a contribuição, troca de conhecimentos, risadas e carinho.

Aos queridos colegas do Laboratório de Biocatálise (LABIC/INT), pelo ambiente agradável e estimulante de pesquisa.

À Lívian pela orientação durante a minha iniciação científica pela oportunidade e todos os ensinamentos.

À Ana Cristina de Araújo Collaço e a Juliana Gomes Santos por toda ajuda na preparação do PESR.

Aos meus amigos Andreia Ana, Carolina Blois, Erika Lisboa e Vitor Sá por todo incentivo, carinho, apoio e por saberem como alegrar o meu dia.

À minha prima Maisa Queiroz por todo carinho, conselhos e nunca me deixar desistir.

À Universidade do Estado do Rio de Janeiro e o seu corpo docente que demonstrou estar comprometido com a qualidade e excelência do ensino

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

À CAPES pela bolsa concedida

Na vida, não existe nada a se temer, apenas a ser compreendido.

Marie Curie

RESUMO

SANTOS, S. B. dos *Produção biológica de hidrogênio e metano em processo sequencial utilizando resíduo de preparado enzimático sólido como fonte de substrato*. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

A obtenção de biocatalisadores por Fermentação em Estado Sólido (FES) a partir da biomassa residual da indústria de óleos tem sido investigada com o intuito de diminuir os custos da produção enzimática de biodiesel. O meio de cultivo sólido contendo lipases após a FES pode ser usado inteiramente como um biocatalisador com atividade lipásica, denominado Preparado Enzimático Sólido (PES). O PES vem sendo estudado como biocatalisador para a produção de biodiesel a partir da reação entre o destilado de desodorização do óleo de palma (DDOP) e etanol. Nesse processo, após a produção de 1L de biodiesel são gerados cerca de 350g do Preparado Enzimático Sólido Residual (PESR). O PESR é um resíduo rico em matéria orgânica, o que o torna atraente para a produção biológica de H_2 via fermentação e CH_4 via digestão anaeróbia em processo sequencial. Dessa forma, a utilização do PESR é interessante por gerar valor agregado a esse resíduo da produção de biodiesel, além de produzir energia limpa e descentralizada. Com isso o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de hidrogênio (H_2) e metano (CH_4) utilizando como matéria-prima o PESR e, como inóculo, o lodo anaeróbio proveniente do biodigestor de uma estação de tratamento de esgoto na cidade do Rio de Janeiro. Para a produção de H_2 , o lodo foi pré-tratado termicamente (PTT) a $65^\circ C$ por 30 minutos e, para a produção de CH_4 , o lodo foi utilizado sem pré-tratamento (SPT). A fermentação foi conduzida em um frasco tipo penicilina de 100 mL, com um volume de trabalho de 45 mL. O meio teve o pH inicial ajustado para 5,5 e foi purgado com N_2 por 45 s, para ser incubado a 150 rpm e $35^\circ C$ por 24 h. A digestão seguiu o mesmo procedimento com a diferença do pH inicial ajustado para 7,0. A análise de óleos e graxas indicou que $60\pm 3\%$ da massa do PESR é constituída de óleos e graxas. A caracterização total do PESR pelo método adaptado do NREL, para caracterização de biomassa, indicou que 71% da massa é material extraído, 17% de açúcares sendo o principal a manose, 10% de sólidos insolúveis em H_2SO_4 e 2% de cinzas. Para a produção de H_2 foram avaliadas quatro concentrações de PESR, 15; 23; 31 e 46 g_{PESR}/L em 24 h e um estudo de cinética até 48h. O melhor rendimento em H_2 foi obtido em 24 h com concentração de 31 g_{PESR}/L resultando em $172 \pm 32 mL_{H_2}/L.g_{PESR}$. Na produção sequencial de CH_4 o melhor rendimento foi em 35 dias ($214 \pm 1 mL_{CH_4}/g_{DQO}$), o que representou 61% de eficiência. Os resultados obtidos mostram que o PESR é um resíduo com potencial para a produção de biogás, sendo constituído principalmente de ácidos graxos que servem como fonte de carbono para os microrganismos.

Palavras-chaves: Preparado Enzimático Sólido Residual. Produção biológica de hidrogênio. Fermentação. Digestão anaeróbia. Produção sequencial de hidrogênio e metano.

ABSTRACT

SANTOS, S. B. dos *Sequential hydrogen and methane production in biological process using Residual Dry Fermented Solid (RDFS) as a source of substrate*. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

The production of biocatalysts by Solid-State Fermentation (SSF) from the residual biomass of the oil industry has been investigated in order to reduce the costs of enzymatic production of biodiesel. The culture medium with lipase after SSF can be used entirely as a lipase-active biocatalyst called Dry Fermented Solid (DFS). DFS has been studied as a biocatalyst for biodiesel production from the reaction between Palm Fatty Acid Distillate (PFAD) and ethanol. In this process, after the production of 1L of biodiesel, about 350g of Residual Dry Fermented Solid (RDFS) is generated. RDFS is a waste rich in organic matter, which makes it attractive for the biological production of H₂ via fermentation and CH₄ production via anaerobic digestion in a sequential process. Thus, the use of RDFS is interesting because it adds value to this residue from biodiesel production, besides producing clean and decentralized energy. Thus, the objective of this work was to evaluate the production of H₂ and CH₄ in a sequential process using RDFS, derived from biodiesel production, and as inoculum, an anaerobic sludge from the biodigester of a sewage treatment plant located in Rio de Janeiro city. For H₂ production, sludge was heat-treated (HT) at 65°C for 30 minutes, and CH₄ production, sludge was used without pretreatment (WP). Fermentation was conducted in a 100 mL penicillin flask with a working volume of 45 mL. The medium had the initial pH adjusted to 5.5 and was purged with N₂ for 45 s to be incubated at 150 rpm and 35 ° C for 24 h. Digestion followed the same procedure, with the initial pH adjusted to 7.0. Analysis of oils and greases indicated that 60 ± 3% of the mass of RDFS is made up of oils and greases. The complete characterization of RDFS by the adapted NREL's method indicated that 71% of the mass is extracted material, 17% of sugars being the main mannose, 10% of insoluble solids in H₂SO₄ and 2% of ash. For H₂ production, four RDFS concentrations were evaluated, 15; 23; 31 and 46 g_{RDFS} / L at 24 h, and a kinetics study was also carried out. The best H₂ yield was obtained at 24h with a concentration of 31 g_{RDFS} / L resulting in 172 ± 32 mLH₂ /L g_{RDFS}. In the sequential production of CH₄, the best yield was 35 days (214 ± 1 mLCH₄/gCOD), which represented 61% efficiency. The results show that RDFS is a residue with potential for the production of biogas, consisting mainly of fatty acids that serve as a carbon source for microorganisms

Keyword: Dry Residual Dry Fermented Solid. Biological Hydrogen Production. Fermentation. Anaerobic Digestion. Sequential Production of Hydrogen and Methane

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Bactéria do gênero <i>Clostridium spp.</i>	27
Figura 2 - Etapas da fermentação anaeróbia realizadas pelo consórcio de bactérias.	29
Figura 3 - Rota metabólica da glicose	32
Figura 4 - Processo de formação do esporo.....	34
Figura 5 - Produção de biodiesel utilizando PES como biocatalisador	54
Figura 6 - Produção de H ₂ e de CH ₄ em processo sequencial	55
Figura 7 - Biorrefinaria da palma	57
Figura 8 - Esquema da caracterização pela metodologia de determinação estrutural de carboidratos e lignina na biomassa.	62
Figura 9 - Esquema da produção de hidrogênio	64
Figura 10 - Etapas de avaliação da produção de hidrogênio.	64
Figura 11 - Fluxograma da produção de metano em processo sequencial de dois estágios.....	67
Figura 12 - Esquema resumido da obtenção do PESR	71
Figura 13- Caracterização da torta da amêndoa da palmeira <i>Elaeisguineenses</i> (A) Foto da torta (B).....	72
Figura 14 - Caracterização da fibra obtida do fruto da palmeira <i>Elaeisguineenses</i> (A) Foto da fibra (B).	73
Figura 15 - Gráfico da caracterização do PES (A) Foto do biocatalisador PES (B).	74
Figura 16 - Caracterização do PESR (A) Foto do PESR (B).	75
Figura 17- Análise de DQO do PESR. DQO1: DQO total do PSER, DQO2: DQO da fração líquida obtida após extração com água do PESR, DQO3: DQO da fração líquida obtida após extração com etanol do PESR, DQO4: DQO do resíduo sólido do PSER após extração com solventes.	76
Figura 18 - Avaliação do pré-tratamento térmico do inóculo na produção de hidrogênio e de metano.	77
Figura 19 - Influência da concentração de PESR (15, 23, 31 e 46 g _{PESR} L ⁻¹) no rendimento em hidrogênio A fermentação foi conduzida por 24h, a 35°C com o lodo pré-tratado termicamente a 65°C por 30 min.	78

Figura 20 - Influência da concentração de PESR na concentração de analitos no meio fermentativo no início (0h) e ao final da fermentação (24 h) a 35°C. A: 15g PESRL ⁻¹ . B: 23g PESRL ⁻¹ . C: 31g PESRL ⁻¹ . D: 46g PESRL ⁻¹	80
Figura 21 - Cinética da produção experimental de hidrogênio (linha laranja) e da produção teórica (linha azul) descrita pela equação de Gompertz. A fermentação ocorreu ao longo de 48h, a 35°C e contendo 31g PESR L ⁻¹	82
Figura 22 - Concentração de analitos no meio fermentativo durante a fermentação anaeróbia para produção de Hidrogênio, conduzida por 48 h, a 35°C, empregando 31g PESRL ⁻¹	83
Figura 23 - Rota metabólica resumida do glicerol, apresentando o desvio da rota para formação de 1,3 propanodiol.	84
Figura 24 - Influência da atividade catalítica do PESR na liberação de ácidos palmítico e oléico ao longo de 24h a 35°C. Inativo: experimento realizado com o PESR (31g PESR L ⁻¹) previamente inativado (105 °C por 2h) na ausência de lodo PTT. In natura: experimento realizado com o PESR (31g PESR L ⁻¹) na ausência de lodo PTT. Fermentação: experimento realizado com o PESR (31g PESR L ⁻¹) na presença de lodo PTT.	86
Figura 25 - Produção de metano por fermentação anaeróbia em processo de um estágio ao longo de 35 dias, a 35°C, empregando 31g PESRL ⁻¹	88
Figura 26 - Variação da DQO estimada da produção de metano e DQO solúvel na produção de metano em processo de um estágio, conduzido por 35 dias, a 35°C, empregando 31g PESRL ⁻¹ , pH inicial 7,0.	89
Figura 27 - Concentração de analitos no meio fermentativo durante a digestão anaeróbia para produção de metano em processo de um estágio, conduzida por 35 dias, a 35°C, empregando 31g PESRL ⁻¹ , pH inicial 7,0.	90
Figura 28 - Produção de metano por fermentação anaeróbia em processo de dois estágios ao longo de 35 dias, a 35°C, empregando 31g PESRL ⁻¹ e pH inicial 7,0.	92
Figura 29 - Variação da DQO estimada a partir do volume de metano obtido e DQO solúvel na produção de metano em processo de dois estágios, conduzido por 35 dias, a 35°C, empregando 31g PESR L ⁻¹ e pH inicial 7,0.	93
Figura 30 - Concentração de analitos no meio durante a produção de metano em processo de dois estágios, conduzido por 35 dias, a 35°C, empregando 31g PESR L ⁻¹ e, pH inicial 7,0.	94

Figura 31 - Concentração de analitos no meio fermentativo durante a produção de metano em processo de dois estágios, conduzido por 35 dias, a 35°C, empregando 31g PESR L ⁻¹ , pH inicial 7,0.	94
Figura 32 - Curva analítica do gás hidrogênio	106
Figura 33 - Curva analítica do gás metano	106
Figura 34 - Curva analítica do gás carbônico	107
Figura 35 - Curva analítica do ácido acético variando de 2,5mM a 6 mM.	108
Figura 36 - Curva analítica do ácido acético variando de 1mM a 50mM.	108
Figura 37 - Curva analítica do ácido butírico variando de 0,5mM a 4mM.	109
Figura 38 - Curva analítica do ácido butírico variando de 1mM a 50mM.	109
Figura 39 - Curva analítica do glicerol variando de 0,5mM a 5 mM.	110
Figura 40 - Curva analítica do glicerol variando de 1 mM a 50 mM.	110
Figura 41 - Curva analítica do 1,3 propanodiol variando de 1 mM a 5 mM.	110
Figura 42 - Curva analítica do 1,3 propanodiol variando de 1 mM a 50 mM.	111
Figura 43 - Curva analítica do ácido palmítico variando de 19 µg L ⁻¹ a 300 µg L ⁻¹	112
Figura 44 - Curva analítica do ácido oléico variando de 46 µg L ⁻¹ a 370 µg L ⁻¹	112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Energia liberada por combustível.....	21
Tabela 2 - Produção de hidrogênio via fontes renováveis mais estudadas de biomassa.	23
Tabela 3 - Processo de produção biológica de hidrogênio.	25
Tabela 4 - Microrganismos produtores de hidrogênio	27
Tabela 5 - Estudos de produção biológica de hidrogênio por fermentação anaeróbia utilizando pré-tratamento térmico.	38
Tabela 6 - Estudos de produção biológica de hidrogênio por fermentação anaeróbia utilizando pré-tratamento de pH.	40
Tabela 7 - Resíduos líquidos agroindustriais e seus pré-tratamentos.	49
Tabela 8 - Caracterização de algumas biomassas lignocelulósicas	50
Tabela 9 - Resíduos sólidos agroindustriais e seus pré-tratamentos	53
Tabela 10 - Produção de metano em processo de um estágio e em processo sequencial de dois estágios	56
Tabela 11 - Porcentagem dos gases utilizadas para a construção da curva analítica	68

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	18
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
1.1 Utilização do Hidrogênio como vetor energético	21
1.1.1 <u>Processos termoquímicos</u>	24
1.1.2 <u>Processos bioquímicos</u>	25
1.1.3 <u>Produção de Hidrogênio por fermentação anaeróbica</u>	26
1.1.4 <u>Pré-tratamento do lodo anaeróbico para produção de hidrogênio por fermentação anaeróbia</u>	33
1.1.4.1 Pré-tratamento Físico	35
1.1.4.2 Pré-tratamento Químico	38
1.1.5 <u>Fatores que influenciam a produção de hidrogênio por via fermentativa</u>	40
1.1.5.1 Influência da temperatura na fermentação	41
1.1.5.2 Influência do pH na fermentação	41
1.1.5.3 Nutrientes	42
1.1.5.3.1 Macronutrientes.....	42
1.1.5.3.2 Micronutrientes	43
1.2 Utilização de resíduos agroindustriais para produção de Hidrogênio por fermentação anaeróbia.....	46
1.2.1 <u>Resíduos Líquidos</u>	47
1.2.2 <u>Resíduos Sólidos</u>	49
1.3 Produção sequencial de hidrogênio e metano utilizando PESR como matéria prima 55	
2. OBJETIVO	58
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	59
4. MATERIAIS E MÉTODOS	60
4.1 Origem do PESR	60
4.2 Caracterização do PESR	60

4.3	Lodo anaeróbio	63
4.4	Produção de Hidrogênio em fermentação anaeróbia	63
4.4.1	<u>Influência do pré-tratamento do inóculo na produção de hidrogênio</u>	64
4.4.2	<u>Influência da concentração de Preparado Enzimático Sólido Residual (PESR)</u>	65
4.4.3	<u>Avaliação da cinética de produção de hidrogênio</u>	65
4.4.4	<u>Análise da atividade catalítica do PESR</u>	66
4.5	Produção de metano em dois estágios	67
4.6	Determinação do teor de gases	68
4.7	Determinação da concentração de metabólitos de substratos no meio de fermentação	69
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
5.1	Caracterização do PESR	71
5.2	Produção de hidrogênio via fermentação	76
5.2.1	<u>Influência do pré-tratamento térmico do inóculo na produção de Hidrogênio</u>	76
5.2.2	<u>Influência da concentração de PESR na produção de hidrogênio</u>	78
5.2.3	<u>Avaliação da cinética de produção de hidrogênio</u>	80
5.3	Produção de metano	86
5.3.1	<u>Produção de metano em um estágio</u>	86
5.3.2	<u>Produção de metano em processo sequencial de dois estágios</u>	90
	CONCLUSÕES	95
	ANEXO A - Curvas analíticas dos gases	106
	ANEXO B - Curvas analíticas dos ácidos voláteis, glicerol e 1,3 propanodiol	108
	ANEXO C - Curvas analíticas dos ácidos graxos	112

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a produção brasileira de biodiesel aumentou devido à exigência de adições crescentes de biodiesel ao diesel, de acordo com a lei 13.033/2014 (FABER; FERREIRA-LEITÃO, 2016). Buscando-se alternativas mais sustentáveis para a produção deste biocombustível, a utilização de biocatalisadores e subprodutos de óleos vegetais ricos em ácidos graxos tem se destacado (AGUIEIRAS et al., 2017a; SOARES et al., 2013). No entanto, a utilização de enzimas comerciais, geralmente de alto custo, inviabiliza a produção de *commodities* como o biodiesel (SILVA et al., 2017). Diversas pesquisas têm sido realizadas visando à obtenção de um biocatalisador eficiente e de baixo custo. Dentre elas destaca-se o Preparado Enzimático Sólido (PES) com atividade lipásica, biocatalisador obtido por fermentação em estado sólido (FES). A produção de PES utilizando resíduos sólidos da agroindústria como matéria-prima para a FES é atrativa, pois diminui o custo do biocatalisador, eliminando etapas de extração, purificação e imobilização das enzimas (AGUIEIRAS et al., 2019; LIU et al., 2013; SERRES et al., 2017).

O Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LaBiM)/IQ-UFRJ desenvolve a produção de PES e sua aplicação na síntese de biodiesel. Neste processo, a FES é realizada com o fungo filamentosso *Rhizomucor miehei* produtor de lipases utilizando como matéria-prima a torta e a fibra de palma *Elaeis guineenses*. Ao final da FES, o material fermentado (PES) pode ser liofilizado e empregado como um biocatalisador heterogêneo na síntese de biodiesel a partir da utilização de outro subproduto da produção de óleo de palma: o destilado desodorizado de óleo de palma (DDOP). O DDOP é uma matéria-prima residual, oriunda do refino do óleo de palma, e rica em ácidos graxos. A síntese de biodiesel ocorre através das reações de transesterificação e esterificação dos triglicerídeos e ácidos graxos, respectivamente, presentes no DDOP com álcoois de cadeia curta, tais como o etanol (MESSIAS et al., 2011; SOUZA et al., 2009). Essas reações são catalisadas pelas lipases presentes no PES. No entanto, após a reação, o biodiesel é separado do biocatalisador, que se transforma em um novo resíduo, denominado Preparado Enzimático Sólido Residual (PESR). Por exemplo, neste processo, para cada 1L de biodiesel produzido, 350g de PESR são gerados (AGUIEIRAS et al., 2017b). O PESR é um subproduto rico em matéria orgânica

devido à sua origem, bem como à presença de meio reacional residual retido no material após a reação, o que o torna interessante para a produção biológica de hidrogênio, via fermentação, e de produção de metano, via digestão anaeróbica, em um processo sequencial.

O hidrogênio é interessante como vetor energético, pois ele libera três vezes mais energia aproximadamente que os outros combustíveis a base de carbono e a sua combustão libera apenas água. Além disso, ele pode ser aplicado na indústria química, de fertilizantes, alimentos entre outros (MIDILLI et al., 2004). No entanto, para que ele possa ser considerado renovável, o hidrogênio precisa ser produzido a partir de uma fonte renovável. Dentre os métodos de produção de hidrogênio a partir de fonte renovável, a produção biológica via fermentação se destaca. A produção biológica de hidrogênio via fermentação traz vantagens em comparação aos outros métodos como possuir um balanço energético mais favorável e não necessitar de exposição à luz (DUMAN et al., 2018). A fermentação utilizando um consórcio bacteriano é mais vantajosa do que o uso de culturas puras por ser mais resistente à contaminação e possibilitar a utilização de resíduos mais complexos (HALLENBECK; BENEMANN, 2002). Porém, ao final da fermentação a carga orgânica no efluente da produção de hidrogênio não é adequada para retornar ao meio ambiente (GARRITANO et al., 2018).

O estudo da produção de hidrogênio via fermentação em processo sequencial para produção de metano via digestão anaeróbia visa solucionar a geração de efluente da produção de hidrogênio e aproveitar de maneira mais racional a matéria prima utilizada. O metano produzido de fontes renováveis é interessante, pois ele é um dos combustíveis mais energéticos à base de carbono. Ele pode ser utilizado como gás de cozinha, combustível de carro ou aplicado como fonte de energia (AKOBI et al., 2016). A produção de metano em processo de dois estágios traz a vantagem de diminuir a carga orgânica do efluente deixando-o apto a retornar ao meio ambiente, aumenta o rendimento de metano em um intervalo de tempo menor e possui um maior aproveitamento energético em relação à produção de metano em um estágio (DENG et al., 2019).

A integração da produção de óleos com a produção de biodiesel e a geração de biogás permite a implantação de uma biorrefinaria da palma. Após a geração de biogás, o material residual ainda pode ser utilizado como biofertilizante, fechando o ciclo. Esse processo se

enquadra no conceito de bioeconomia, atendendo a maioria dos princípios da química verde (LENARDÃO et al., 2003). Dessa forma, a utilização do PESR como matéria-prima minimiza a geração de resíduos sólidos e agrega valor à cadeia produtiva do biodiesel, além de produzir energia limpa e descentralizada.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Utilização do Hidrogênio como vetor energético

O hidrogênio é um vetor energético interessante, pois a sua combustão gera água, não emite compostos tóxicos (Equação 1) e libera uma quantidade de energia aproximadamente três vezes maior do que os combustíveis à base de carbono, como apresentado na Tabela 1. Ele pode ser usado como combustível automotivo ou como gerador de energia elétrica através de células combustíveis. Além disso, o hidrogênio pode ser aplicado como matéria-prima nas indústrias de alimentos, microeletrônicos, de ferro e metais não ferrosos, química e de síntese de polímeros (MIDILLI et al., 2004).



Tabela 1 - Energia liberada por combustível

Combustível	Energia (J/kg)	Emissão de carbono (kg C/ kg combustível)
Hidrogênio	141,9	0,00
Óleo combustível	45,5	0,84
Gasolina	47,4	0,86
Metanol	22,3	0,50
Etanol	29,9	0,50
Biodiesel	37,0	0,50
Gás natural	50,0	0,46
Carvão	30,0	0,50

Fonte: MIDILLI et al., 2004

Na década de 1970, o hidrogênio passou a ser identificado com um vetor energético para o futuro. Ele é considerado como um vetor e não uma fonte por ser raramente encontrado na sua forma pura, H₂, natureza. Esse fato torna necessário que a sua produção seja feita a partir de outros compostos. Nesta mesma época, a Associação Internacional de Energia de Hidrogênio (*International Association of Hydrogen Energy- IAHE*) foi criada com o intuito de estudar a produção de hidrogênio via reatores nucleares de alta temperatura, para que no

futuro o hidrogênio fosse capaz de substituir os combustíveis fósseis. Com isso também foi criado o conceito de economia do hidrogênio, visando a substituição do uso de combustíveis fósseis pelo hidrogênio como fonte de energia. O conceito foi revisto após duas décadas, acrescentando questões sobre preocupações ambientais e em relação ao aumento do aquecimento global. Além disso, IAHE também aborda as temáticas relacionadas ao uso, transporte, armazenamento e produção do hidrogênio (MOLINER; LÁZARO; SUELVES, 2016; SOVACOOOL; BROSSMANN, 2010).

O hidrogênio como fonte de energia pode ser aplicado em células combustíveis ou motores de combustão ou queimadores de hidrogênio para produção de energia. Esta energia pode ser utilizada como energia elétrica, trabalho mecânico e calor, respectivamente (WÜNSCHERS; LINDBLAD, 2002), ampliando o seu uso energético para indústria, usos domésticos e transporte. No quesito transporte, as empresas de carro Honda, Toyota e General Motors, em 2010, começaram a investir na produção de carros movidos a hidrogênio para a comercialização em 2020. Em 2017, no Japão, onze empresas da indústria automotiva se juntaram para investir na construção da infraestrutura de estações de hidrogênio para os veículos com células combustíveis. A intenção dessas empresas e do governo japonês é construir 170 estações de hidrogênio e produzir 40 mil carros até 2020. O primeiro carro desta tecnologia foi lançado em 2014 pela Toyota. Esse modelo com o tanque cheio consegue uma autonomia de até quinhentos quilômetros, o que o leva a ser competitivo com os carros movidos a combustão (REDAÇÃO AUTOESPORTE, 2019; SANT'ANNA, 2019; SOVACOOOL; BROSSMANN, 2010)

Outro fator interessante é que o hidrogênio pode ser utilizado em praticamente todos os sistemas do gás natural, como, por exemplo, os sistemas de tubulação. O hidrogênio pode ser transportado por essas tubulações ou sua energia pode ser fornecida à rede elétrica, sendo transportada por fios e cabos de eletricidade. O primeiro caso possui uma menor perda de energia do que o segundo quando o transporte percorre longas distâncias e necessita carregar uma alta carga de energia. O transporte via tubulação deve levar em consideração a diferença de custos para com a manutenção desta tubulação. Isso porque a interação do hidrogênio com o metal da tubulação em condições específicas pode acarretar danos à integridade da tubulação. A investigação de qual a melhor concentração, composição e pressão ideal do gás

a ser transportado é necessária para diminuir os custos deste transporte (MOLINER; LÁZARO; SUELVES, 2016).

O armazenamento do hidrogênio pode ser feito de duas formas, uma com ele na fase gasosa, em que as condições sobre as tubulações de transporte seriam similares ao tanque de armazenamento e o cilindro teria que comportar um grande volume de armazenamento. A segunda maneira de armazenamento seria com o hidrogênio na fase líquida. Neste caso ele deve ser armazenado em temperaturas abaixo de -253°C ou sob alta pressão. A literatura indica que o ideal para solucionar este problema seria a invenção de um novo material capaz de lidar com os desafios de armazenamento do hidrogênio. Isso principalmente por conta do hidrogênio ser altamente inflamável e o seu vazamento poder acarretar em acidentes fatais (SOVACOOOL; BROSSMANN, 2010).

A produção de hidrogênio também deve ser reestruturada para se adequar aos conceitos da economia do hidrogênio. Isso porque 96% da sua produção é dependente do petróleo como matéria-prima. Então, para que ele possa se adequar aos conceitos da economia do hidrogênio, o mesmo deverá ser produzido via fontes renováveis, o que o classificaria como biocombustível (WÜNSCHERS; LINDBLAD, 2002).

As formas de produção de hidrogênio por fontes renováveis podem ser divididas em processos bioquímicos e termoquímicos, como apresentado na Tabela 2 (DUMAN et al., 2018).

Tabela 2 - Produção de hidrogênio via fontes renováveis mais estudadas de biomassa.

Processos	
Termoquímicos	Gaseificação
	Reforma a vapor
	Pirólise
Bioquímicos	Foto fermentação
	Fermentação anaeróbica

Fonte: DHYANI; BHASKAR, 2018; PRABAKAR et al., 2018

1.1.1 Processos termoquímicos.

Os processos termoquímicos utilizam catalisadores e/ou calor para transformar a biomassa em biocombustíveis. Os processos termoquímicos mais estudados para a produção de hidrogênio são a gaseificação, a reforma a vapor e a pirólise.

A gaseificação consiste em destruir a biomassa para produzir gás de síntese. Este gás contém principalmente hidrogênio, monóxido de carbono e dióxido de carbono. A gaseificação pode ser operada com ar, oxigênio, ar enriquecido com oxigênio, ar e vapor entre outros. Um dos desafios da produção de hidrogênio via gaseificação de biomassa é diminuir a temperatura de operação sem diminuir a quantidade de hidrogênio produzido. A desvantagem desse processo é a produção de alcatrão como subproduto. O alcatrão é uma mistura complexa de hidrocarbonetos e compostos aromáticos (BALAT et al., 2009; BARMAN; GHOSH; DE, 2012; CHANG et al., 2011; ŁUKAJTIS et al., 2018).

A reforma a vapor é uma tecnologia muito utilizada nas refinarias para a produção de hidrogênio. Uma das inovações estudadas é a utilização da reforma a vapor com etanol ou glicerol que é o principal resíduo da produção de biodiesel. O desafio dessa tecnologia é conseguir evitar a formação de monóxido de carbono, pois este dificulta a operação das células combustíveis que geralmente contém platina (Pt) e a adsorção de monóxido de carbono (CO) causa envenenamento da célula (PROFETI; TICIANELLI; ASSAF, 2009).

A pirólise é um processo de conversão da biomassa a temperaturas elevadas (200-600 °C) e sem a presença de oxigênio. A eficiência deste processo depende do catalisador usado, da taxa de aquecimento da biomassa, da temperatura e do tempo de processo. Os produtos finais da pirólise são principalmente carvão, hidrogênio, monóxido de carbono, metano, etano e bio-óleo (BALAT et al., 2009; ŁUKAJTIS et al., 2018).

Os processos termoquímicos quando comparados aos processos biológicos produzem mais hidrogênio. No entanto, apresentam um grande gasto de energia para a sua produção,

além de subprodutos tóxicos e/ou poluentes ao meio ambiente e à atmosfera(KHAN et al., 2018).

1.1.2 Processos bioquímicos

Os processos bioquímicos são os processos de produção de hidrogênio por vias biológicas. Seu processo de produção pode ser dependente de luz ou não, como ilustrado na Tabela 3 (BUNDHOO; MOHEE; HASSAN, 2015; PRABAKAR et al., 2018).

Tabela 3 - Processo de produção biológica de hidrogênio.

Processos de produção biológica de hidrogênio	
Dependente de luz	Biofotólise direta
	Biofotólise indireta
	Foto-fermentação
Independente de luz	Fermentação anaeróbica

Fonte: BUNDHOO; MOHEE; HASSAN, 2015; HALLENBECK; BENEMANNB, 2002

A biofotólise direta pode ser realizada por microalgas verdes, por exemplo, a *Chlamydomonas reinhardtii*. Este processo de produção de biohidrogênio consiste no uso de energia luminosa, juntamente com mecanismos fotossintéticos e enzimas, para a produção de hidrogênio, conforme reação demonstrada na Equação 2. No entanto, o oxigênio produzido pode interferir negativamente na biofotólise. Isto porque ele é considerado tóxico para as enzimas responsáveis pela formação do H₂. Essas enzimas são [FeFe]-hidrogenase e [NiFe]-hidrogenase(HALLENBECK; BENEMANNB, 2002; ŁUKAJTIS et al., 2018; MATHEWS; WANG, 2009).



A biofotólise indireta também realizada por cianobactérias. Este processo é dividido em duas etapas. A primeira etapa é a fotossíntese na presença de luz com a liberação de oxigênio. A segunda etapa na ausência de luz utiliza a energia armazenada nos produtos formados na fotossíntese para produzir hidrogênio a partir da água. Além disso, ocorre a fixação de nitrogênio utilizando o gás nitrogênio e o gás carbônico. (HALLENBECK; BENEMANN, 2002; ŁUKAJTIS et al., 2018; MATHEWS; WANG, 2009; SÁ; CAMMAROTA; FERREIRA-LEITÃO, 2014).

A foto-fermentação é um processo conduzido com bactérias fotossintéticas. Essas bactérias são usualmente as bactérias púrpuras não sulfurosas. A foto-fermentação ocorre com o auxílio da enzima nitrogenase, responsável pela formação do H₂ a partir de ácidos orgânicos, como fontes de carbono, e de fontes luminosas (HALLENBECK; BENEMANN, 2002; ŁUKAJTIS et al., 2018; MATHEWS; WANG, 2009).

A produção de hidrogênio via fermentação anaeróbica é o processo mais interessante quando comparada com os processos biológicos dependentes de luz justamente por não necessitar de uma área grande superficial exposta à luz solar e de conseguir reaproveitar diversos resíduos industriais e de biomassa (SHI et al., 2009; WANG et al., 2010).

1.1.3 Produção de Hidrogênio por fermentação anaeróbica

A produção biológica por via fermentativa (*dark fermentation*) para produção de hidrogênio pode ser realizada com culturas puras ou consórcios de bactérias. O microrganismo mais conhecido e estudado na produção de hidrogênio é o *Clostridium spp.*, porém existem outros no consórcio bacteriano, como apresentados e caracterizados na Tabela 4.

Clostridium butyricum é uma das espécies de bactéria mais estudadas e conhecidas para a produção de hidrogênio via fermentação anaeróbia. As bactérias *Clostridium spp.* são normalmente Gram-positivas e em forma de bastonetes. Elas podem ser encontradas em

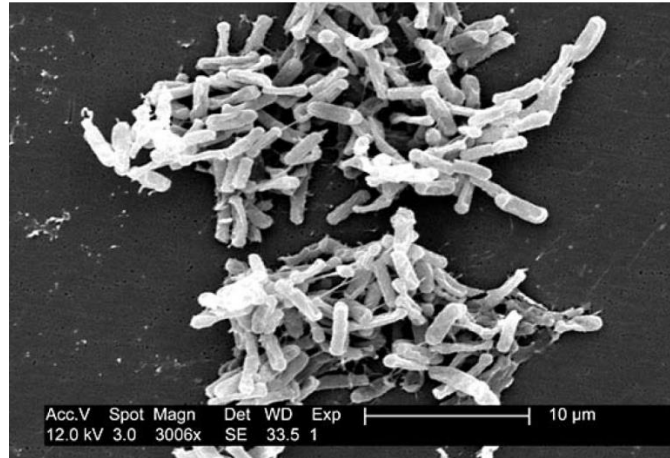
amostras de solo, de água e nos intestinos de seres humanos e de outros animais, por isso o *Clostridium spp.* está presente na maioria dos lodos anaeróbios. A maioria das bactérias do gênero *Clostridium spp.* são anaeróbias e resistentes a produtos químicos tóxicos, a detergentes e ao calor. Isso devido à sua capacidade de esporulação. Além disso, elas também são consideradas mesófilas, o que significa que a sua temperatura ideal está entre 25°C a 45°C. A literatura relata que o pH ideal para o seu crescimento está entre 5,0 e 6,0 (SHI et al., 2009; WONG; WU; JUAN, 2014). Na fase de crescimento exponencial dessa bactéria, ela produz hidrogênio e ácidos orgânicos e quando alcança a fase estacionária, passa a produzir solventes (etanol e butanol). As espécies de *Clostridium spp.* apresentam tamanhos diferentes dependendo da espécie, o *C. butyricum* varia de 0,6 a 7 micrometros de comprimento. A Figura 2 ilustra a bactéria do tipo *Clostridium spp.* (ADAV et al., 2009; AMY TIKKANEN, 2018; CHONG et al., 2009).

Tabela 4 - Microrganismos produtores de hidrogênio

Microrganismo	Características
<i>Clostridium spp.</i>	Anaeróbios e mesofílicos produtor H ₂ Fermenta uma ampla gama de carboidratos
<i>Thermoanaerobacterium spp.</i>	Anaeróbios termofílicos
<i>Ethanoligenens spp.</i>	Anaeróbios Produz solvente durante a produção de H ₂
<i>Bacillus spp.</i>	Anaeróbios facultativos Possui tolerância ao sal
<i>Enterobacter spp.</i>	Anaeróbios facultativos
<i>Klebsiella spp.</i>	Possui tolerância ao estresse oxidativo

Fonte: Adaptado de WONG; WU; JUAN, 2014

Figura 1 - Bactéria do gênero *Clostridium spp.*



Fonte: MICROGRAPH OF CLOSTRIDIUM DI CILE BACTERIA FROM A STOOL SAMPLE, 2018

O consórcio de bactérias é obtido de fontes naturais como: lodo anaeróbico da estação de tratamento de esgoto, estrume de galinha, adubo de vaca, lodo de rio, estação de tratamento de águas residuais, entre outros (ARGUN; KARGI, 2009; SONG et al., 2012; TANG et al., 2008). Os consórcios de bactérias se mostram mais interessantes para produção de hidrogênio por fermentação por serem facilmente obtidos de fontes naturais, pela variedade de substratos nos quais atuam e pela maior resistência à contaminação (SHI et al., 2009; WONG; WU; JUAN, 2014).

Além dos produtores de hidrogênio, os consórcios microbianos também possuem microrganismos consumidores de hidrogênio. Os microrganismos consumidores de hidrogênio mais conhecidos são os metanogênicos. Eles são anaeróbios, por exemplo, o *Methanobacterium spp.* e o *Methanococcus spp.* Além dos metanogênicos, existem outras bactérias que consomem o hidrogênio, utilizando-o como doador de elétrons e precursor de outros compostos metabólicos, elas podem ser anaeróbias obrigatórias ou facultativas (WONG; WU; JUAN, 2014)

O processo fermentativo mediado por consórcio de bactérias converte moléculas complexas em moléculas simples, como ácidos graxos, açúcares simples, amino ácidos entre outros. Esse processo pode ser dividido em quatro etapas, como ilustrado na Figura 2. A primeira etapa é a hidrólise, em que bactérias hidrolíticas, pela liberação de enzimas

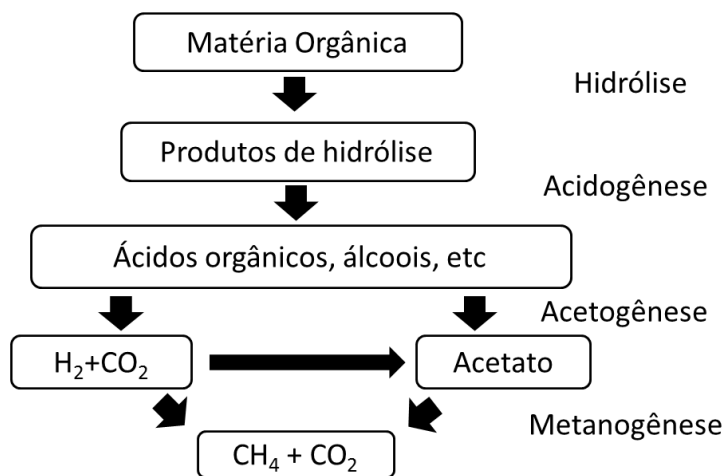
extracelulares, promovem a degradação de compostos complexos em compostos mais simples.

A segunda etapa é a acidogênese, na qual os compostos gerados na primeira etapa continuam sendo transformados em compostos mais simples como, ácidos orgânicos voláteis e álcoois.

Na terceira etapa, a acetogênese, ocorre a oxidação de produtos formados na segunda etapa por bactérias acidogênicas, produzindo hidrogênio, ácido acético e dióxido de carbono.

Na quarta e última etapa, a metanogênese, os produtos da terceira etapa são consumidos para a formação de metano e dióxido de carbono. As arqueas, organismos procariontes, da fase metanogênica podem ser divididas em metanogênicas acetoclásticas e metanogênicas hidrogenotróficas. As arqueas metanogênicas acetoclásticas são os microrganismos que produzem metano a partir do acetato, já as arqueas metanogênicas hidrogenotróficas consomem hidrogênio e dióxido de carbono para a produção de metano. Além dos organismos metanogênicos, o hidrogênio pode ser consumido por bactérias homoacetogênicas produtoras de ácido acético ou por bactérias redutoras de nitrato (BRN) e as bactérias redutoras de sulfato (BRS), caso o meio fermentativo contenha sulfato e nitrato (FREIRE et al., 2017; SÁ; CAMMAROTA; FERREIRA-LEITÃO, 2014).

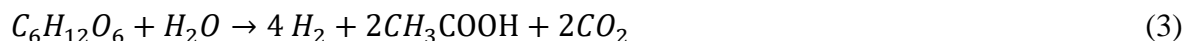
Figura 2 - Etapas da fermentação anaeróbia realizadas pelo consórcio de bactérias.



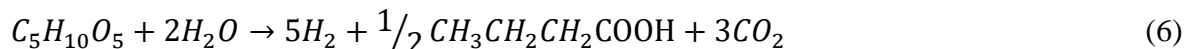
Fonte: O autor, 2019

A produção biológica de hidrogênio por via fermentativa pode ocorrer a partir de vários substratos. As Equações 3 a 9 apresentam as equações teóricas de produção de hidrogênio para os substratos mais reportados pela literatura, que são a glicose ($C_6H_{12}O_6$), a xilose ($C_5H_{10}O_5$) e o glicerol ($C_3H_8O_3$). As Equações ímpares (3, 5 e 7) apresentam as equações teóricas com a formação de ácido acético (CH_3COOH), enquanto as Equações pares (4, 6 e 8), as equações teóricas com a formação de ácido butírico ($CH_3CH_2CH_2COOH$). Quando a razão de ácido acético para ácido butírico é maior que um significa que a rota preferencial foi a de ácido acético. No caso contrário, a rota preferencial foi a do ácido butírico (MAINTINGUER et al., 2011; RODRIGUES et al., 2016; WONG; WU; JUAN, 2014; ZIARA et al., 2019).

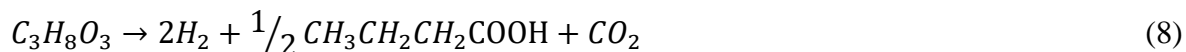
Glicose:



Xilose:



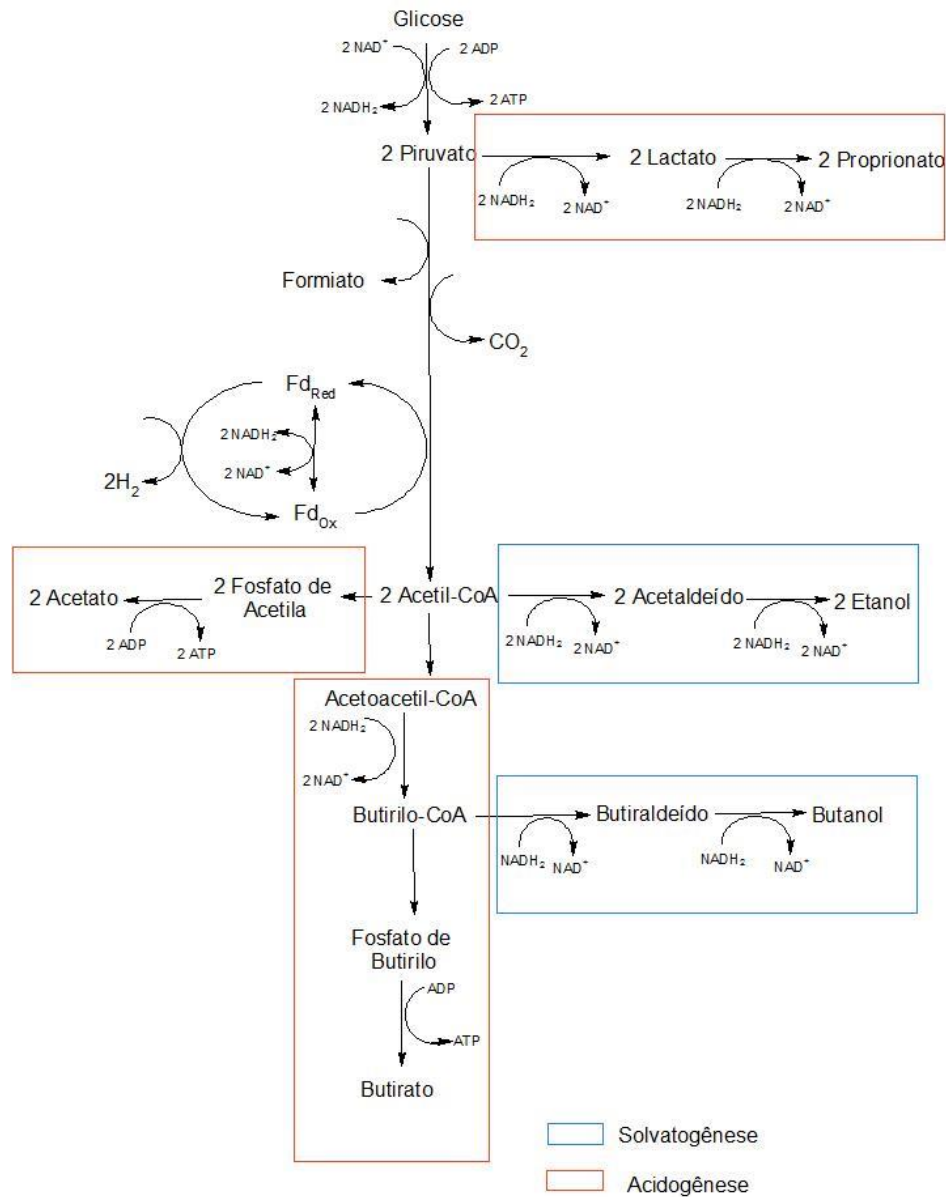
Glicerol:



A rota metabólica da glicose (Figura 3) apresenta alguns dos subprodutos que podem ser produzidos ao longo do processo fermentativo. Durante a fase de crescimento exponencial do microrganismo (*Clostridium spp.*), a rota da acidogênese prevalece. Essa rota pode produzir ácido propiônico, ácido acético e ácido butírico. Na fase estacionária, a rota solvatogênese é a que prevalece, produzindo etanol e butanol. Esses álcoois são considerados inibidores da produção de hidrogênio por serem tóxicos às bactérias produtoras de

hidrogênio. O ácido propiônico da rota acidogênese é considerado um inibidor por seguir uma rota metabólica que não produz hidrogênio. O ácido acético e o ácido butírico estão associados à produção de hidrogênio, porém o seu excesso pode causar efeitos de inibição da produção de hidrogênio. O acúmulo desses ácidos acarreta um pH mais ácido e, por consequência, inibe a fermentação. Além disso, o acúmulo destes ácidos pode promover o deslocamento do equilíbrio de qual reação (Figura 3) e produzir mais ácido lático e ácido propiônico. Por outro lado, o excesso de ácido lático e de ácido propiônico favorece a produção de hidrogênio devido ao deslocamento do equilíbrio (Figura 3) (CHONG et al., 2009; MATHEWS; WANG, 2009; SILVA et al., 2018; WONG; WU; JUAN, 2014).

Figura 3 - Rota metabólica da glicose



Fonte: WONG; WU; JUAN, 2014

As hidrogenases são enzimas fundamentais no metabolismo de bactérias anaeróbias. Elas atuam como catalisador da reação apresentada na Equação (9), reduzindo prótons a hidrogênio. Esse processo atua como dissipador do excesso de elétrons produzidos dentro da célula para garantir a neutralidade elétrica no seu interior, e com isso mantendo o fluxo de

fornecimento de adenosina trifosfato (ATP) gerado pela quebra do substrato. As hidrogenases são classificadas pelo complexo metálico presente em seus sítios ativos. As duas principais enzimas da fermentação anaeróbica são as que contém ferro, [FeFe] – hidrogenase, e as que contém níquel, [NiFe] – hidrogenase. A temperatura e o pH do meio influenciam na eficiência destas enzimas. A faixa de pH ideal relatado pela literatura é 6,0 a 6,5 (CHONG et al., 2009; ELBESHBISHY et al., 2017; HALLENBECK; BENEMANN, 2002; LEE; SHOW; SU, 2011; TANG et al., 2008; WÜNSCHIERS; LINDBLAD, 2002).



1.1.4 Pré-tratamento do lodo anaeróbico para produção de hidrogênio por fermentação anaeróbia

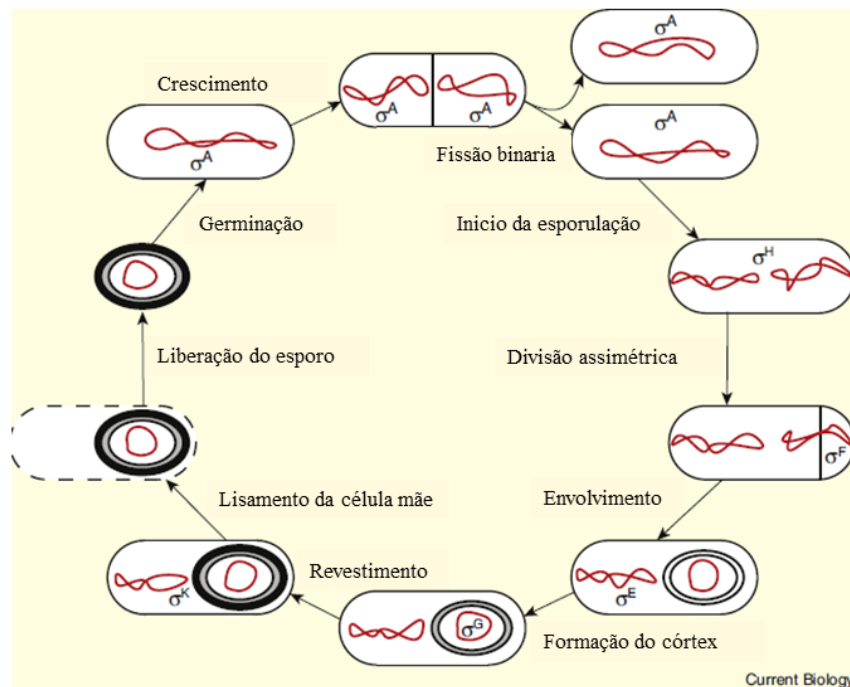
Para a viabilização da produção de hidrogênio por via fermentativa utilizando um consórcio microbiano, tal como o existente no lodo de estação de tratamento de esgoto, é necessário um pré-tratamento do lodo anaeróbico com o objetivo de promover uma inibição das arqueas metanogênicas, que consomem o hidrogênio produzido, para propiciar o acúmulo desse vetor energético.

Os pré-tratamentos mais eficientes do inóculo se baseiam principalmente na capacidade de esporulação do *Clostridium spp.* e no fato da maioria das arqueias metanogênicas não possuírem a habilidade de esporular (BUNDHOO; MOHEE; HASSAN, 2015). *Clostridium spp.* é um gênero bacteriano anaeróbico que tem a capacidade de esporular quando o ambiente está em condições não favoráveis (BAGHCHEHSARAEE et al., 2010).

A esporulação ocorre de acordo com o mecanismo ilustrado na Figura 4. Ela inicia em resposta às condições de um meio ambiente hostil. Primeiro a célula duplica seu cromossomo (vermelho), depois eles se separam e alocam-se nos polos da célula. Após este

processo, ocorre uma divisão assimétrica e dois compartimentos delimitados por membranas são formados. A célula grande formada é a célula mãe e a pequena é o esporo em formação. O envolvimento da célula-mãe na célula pequena resulta na liberação do esporo em formação livre da célula-mãe. Em seguida, é sintetizado o córtex (cinza) entre as duas membranas que circundam o esporo em formação. Após isso, ocorre a formação de um revestimento (preto) de estrutura complexa em torno de toda a superfície frontal. Quando ocorre a lise da célula mãe, o esporo é liberado ao meio ambiente. A célula pode permanecer no estado de esporo inativo por um longo período, mas ele logo irá germinar na presença de um meio favorável ao seu crescimento (DE HOON; EICHENBERGER; VITKUP, 2010).

Figura 4 - Processo de formação do esporo.



Fonte: Adaptado de HOON; EICHENBERGER; VITKUP, 2010

Os pré-tratamentos do lodo anaeróbico podem ser separados em físicos e químicos. Dentre os pré-tratamentos físicos destacam-se o térmico, de ultrassonificação, de irradiação ultravioleta, de aeração e de congelamento e descongelamento. Os pré-tratamentos químicos são os pré-tratamentos ácido, alcalino, de inibição química e de ativação química.

1.1.4.1 Pré-tratamento Físico

Os pré-tratamentos de ultrassonificação, de irradiação ultravioleta, de aeração e de congelamento e de descongelamento são pré-tratamentos que apresentam um rendimento de hidrogênio baixo, portanto, não são tão eficientes. Isso ocorre devido ao fato de eles não serem tão específicos, podendo inibir ou eliminar os microrganismos produtores de hidrogênio. O pré-tratamento térmico se destaca como um dos pré-tratamentos mais eficientes pelos rendimentos obtidos de hidrogênio (BUNDHOO; MOHEE; HASSAN, 2015).

A ultrassonificação tem o intuito de destruir a parede celular dos microrganismos não produtores de hidrogênio e diminuir as partículas de lodo, melhorando a interação entre os microrganismos produtores de hidrogênio e o substrato. Esse tipo de pré-tratamento funciona com a emissão de ondas eletromagnéticas. Ela se baseia no efeito de cavitação acústica, em que quando o meio é submetido a essas ondas eletromagnéticas, elas liberam energia acústica, formando bolhas de gás e vapor, que são liberadas. Além dos efeitos térmicos, também há a formação de forças de cisalhamento e de radicais $-OH$, $-HO_2$ e $-H$. Este conjunto de ações pode resultar na ruptura da parede celular dos microrganismos e desintegrar o flóculo de lodo (BUNDHOO; MOHEE; HASSAN, 2015; HAWKES et al., 2002). Wang e colaboradores (2010) conseguiram produzir $104,4 \text{ mLH}_2 \text{g}^{-1}$ Sólidos Totais (ST) utilizando como resíduo bagaço de maçã e inóculo proveniente da estação de tratamento de esgoto de Xi'na Chuangye em 7h de fermentação (WANG et al., 2010). Tang e colaboradores (2008) obtiveram $319 \text{ mLH}_2 \text{g}^{-1}$ Demanda Química de Oxigênio (DQO) utilizando como inóculo um lodo proveniente de uma estação de tratamento e como substrato águas residuais de abate de gado em 30h de fermentação.

A irradiação ultravioleta é utilizada como pré-tratamento físico com o intuito de danificar o código genético das bactérias consumidoras de hidrogênio. Essa técnica apresenta o desafio de assegurar que o dano causado seja permanente, que a esporulação das bactérias produtoras de hidrogênio seja suficiente para garantir a sua integridade e que seja realizada

uma irradiação homogênea e eficiente através de um lodo mais opaco (WONG; WU; JUAN, 2014; XU et al., 2018). Wang e colaboradores(2010) pré-trataram o inóculo expondo-o a uma lâmpada de 25 W em um intervalo de 5, 10, 15 e 30 minutos. O melhor resultado obtido foi após o período de 15 minutos de exposição à irradiação ultravioleta em 7h de fermentação, que produziu 106,9 mL H₂g⁻¹ST. Nesse estudo, o resíduo foi o bagaço de maçã e o inóculo foi fornecido pela estação de tratamento de esgoto de Xi'anChuangye. Os autores concluíram que as bactérias metanogênicas foram eliminadas, pois não ocorreu produção de metano. Zhang e colaboradores (2014) estudaram dois meios fermentativos distintos, lodo anaeróbico granular e lodo de sedimento fluvial. Para o pré-tratamento, os autores utilizaram uma lâmpada de 25 W expondo o lodo à radiação ultravioleta por 15min. O lodo de sedimento fluvial produziu 353mL H₂L⁻¹ de meio fermentativo e o lodo granular pré-tratado produziu 207,3 mL H₂L⁻¹ de meio fermentativo. A produção de hidrogênio foi menor na fermentação com o lodo sem pré-tratamento. De acordo com esses resultados, os autores concluíram que quanto mais translúcido o lodo, melhor serão os resultados para o pré-tratamento por irradiação ultravioleta.

A aeração tem como objetivo inibir ou eliminar as arqueias metanogênicas, que em sua maioria são anaeróbicas, e selecionar as bactérias produtoras de hidrogênio facultativas, através da injeção de ar no meio fermentativo. No entanto, a maioria das bactérias produtoras de hidrogênio são anaeróbicas estritas (BUNDHOO; MOHEE; HASSAN, 2015; WONG; WU; JUAN, 2014). Sheng Chang e colaboradores (2011) obtiveram uma produção de 0,7molH₂mol de glicose⁻¹após 42 h de fermentação utilizando o pré-tratamento de aeração por 24h antes da fermentação em um lodo anaeróbico fornecido de uma estação de tratamento de águas residuais de Harbin na China. Os autores concluíram que este método é promissor para o enriquecimento da *Etanolgenens spp.*, por conta da alta produção de etanol encontrada quando comparado com os outros pré-tratamentos avaliados por eles (ácido, térmico, alcalino, adição de clorofórmio e adição de 2-bromoetanossulfonato de sódio). Jianlong Wang e Wei Wan (2008a) conseguiram produzir 0,86 mol H₂ mol de glicose⁻¹ após 36 h de fermentação usando como inóculo o lodo anaeróbico da estação de tratamento de esgoto de Beijing Gaobeidian na China. O pré-tratamento de aeração também foi realizado com a injeção de ar por 24 h. Nesse estudo, o pré-tratamento de aeração também foi o que mais produziu etanol em comparação com os outros pré-tratamentos estudados (ácido, térmico,

alcalino), seguido pelo pré-tratamento alcalino: $2,6 \text{ mmolL}^{-1}$ e $2,5 \text{ mmolL}^{-1}$ de etanol, respectivamente.

O pré-tratamento de congelamento e descongelamento do lodo visa lisar as bactérias consumidoras de hidrogênio. No entanto, pelos resultados apresentados na literatura, observa-se que esse método não consegue ser específico para só lisar os microrganismos consumidores de hidrogênio, lisando também as bactérias produtoras de hidrogênio (BUNDHOO; MOHEE; HASSAN, 2015; WONG; WU; JUAN, 2014). Hongyan Liu e colaboradores (2009) estudaram o pré-tratamento de congelamento e descongelamento para o processo utilizando lodo anaeróbico coletado da zona interdital (zona entre marés) de uma praia de banho na área de Tianjin. O lodo foi congelado a -25°C por 24 h e descongelado durante 5h há temperatura ambiente. Neste estudo, a produção de hidrogênio por este pré-tratamento foi menor que a produção do lodo não tratado. Além disso, eles identificaram que as bactérias dos gêneros *Clostridium spp.* e *Lactobacillus spp.* eram predominantes na comunidade microbiana após o pré-tratamento. Parviz Mohammadi e colaboradores (2011) utilizaram o pré-tratamento de congelamento e descongelamento em um lodo anaeróbico obtido de uma estação de tratamento de esgoto. O pré-tratamento constituiu em congelar o lodo a -10°C por 24 h e depois descongelá-lo em banho-maria a 30°C até que o lodo alcançasse a temperatura ambiente. Os autores obtiveram após 72 h de fermentação $0,19 \text{ mmolH}_2\text{g}^{-1} \text{ DQO}$ de efluente da indústria do óleo de palma (POME). Isso equivale a uma produção de hidrogênio 58% maior em relação ao processo realizado sem o pré-tratamento do lodo (MOHAMMADI et al., 2011).

O pré-tratamento térmico é um dos pré-tratamentos físicos mais eficientes e mais utilizados na literatura. Ele se baseia na habilidade de esporulação do *Clostridium spp.* em ambientes não favoráveis ao seu crescimento. O desafio do pré-tratamento térmico é determinar a combinação ótima do tempo de pré-tratamento e da temperatura. A literatura indica que quanto maior a temperatura e menor o tempo de pré-tratamento, melhores são os rendimentos de hidrogênio; enquanto que quanto menor a temperatura e maior o tempo de pré-tratamento, menores são os rendimentos de hidrogênio (BUNDHOO; MOHEE; HASSAN, 2015; WONG; WU; JUAN, 2014).

Na Tabela 5 estão resumidos alguns trabalhos que utilizam o pré-tratamento térmico no processo de produção de hidrogênio. Comparando os estudos Wang e Wan (2008b) com

Liu e colaboradores (2009), verifica-se que o melhor pré-tratamento térmico é o realizado em um intervalo de tempo menor. Liu(2009) também concluiu que, após o pré-tratamento térmico, as bactérias dos gêneros *Clostridium spp.* e o *Enterococcus spp.* eram os microrganismos predominantes no inóculo(LIU et al., 2009).

Tabela 5 - Estudos de produção biológica de hidrogênio por fermentação anaeróbia utilizando pré-tratamento térmico.

Lodo Anaeróbico (origem)	Substrato	Tempo de Fermentação	Pré-tratamento	Rendimento de H ₂	Ref.
Estação de Tratamento de Esgoto (ETE)	Sacarose	72h	100°C por 60 min	4,62 mol H ₂ /mol substrato	(DE SÁ et al., 2013)
Estação de Tratamento de Águas Residuais	Glicose	42h	95°C por 30 min	0,9mol H ₂ /mol substrato	(CHANG; LI; LIU, 2011)
ETE	Glicose	36h	Ferveu a 100°C por 15 min	1,78mol H ₂ /mol substrato	(WANG; WAN, 2008b)
Zona interdital	Glicose	36h	Ferveu a 100°C por 30 min	0,4mol H ₂ /mol substrato	LIU et al., 2009
ETE	POME	48h	100°C por 60 min	0,41 mmol H ₂ /g DQO	MOHAMMADI et al., 2011

Fonte: O autor, 2019

1.1.4.2 Pré-tratamento Químico

Os pré-tratamentos químicos podem ser classificados como pré-tratamento de ativação química, pré-tratamento de inibição química e pré-tratamento de pH.

No pré-tratamento de ativação química, substratos de alta carga orgânica são adicionados ao inóculo com o intuito de inibir o crescimento das bactérias metanogênicas. Uma das dificuldades desse procedimento é identificar todos os microrganismos presentes no consórcio microbiano, pois, ao contrário do desejado, a adição de substratos pode favorecer o crescimento de microrganismos consumidores de hidrogênio (BUNDHOO; MOHEE; HASSAN, 2015; WONG; WU; JUAN, 2014). Sompong O-Thong e colaboradores (2009) estudaram o pré-tratamento de ativação química misturando 50 mL do lodo com 500 mL de uma solução de 50gL^{-1} de sacarose, para aumentar a carga do lodo, e $83,25\text{ gL}^{-1}$ de DQO. Em seguida, o meio foi acidificado e agitado (200 rpm) por 2 dias. O sobrenadante foi retirado após a sedimentação do lodo causada pela gravidade. O lodo utilizado no experimento foi fornecido de um reator de produção de biogás de uma usina de óleo de palma. Após 48 h de fermentação, ocorreu acúmulo de $1,57\text{ mol H}_2\text{mol}^{-1}$ de hexose e o microrganismo predominante identificado foi a bactéria anaeróbia *Thermoanaerobacterium* (O-THONG; PRASERTSAN; BIRKELAND, 2009).

O pré-tratamento de inibição química consiste em adicionar produtos químicos, como, por exemplo, o 2-bromoetanossulfonato (BES), ou o ácido 2-bromoetanossulfonato (BESA), ou clorofórmio. Esses produtos químicos agem como inibidores específicos da fase metanogênica. O BES e o BESA inibem a ligação do grupo metila com a coenzima M, impedindo a redução do metil a metano pela enzima. O clorofórmio age de maneira análoga ao BES e ao BESA. No entanto, a literatura relata que esse pré-tratamento também é letal aos microrganismos produtores de hidrogênio, altamente tóxico e prejudicial para os seres humanos e o meio ambiente (BUNDHOO; MOHEE; HASSAN, 2015; WONG; WU; JUAN, 2014).

Chang e colaboradores (2011) obtiveram uma produção de $0,33\text{molH}_2\text{mol}^{-1}$ de glicose após 42 h de fermentação adicionando o BES em um lodo anaeróbico fornecido de uma estação de tratamento de águas residuais, não se destacando muito da produção com o lodo sem pré-tratamento. O BES foi utilizado no lodo a uma concentração de 10 mmolL^{-1} por 24 h antes do processo de fermentação.

O pré-tratamento de pH é dividido em dois tipos: pré-tratamento ácido e pré-tratamento alcalino (Tabela 6). Esse tratamento consiste em levar o pH do lodo de fermentação a um valor extremo por um determinado intervalo de tempo e, com isso, garantir a esporulação dos microrganismos produtores de hidrogênio e a eliminação e ou inibição dos microrganismos consumidores de hidrogênio. A literatura demonstra que o pré-tratamento ácido é mais eficiente que o alcalino, por conta dos rendimentos de hidrogênio obtidos, indicando que o pré-tratamento ácido é mais eficiente em eliminar os microrganismos consumidores de hidrogênio (BUNDHOO; MOHEE; HASSAN, 2015; WONG; WU; JUAN, 2014).

Tabela 6 - Estudos de produção biológica de hidrogênio por fermentação anaeróbia utilizando pré-tratamento de pH.

	Substrato	Tempo de Fermentação	Pré-tratamento	Rendimento de H ₂	Ref.
ETE	Glicerol	24h	pH 2, 60 min	2,44mol H ₂ /mol substrato	FABER; FERREIRA-LEITÃO, 2016
Estação de Tratamento de Águas Residuais	Glicose	42h	pH 3, 24h	1,51 mol H ₂ /mol substrato	CHANG; LI; LIU, 2011
ETE	Glicose	36h	pH 10, 24h	1,09 mol H ₂ mol ⁻¹ substrato	WANG; WAN, 2008a
Zona interdital	Glicose	36h	pH 3 10 min	0,9 mol H ₂ mol ⁻¹ substrato	(LIU et al., 2009)
ETE	POME	48h	pH12 24h	0,37 mmol H ₂ g ⁻¹ DQO	(MOHAMMADI et al., 2011)

Fonte: O autor, 2019

1.1.5 Fatores que influenciam a produção de hidrogênio por via fermentativa

A produção de hidrogênio depende de outros fatores, além da seleção da população microbiana do inóculo. Ela também é influenciada pela temperatura de fermentação, pelo pH inicial e ao longo da fermentação, além do tipo e quantidade de substrato utilizado (DUMAN et al., 2018; LEE et al., 2009; ŁUKAJTIS et al., 2018; WONG; WU; JUAN, 2014).

1.1.5.1 Influência da temperatura na fermentação

A temperatura de fermentação é um fator importante para a produção de hidrogênio, pois influencia o crescimento microbiano e a transformação do substrato em hidrogênio. Como já apresentado no tópico 1.3.1, existem microrganismos produtores de hidrogênio mesófilos e termófilos. Os microrganismos mesófilos sobrevivem a temperaturas entre 25°C a 45°C, enquanto os termófilos a temperaturas de 45°C a 65°C. Assim, a temperatura ideal para a fermentação é dependente dos microrganismos presentes no consórcio microbiano. A faixa de temperatura mais estudada pela literatura é entre 33°C a 41°C, porém nos casos em que a maioria dos produtores de hidrogênio são termófilos, o maior rendimento é obtido em uma temperatura mais elevada. Apesar de muitos microrganismos produtores de hidrogênio serem mesófilos, a literatura reporta que a temperatura ótima das enzimas responsáveis pela produção de hidrogênio, as hidrogenases, está na faixa de 50 a 70°C. Além disso, também é relatado que quanto maior a temperatura do meio, menor é a solubilidade dos gases. Porém, o aumento da temperatura do processo fermentativo acarreta um maior custo de operação para a planta de produção (DUMAN et al., 2018; HAWKES et al., 2002; ŁUKAJTIS et al., 2018; WONG; WU; JUAN, 2014).

1.1.5.2 Influência do pH na fermentação

O pH da fermentação é importante para aumentar a produção de hidrogênio. Ele influencia na carga elétrica da membrana do microrganismo, que, por consequência, altera a absorção de nutrientes. O pH inicial da fermentação ótimo a produção de hidrogênio está na faixa de 5,0 a 7,0. Esta faixa varia dependendo da população microbiana contida no inóculo estudado. Outro fator importante sobre o pH é a sua manutenção ao longo do processo fermentativo. O pH do meio fermentativo tende a diminuir devido ao acúmulo de ácidos orgânicos produzidos. Isto acarreta em um meio não favorável para a produção de hidrogênio, verificando-se uma menor taxa de produção de hidrogênio em pH abaixo de 4,0 (LEE et al., 2009; ŁUKAJTIS et al., 2018; WONG; WU; JUAN, 2014). Por isso, é importante a manutenção do pH ótimo ao longo da fermentação, principalmente no caso de processos contínuos.

1.1.5.3 Nutrientes

A concentração e o tipo de substrato e nutrientes influenciam no crescimento bacteriano e na rota metabólica, aumentando ou diminuindo a produção de hidrogênio. O crescimento microbiano precisa do fornecimento de macro- e micronutrientes (ARGUN et al., 2008; WONG; WU; JUAN, 2014).

1.1.5.3.1 Macronutrientes

Os macronutrientes essenciais para o crescimento microbiano são as fontes de Carbono (C), de Nitrogênio (N) e de Fósforo (F). As fontes de carbono são fornecidas pelo substrato utilizado na fermentação. O nitrogênio normalmente está contido na matriz do lodo anaeróbico ou do substrato utilizado e está presente nas proteínas, nitrito, nitrato e amônio. O fósforo é disponibilizado pela molécula de fosfato na maioria dos casos. A fonte de fósforo é semelhante à fonte de nitrogênio. No entanto, para intensificar a produção de hidrogênio, em alguns casos, é necessária a adição externa de nitrogênio e fósforo. Isso porque eles podem melhorar a síntese enzimática, o crescimento e outras atividades microbianas. Argun e colaboradores (2009) concluíram que são necessárias baixas concentrações de fósforo quando se tem pouco nitrogênio por causa da estequiometria do metabolismo anaeróbico. No caso contrário, a alta concentração de nitrogênio com pouco fósforo acarreta na inibição da produção de hidrogênio, o que deve ocorrer devido a uma alteração na rota metabólica. Com isso, ele conclui que a melhor relação entre estes macronutrientes(C:N:F) é de 100:0,5:0,1 (ARGUN et al., 2008; ELBESHBISHY et al., 2017; PRABAKAR et al., 2018; WONG; WU; JUAN, 2014).

1.1.5.3.2 Micronutrientes

Os micronutrientes são íons metálicos necessários para o desenvolvimento do microrganismo e a produção de hidrogênio. Os micronutrientes são necessários em uma quantidade menor que os macronutrientes. Os micronutrientes considerados para a fermentação anaeróbica são Níquel (Ni), Ferro (Fe), Zinco (Zn), Cobre (Cu), Cromo (Cr), Cálcio (Ca), Magnésio (Mg) e Sódio (Na)(WONG; WU; JUAN, 2014).

O níquel e o ferro são importantes para a formação das hidrogenases, por serem os componentes metálicos presentes em seu sítio ativo. O ferro influencia também na aceleração de transferência de elétrons entre a ferredoxina e a hidrogenase e na diminuição do oxigênio disponível no meio fermentativo(ELBESHBISHY et al., 2017; ENGLIMAN et al., 2017;

WONG; WU; JUAN, 2014). Wang e Wan(2007) avaliaram a influência do ferro e do níquel na produção de hidrogênio. Eles observaram que a suplementação de ferro, além de aumentar a produção de hidrogênio, diminuiu pela metade o intervalo de tempo sem produzir hidrogênio. A maior produção de hidrogênio foi de 311,2 mL H₂g⁻¹ de glicose com 350mgL⁻¹ de ferro. Concentrações maiores que 350mgL⁻¹ de ferro acarretaram um efeito inibitório do ferro na produção de hidrogênio. Wang e Wan (2008a) Os autores avaliaram diferentes concentrações de níquel no meio fermentativo e o melhor resultado foi obtido com a concentração de 0,1mgL⁻¹ de Ni, produzindo 288,6 mL de H₂. Concentrações de níquel maiores que 0,1mgL⁻¹ resultaram em uma produção de hidrogênio menor, demonstrando um efeito de inibição pelo excesso de níquel no meio fermentativo.

O zinco, o cobre e o cromo são importantes para o crescimento microbiano e para a formação de enzimas que auxiliam nos processos do meio fermentativo. Além disso, esses cátions apresentam um efeito de inibição na produção de metano. No entanto, em concentrações altas, eles também inibem a produção de hidrogênio. Chiu-Yue e Shi-Heu (2007) reportaram que uma concentração de 4,5mgL⁻¹ de zinco, 7,8 mgL⁻¹ de cobre e 60 mgL⁻¹ de cromo diminuem em 50% a produção de hidrogênio (ALTAŞ, 2009; DINESH; CHAUHAN; CHAKMA, 2018; LIN; SHEI, 2007; WONG; WU; JUAN, 2014).

O sódio, o cálcio e o magnésio também são necessários para o crescimento da população microbiana. Porém, o excesso destes metais acarreta na inibição da produção de hidrogênio e ou morte bacteriana (ELBESHISHY et al., 2017; WONG; WU; JUAN, 2014; YANG; WANG, 2018).

O sódio possibilita a construção de bombas enzimáticas (Na-K-ATP). Essas bombas enzimáticas transferem nutrientes e substratos para o interior da célula, aumentando a eficiência do microrganismo. Todavia, o excesso de sódio pode acarretar em um aumento de pressão osmótica no meio fermentativo, induzindo a inativação ou morte do microrganismo (ELBESHISHY et al., 2017; YANG; WANG, 2018). Hao e colaboradores (2006) observaram que os melhores resultados de produção de hidrogênio e consumo do substrato (sacarose) ocorreram utilizando o sódio na faixa de concentração de 1 gL⁻¹ L a 2gL⁻¹. O consumo da sacarose foi 96% maior com 1 gL⁻¹ L a 2gL⁻¹ do que no inóculo sem adição de sódio. As concentrações de sódio maiores que 2 gL⁻¹ levaram a um consumo menor de substrato e a uma menor produção de hidrogênio (XIAOLONG et al., 2006). Myoung-Joo e

colaboradores(LEE et al., 2012a)obtiveram uma produção máxima de hidrogênio com 1 gL^{-1} de sódio. Em concentrações mais altas do que 2 gL^{-1} , a produção de hidrogênio diminuiu. Os autores sugerem que a concentração ótima de sódio seria de $0,83 \text{ gL}^{-1}$ (LEE et al., 2012b).

O cálcio é necessário como co-fator da alfa-amilase e de algumas proteases. Ele também possui um papel importante na estrutura de proteínas celulares e no material polimérico extracelular (ELBESHBISHY et al., 2017; YANG; WANG, 2018). Yu e colaboradores (2001)verificaram que a concentração ótima de cálcio está na faixa de 150 a 300 mgL^{-1} para a produção de hidrogênio.

O magnésio é um constituinte da maioria das membranas celulares dos microrganismos e possui um papel importante como cofator de reações enzimáticas na glicólise (DINESH; CHAUHAN; CHAKMA, 2018; ELBESHBISHY et al., 2017; YANG; WANG, 2018). Zhano e colaboradores (2017)estudaram o efeito da concentração de magnésio em uma cultura pura de *Etanoligenensharbinense*, em uma faixa de 0 a 1 gL^{-1} de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. A maior produção de hidrogênio foi observada no processo utilizando 600 mgL^{-1} de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Concentrações maiores resultaram em uma menor produção de hidrogênio. O consumo de glicose aumentou de 50% para 99% para concentrações de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ acima de 100 mgL^{-1} . Song e colaboradores (2012)estudaram o efeito da concentração de magnésio na produção de hidrogênio usando uma cultura pura de *Clostridium beijerinckii*, empregando de 0 a 1 gL^{-1} de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Os autores observaram que a produção de hidrogênio diminuiu no intervalo de 0,1 a 1 gL^{-1} de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, e a produção máxima de hidrogênio foi obtida com $0,1 \text{ gL}^{-1}$ $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Srikanth e Mohan (2012) avaliaram a influência do magnésio em um consórcio de bactérias provenientes de um lodo anaeróbico de uma planta de estação de tratamento. A concentração de magnésio estudada foi na faixa de 0 a 2000 mgL^{-1} de MgCl_2 . A maior produção de hidrogênio foi alcançada empregando 600 mgL^{-1} de MgCl_2 . A produção de hidrogênio diminuiu com o aumento da concentração de MgCl_2 acima de 600 mgL^{-1} . Os autores também observaram que o consumo de substrato aumentou com o aumento de MgCl_2 até a concentração de 600 mgL^{-1} e diminuiu em concentrações maiores do que esse valor. Desta forma, os autores concluíram que o magnésio influencia o consumo do substrato.

Os micronutrientes são fundamentais para o crescimento microbiano e a sua suplementação também é necessária, principalmente no caso de culturas puras. No entanto,

culturas mistas provenientes de estações de tratamento e resíduos industriais ou agroindustriais utilizados como matéria-prima podem conter alguns nutrientes em seu meio. Com isso, a suplementação com estes micronutrientes pode interferir como inibidor no processo fermentativo de produção de hidrogênio (MATHEWS; WANG, 2009; WONG; WU; JUAN, 2014). Faber e Ferreira-Leitão (2016) investigaram a necessidade da adição de nutrientes (KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , NH_4Cl , FeCl_3 , ZnCl_2 , $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, AlCl_3 , $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) no meio fermentativo de um lodo anaeróbico fornecido por uma estação de tratamento de esgoto no Rio de Janeiro, utilizando como substratos glicerol P.A. e glicerina bruta proveniente da produção de biodiesel. Na fermentação conduzida com o glicerol P.A. foi obtido mais hidrogênio com a adição de nutrientes ($1,45 \pm 0,07$ mol de H_2 mol⁻¹ de glicerina), enquanto que na fermentação utilizando a glicerina bruta, o melhor resultado foi obtido sem a adição de nutrientes ($1,81 \pm 0,05$ mol de H_2 mol⁻¹ de glicerina) (FABER; FERREIRA-LEITÃO, 2016).

1.2 Utilização de resíduos agroindustriais para produção de Hidrogênio por fermentação anaeróbia

O aumento da produção de alimentos gera por consequência um aumento da produção de seus resíduos que causam impactos não positivos no ecossistema. Devido às preocupações com o meio ambiente e à necessidade de garantir recursos para as gerações futuras o tratamento destes rejeitos industriais se torna mais importante.

A ONU define resíduos agroindustriais como derivados de várias operações agrícolas, como: esterco e outros resíduos, poluentes provenientes de matadouros, resíduos de colheitas, sedimentos retirados do solo, contaminação por escoamento de fertilizantes e pesticidas em águas, solos ou ar entre outros (DEPARTMENT FOR ECONOMIC AND SOCIAL INFORMATION AND POLICY ANALYSES, 1997). Logo, os resíduos agroindustriais podem ser líquidos ou sólidos. Resíduos agroindustriais sólidos podem ser os provenientes de colheitas, como resíduos lignocelulósicos, por exemplo: palhas e bagaço de cana-de-açúcar, palha de trigo, cascas de sementes oleaginosas, tortas vegetais oriundas da extração de óleos de sementes oleaginosas, entre outros. Os resíduos líquidos podem ser efluentes de matadouros, resíduos da indústria de laticínios, por exemplo, além dos resíduos líquidos da produção de biocombustíveis, como a glicerina bruta da indústria de biodiesel.

O reaproveitamento desses resíduos para a produção de energia é interessante, pela economia energética para com estes processos industriais e para com o meio ambiente diminuindo os danos ao ecossistema, além de diminuir os custos tanto no processo, quanto no tratamento dos efluentes e resíduos sólidos.

1.2.1 Resíduos Líquidos

Os resíduos líquidos ou efluentes mais abordados na literatura são provenientes da agroindústria e da indústria alimentícia. Alguns deles são: as águas residuais da indústria de

laticínios, a vinhaça da produção de etanol, o glicerol da produção de biodiesel, o efluente da indústria de papel e pasta de celulose, as águas residuais do abate de gado, as águas residuais da indústria farmacêutica, entre outros. A maioria desses resíduos é rica em carboidratos e lipídios, o que os torna resíduos complexos para os sistemas de tratamento convencional. A degradação de gordura por esses tratamentos de resíduos convencionais é lenta, o que acarreta problemas nos biorreatores. O acúmulo dessas gorduras e óleos gera o crescimento microbiano de organismos não desejáveis, o que causa problemas com o sistema de bombeamento e de aeração dos biorreatores. Isso ocorre devido à formação de espumas estáveis nos tanques de aeração, que por consequência criam bloqueios, impedindo a transferência de gases necessários para a degradação dessa matéria orgânica, acarretando complicações para a floculação e a sedimentação. Com isso, ocorre a geração de um produto final tratado sem a qualidade desejada (FERREIRA-LEITÃO et al., 2017; JUNG; CAMMAROTA; FREIRE, 2002; PRABAKAR et al., 2018). Por conta desses fatores, alguns destes resíduos líquidos necessitam de um pré-tratamento, a fim de diminuir a cadeia carbônica de alguns carboidratos e lipídios, deixando-os acessíveis aos microrganismos produtores de hidrogênio.

A Tabela 7 apresenta alguns destes resíduos líquidos aproveitados para a produção de hidrogênio. Lakshmidevi e Muthukumar(2010) realizaram um pré-tratamento enzimático no efluente da indústria de papel e pasta de celulose a fim disponibilizar os açúcares contidos neste resíduo. A enzima celulase usada no estudo foi produzida pelo cultivo do fungo *Trichoderma reesei* (MTCC 164). As melhores condições deste pré-tratamento enzimático liberaram 22,9 g L⁻¹ de açúcares redutores totais, o que levou a uma produção de 2,03 mol H₂g⁻¹mol de substrato em uma cultura pura de *Enterobacter aerogenes* (MTCC2822). Garritano e colaboradores (2017) estudaram a possibilidade de um pré-tratamento enzimático do efluente da produção de óleo de palma. Os autores avaliaram diversas lipases comerciais e uma lipase extraída de semente de *Ricinus communis*, produzida pelo Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LaBiM) da UFRJ. Neste estudo foi observado que com o pré-tratamento com a enzima de *R. communis* a quantidade de hidrogênio produzida foi similar à obtida no pré-tratamento enzimático a enzima comercial Lipomod 34 MDP. Além disso, o pré-tratamento otimizou o processo de fermentação anaeróbica diminuindo a fase adaptativa

da produção de hidrogênio, etapa de crescimento ou readaptação dos microrganismos pós pré-tratamento, e aumentou a disponibilidade de ácidos graxos no meio fermentativo.

Tabela 7 - Resíduos líquidos agroindustriais e seus pré-tratamentos.

Resíduo	Pré-tratamento	Produção de H ₂	Referência
Águas residuais de abate de gado	-	319 mL H ₂ g ⁻¹ DQO consumido	Tang <i>et al.</i> , 2008
Águas residuais de destilaria	-	0,2 l H ₂ g ⁻¹ ΔDQO	Wicher <i>et al.</i> , 2013
Efluente da indústria de papel e pasta de celulose	Enzimático	2,03mol H ₂ g ⁻¹ mol de substrato	Lakshmid evi e Muthukumar, 2010
Efluente da fábrica de óleo de palma	Enzimático	2.56 ± 0,05mmol H ₂ g ⁻¹ DQO	Garritano <i>et al.</i> , 2017

Fonte: O autor, 2019

1.2.2 Resíduos Sólidos

Dentre os mais abundantes tipos de resíduos sólidos, encontram-se os derivados de biomassa compostos por material lignocelulósico. O material lignocelulósico é composto por celulose (polímero linear de glicose), hemicelulose (heteropolímero integrado por açúcares de cadeia carbônica com 5 e 6 carbonos) e lignina (macromolécula aromática). Para o reaproveitamento deste material é necessário um pré-tratamento para disponibilizar os monossacarídeos e compostos de baixo peso molecular (RIBEIRO VASCONCELOS DE SÁ *et al.*, 2015). Estima-se que estes resíduos apresentem a proporção de 60% a 17% de celulose,

37% a 10% de hemicelulose e 35% a 8% de lignina, dependendo da fonte do material lignocelulósico de acordo com a Tabela 8 (MONLAU et al., 2014; ROCHA et al., 2012).

A biomassa lignocelulósica pode ser utilizada para produzir energia de duas maneiras: pela sua combustão e usando-a para a produção de biocombustíveis. Devido às preocupações mundiais sobre o agravamento do aquecimento global, a primeira abordagem não se torna tão interessante por emitir uma quantidade significativa de gases de efeito estufa (DHYANI; BHASKAR, 2018). Logo, o reaproveitamento de biomassa para a produção de biocombustíveis se torna mais interessante, pois além da alta disponibilidade e do baixo custo por peso, este processo não compete com a produção de alimentos (RABELO et al., 2011; URBANIEC; BAKKER, 2015).

Tabela 8 - Caracterização de algumas biomassas lignocelulósicas

Substrato	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
Palha de trigo	40 - 33	34 - 20	18 - 13
Caule de girassol	42 - 34	21 - 19	30 - 12
Palha de cevada	36 - 34	29 - 12	15 - 8
Palha de arroz	37 - 34	22 - 16	15 - 12
Hastes de milho	38 - 36	30 - 10	10,5 - 3,5
Palha de milho	39 - 37	31 - 23	26 - 18
Palha de colza	37	36	17
Bagaço de cana-de-açúcar	45	27	21

Fonte: Adaptado de MONLAU et al., 2014; ROCHA et al., 2012; URBANIEC; BAKKER, 2015

Esses resíduos agroindustriais sólidos apresentam uma grande porcentagem de celulose e hemicelulose, açúcares que podem ser reaproveitados como fontes de carboidratos para processos fermentativos como, por exemplo, para a produção de biocombustíveis, produção de enzimas, ou produção de meios de fermentação de baixo custo (FERREIRA-LEITÃO et al., 2017).

Para a produção de hidrogênio, estes resíduos sólidos precisam passar por uma etapa de pré-tratamento a fim de disponibilizar monômeros de açúcares para os microrganismos produtores de hidrogênio. Os pré-tratamentos mais estudados são o ácido, o alcalino e o térmico. Esses pré-tratamentos podem ser seguidos de uma hidrólise enzimática. A eficiência irá depender das condições do pré-tratamento e do material a ser pré-tratado. Na Tabela 9 são apresentados alguns materiais lignocelulósicos estudados na literatura, os pré-tratamentos utilizados e a produção de hidrogênio obtida. Phummala e colaboradores (2014) estudaram o pré-tratamento alcalino empregando diferentes concentrações de hidróxido de sódio, temperaturas e intervalos de tempo para a separação da lignina da celulose e da hemicelulose de madeira descartada (hashi de madeira) (PHUMMALA et al., 2014). Wang e colaboradores (2012) estudaram dois pré-tratamentos do inóculo utilizando como fonte de carbono o bagaço de maçã pré-tratado com ácido. O pré-tratamento do resíduo foi realizado pela imersão do bagaço de maçã em uma solução de ácido clorídrico por 2h. A maior produção de hidrogênio foi obtida na fermentação com o pré-tratamento ultravioleta do inóculo atuando por 15 minutos (WANG et al., 2012).

Silva e colaboradores (2018) pré-trataram o bagaço da fruta do caju de três maneiras diferentes. Estas foram uma solução alcalina de peróxido, uma solução de ácido sulfúrico e uma hidrólise enzimática. O maior rendimento de hidrogênio obtido foram 4,99 mmolH₂/L_{hidrolisado}, 15 mmolH₂/L_{hidrolisado} e 0,59 mmolH₂/L_{hidrolisado} respectivamente. De Sá e colaboradores (2015) utilizaram quatro tipos de material lignocelulósico diferentes para a produção de hidrogênio, sendo eles: espiga de milho, casca de cacau, bagaço e palha de cana-de-açúcar. Esses materiais foram pré-tratados com uma solução de ácido sulfúrico alcançando $1,75 \pm 0,19 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{carboidrato}$, $1,65 \pm 0,19 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{carboidrato}$, $1,91 \pm 0,11 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{carboidrato}$ e $2,99 \pm 0,10 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{carboidrato}$ respectivamente.

Resíduos agroindustriais também são utilizados para produção de biocombustíveis. Aguiar e colaboradores (2017a) têm estudado a produção de biodiesel a partir de resíduos agroindustriais ricos em ácidos graxos livres. Como biocatalisador, os autores utilizam o preparado enzimático sólido (PES). O PES consiste no material final liofilizado obtido após a fermentação em estado sólido (FES). É o biocatalisador produzido no cultivo em estado sólido que não passa por uma etapa de separação deste resíduo sólido após a fermentação. O

PES, contendo as lipases produzidas pelo fungo e adsorvidas na própria matriz sólida utilizada no cultivo, pode ser aplicado diretamente como biocatalisador na produção de biodiesel o que reduz os custos com extração, purificação e imobilização da enzima.

Tabela 9 - Resíduos sólidos agroindustriais e seus pré-tratamentos

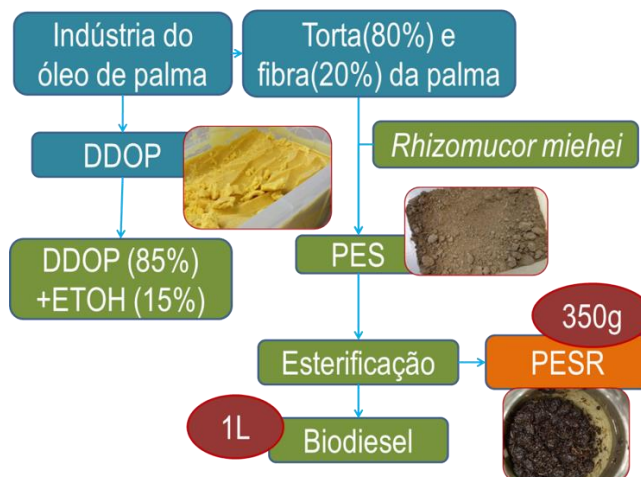
Matéria prima	Pré-tratamento	Produção de H ₂	Referência
Hashi de madeira	Alcalino e hidrólise enzimática	195 mL de H ₂ g ⁻¹ açúcar consumido	(PHUMMALA et al., 2014)
Bagaço de maçã	Ácido	106,9 mLH ₂ g ⁻¹ ST 4,99mmol H ₂ L ⁻¹ de hidrolisado	(WANG et al., 2010)
Bagaço da fruta do caju	Alcalino, ácido e hidrólise enzimática	15mmol H ₂ L ⁻¹ de hidrolisado 0,59mmol H ₂ L ⁻¹ de hidrolisado	(SILVA et al., 2018)
Espiga de milho		1,75 ± 0,19 mol H ₂ mol ⁻¹ carboidrato	
Casca de cacau		1,65 ± 0,19 mol H ₂ mol ⁻¹ carboidrato	(RIBEIRO VASCONCELOS
Palha de cana	Ácido	1,91 ± 0,11 mol H ₂ mol ⁻¹ carboidrato	DE SÁ et al., 2015)
Bagaço de cana		2,99 ± 0,10 mol H ₂ .mol ⁻¹ carboidrato	

Fonte: O autor, 2019

A Figura 5 representa um exemplo do processo de produção de PES e sua aplicação na síntese de biodiesel desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LaBiM)/IQ-UFRJ (AGUIEIRAS et al., 2017a). Neste processo, a FES é realizada com o fungo filamentososo *Rhizomucor miehei* produtor de lipases utilizando como matéria-prima a torta e a fibra de palma. Ao final da FES, o material fermentado (PES) pode ser liofilizado e empregado como um biocatalisador heterogêneo na síntese de biodiesel a partir da utilização de outro subproduto da produção de óleo de palma: o destilado de desodorização do óleo de

palma (DDOP). O destilado desodorizado de óleo de palma (DDOP) é uma matéria-prima residual, oriunda do refino do óleo de palma, e rica em ácidos graxos. A síntese de biodiesel ocorre através das reações de transesterificação e esterificação dos triglicerídeos e ácidos graxos, respectivamente, presentes no DDOP com álcoois de cadeia curta, tais como o etanol. Essas reações são catalisadas pelas lipases presentes no PES. No entanto, após a reação, o biodiesel é separado do biocatalisador, que se transforma em um novo resíduo, denominado Preparado Enzimático Sólido Residual (PESR). Neste processo, para cada 1L de biodiesel produzido, 350g de PESR são gerados (AGUIEIRAS et al., 2014, 2017a, 2019a; AGUIEIRAS; SOUZA; LANGONE, 2013; MESSIAS et al., 2011). Esse biocatalisador residual contém uma grande quantidade de matéria orgânica e pode, então, ser utilizado na fermentação anaeróbia para produção de hidrogênio.

Figura 5 - Produção de biodiesel utilizando PES como biocatalisador

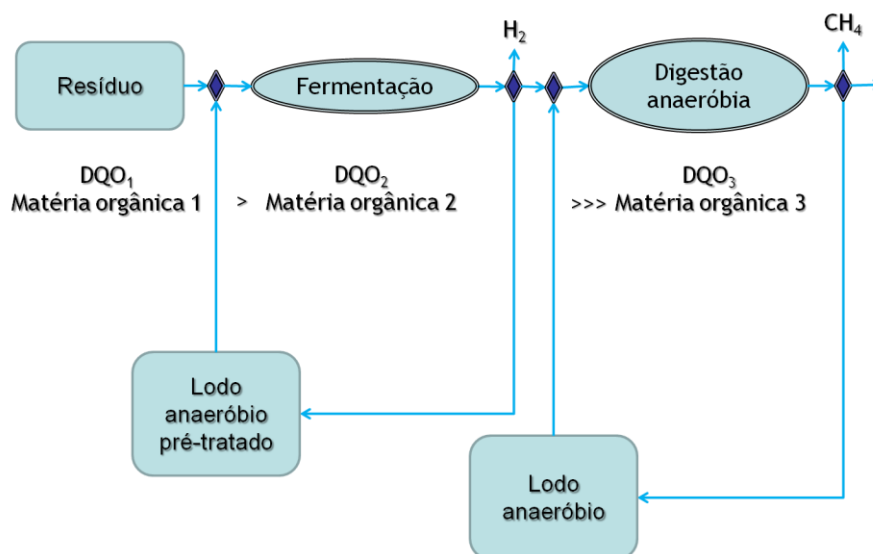


Fonte: O autor, 2019

1.3 Produção sequencial de hidrogênio e metano utilizando PESR como matéria prima

Uma maneira de aproveitar ainda mais o potencial energético dos resíduos utilizados para a produção de hidrogênio via processo fermentativo é produzir metano após a produção de hidrogênio (produção em processo sequencial). Esse processo se divide em duas etapas: a primeira etapa é a produção de hidrogênio a partir da fermentação de resíduo agroindustrial utilizando como inóculo o lodo anaeróbico pré-tratado para inibir a fase metanogênica; a segunda etapa é a produção de metano com o lodo anaeróbico *in natura* e com os ácidos orgânicos produzidos na primeira etapa, como representado na Figura 6. Além do maior aproveitamento energético, também é possível alcançar uma redução do potencial poluidor do resíduo agroindustrial utilizado, adequando-o ao limite exigido pela legislação ambiental (GARRITANO et al., 2018; KHAN et al., 2016; SÁ; CAMMAROTA; FERREIRA-LEITÃO, 2014; WANG et al., 2012).

Figura 6 - Produção de H₂ e de CH₄ em processo sequencial



Fonte: O autor, 2019

A Tabela10 apresenta dados da literatura em que a produção de metano em dois estágios foi maior que a obtida em um estágio.

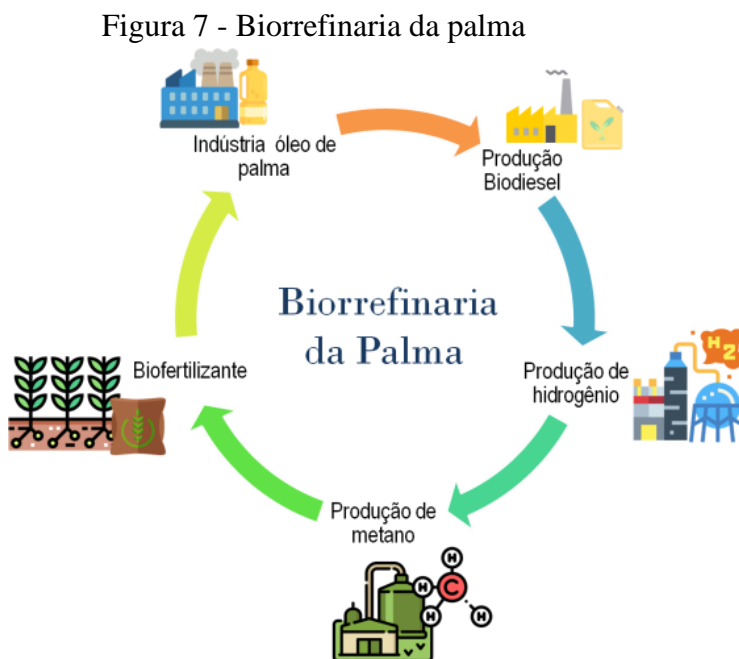
Tabela 10 - Produção de metano em processo de um estágio e em processo sequencial de dois estágios

Resíduo	Processo em um estágio	Processo sequencial em dois estágios		Referência
	CH ₄	H ₂	CH ₄	
Silagem de capim	261,00 mL/g Sólidos Suspensos Voláteis (SSV)	17,47 ml/g SSV	392,84 mLg ⁻¹ SSV	(DENG et al., 2019)
Biomassa de madeira de álamo	0,276 ± 0,03 L/gDQO	0,131 ± 0,02 L/gDQO	0,320 ± 0,02 Lg ⁻¹ DQO	(AKOBI et al., 2016)
Resíduo de alimentos	61,2 ± 2,2 %	18,4 ± 6,3 %	70,1 ± 1,6 %	(BALDI; PECORINI; IANNELLI, 2019)
Vinhaça	250 mL/ g SSV	14,8 mL/ g SSV	274,0 mL g ⁻¹ SSV	(FU et al., 2017)

Fonte: O autor, 2019

A produção de gás em duas etapas apresenta uma produção de metano maior e mais rápida do que a produção de metano em uma etapa única (FU et al., 2017). Isso é devido às condições otimizadas de cada etapa como: pH, razões balanceadas de C/N e a quantidade de ácidos orgânicos disponíveis. Além disso, a etapa de fermentação age como um pré-tratamento do resíduo agroindustrial para a produção de metano, hidrolisando compostos mais complexos e, por consequência, facilitando a ação das arqueas metanogênicas (BALDI; PECORINI; IANNELLI, 2019; KHAN et al., 2016; MASSANET-NICOLAU et al., 2015; WANG et al., 2011). O metano pode ser utilizado como biocombustível, gás de cozinha ou convertido em energia. As condições de pH e temperatura da produção de metano na literatura variam entre 7,0 - 7,5 e 35°C - 55°C respectivamente (ESCAMILLA-ALVARADO et al., 2014; KRISHNAN et al., 2016; LAY et al., 2019).

O PESR é um subproduto rico em matéria orgânica devido à sua origem, bem como à presença de meio reacional retido no material após a reação, o que o torna interessante para a produção biológica de hidrogênio, via fermentação, e produção de metano, via digestão anaeróbica, em um processo sequencial. A integração da produção de óleos com a produção de biodiesel e a geração de biogás permite a implantação de uma biorrefinaria da palma, como ilustrado na Figura 7. Após a geração de biogás, o material residual ainda pode ser utilizado como biofertilizante, fechando um ciclo sustentável. Esse processo se enquadra no conceito de bioeconomia, atendendo a maioria dos princípios da química verde (LENARDÃO et al., 2003).



Fonte: O autor, 2019

2. OBJETIVO

Estudar a produção de hidrogênio (H_2) e de metano (CH_4) utilizando como matéria-prima, o Preparado Enzimático Sólido Residual (PESR) da produção de biodiesel e, como inóculo, o lodo da estação de tratamento de esgoto (ETE).

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o PESR visando sua aplicação na produção de H_2 e de CH_4 ;
- Avaliar a influência do pré-tratamento térmico do lodo da ETE na produção de H_2 e de CH_4 em fermentação anaeróbia;
- Investigar a melhor concentração de PESR para a produção de H_2 em fermentação anaeróbia;
- Acompanhar a cinética da produção de H_2 nas melhores condições reacionais determinadas para a fermentação anaeróbia;
- Avaliar a produção de CH_4 em fermentação anaeróbia utilizando PESR e o lodo da ETE;
- Investigar a produção de CH_4 em processo de dois estágios, utilizando o meio fermentativo após produção de H_2 .

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Origem do PESR

O Preparado Enzimático Sólido Residual (PESR) foi produzido e cedido pelo Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LaBiM) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e os insumos utilizados na produção do Preparado Enzimático Sólido (PES) (torta, fibra de dendê e DDOP) foram cedidos pela Agropalma (PA, Brasil).

A produção do PESR é representada na Figura 5 **Erro! Fonte de referência não encontrada.** Primeiro ocorre a inoculação do fungo filamentoso *Rhizomucor miehei* em uma mistura de 20% de torta e 80% de fibra. Após 72h em uma estufa, com temperatura e umidade constantes, é formado o PES. O PES, então, é utilizado como biocatalisador em uma reação com DDOP e etanol a 50°C. Em seguida o biodiesel é separado do PESR.

4.2 Caracterização do PESR

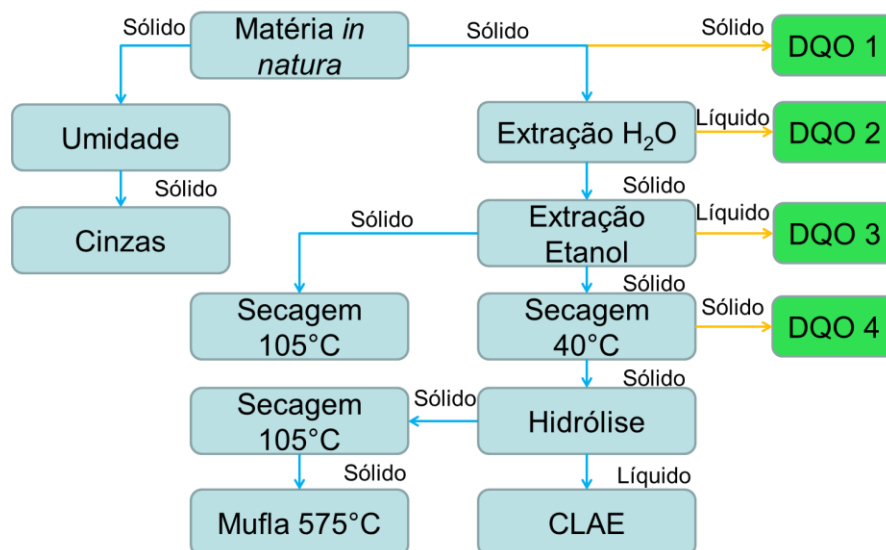
O PES, o PESR, a fibra e a torta da palma foram caracterizados pela metodologia de determinação estrutural de carboidratos e de lignina na biomassa (SLUITER et al., 2012). A Figura 8 ilustra as etapas dessa caracterização, porém no PESR foi realizada apenas a análise da Demanda Química de Oxigênio (DQO). As Análises de DQO foram realizadas de acordo com a metodologia do *Standard Methods* (PITWELL, 1995), sendo que as amostras líquidas foram diluídas 10 vezes e nos testes com as amostras sólidas foi utilizada uma massa de 1mg e completando com água destilada até chegar ao peso de 1,7g quantidade de amostra necessária para a análise.

Na etapa de caracterização dos resíduos, inicialmente foi determinada a umidade da amostra (0,5 g) *in natura* em triplicata. Em seguida, essas amostras seguiram para uma mufla a 575°C a fim de determinar, por diferença de massa, o teor de cinzas. Na segunda etapa, seis amostras de massa seca (2 g) conhecida seguiram para uma extração em água destilada e em etanol (75% VETEC). Três dessas amostras foram colocadas em uma estufa de secagem a 105°C para, por diferença de massa, determinar a quantidade de material extraído. As outras 3 amostras foram mantidas estufa de secagem a 40°C até atingir uma umidade inferior a 10%, para evitar a diluição do ácido sulfúrico na etapa de hidrólise.

A hidrólise ácida foi conduzida em um tubo de pressão onde foi adicionada a amostra (0,3g) após secagem em estufa a 40°C, e 3 mL de ácido sulfúrico 72% (m/m). Os tubos foram aquecidos em um banho termostático a 30°C, por 60 min, com agitação de 5 min a cada 10 min. Após isso foi adicionado 86,73 ml de água destilada para diluir o ácido sulfúrico até 4% (m/m). Após a diluição do ácido, os tubos foram levados à autoclave por uma hora, a 121°C. Além dos tubos em triplicata com a amostra, outros três tubos foram autoclavados contendo uma solução padrão de carboidratos (presentes na amostra) e ácido sulfúrico a 4% (m/m). A amostra foi filtrada e a fração líquida foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência, enquanto que a fração sólida foi seca a 105 °C, em estufa, e, em seguida, a 575°C e, pela diferença de massa, é determinada a quantidade de matéria insolúvel em ácido sulfúrico.

As análises de DQO foram realizadas em amostras sólidas e frações líquidas. As amostras sólidas analisadas foram as amostras do PESR *in natura* e após a extração em água e etanol, representados por DQO 1 e DQO 4, respectivamente, na Figura 8. As frações líquidas foram alíquotas da extração com água e alíquotas da extração com etanol, representadas por DQO 2 e DQO 3, respectivamente, na Figura 8. A alíquota da extração com etanol passou previamente por uma etapa de separação do etanol e da amostra em um rotavapor, e após isso foi adicionada água destilada à amostra.

Figura 8 - Esquema da caracterização pela metodologia de determinação estrutural de carboidratos e lignina na biomassa.



Fonte: O autor, 2019

Além da caracterização pela metodologia de determinação estrutural de carboidratos e lignina na biomassa (PESR) também foi realizada uma análise de óleos e graxas (SABESP, 1997).

Primeiro determinou-se a massa e o peso seco da amostra. A amostra passou previamente por uma etapa de acidificação ($\text{HCl } 0,1\text{mol L}^{-1}$) e desidratação química ($\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$). Após esta etapa, a amostra foi filtrada (água destilada e uma suspensão de terra diatomácea) e levada à estufa de secagem. Então, com o auxílio de um equipamento Soxhlet utilizando 180 mL hexano P.A. por amostra como solvente, a amostra passou por uma etapa de extração (80 ciclos). Ao final da extração, o hexano foi recuperado com o auxílio de um rotavapor. O balão foi pesado antes e depois da extração. A porcentagem de óleos e graxas (OG) foi, então, calculada de acordo com a Equação 11.

$$\%OG = \frac{P_2}{P_1} \cdot 100 \quad (11)$$

Sendo:

P_1 = peso seco da amostra

P_2 = diferença de massa do balão após recuperação do hexano com a massa do balão antes da etapa de extração.

4.3 Lodo anaeróbio

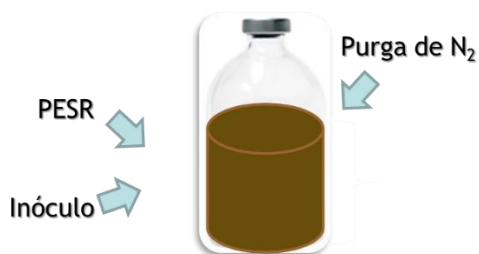
O inóculo utilizado neste estudo foi o lodo anaeróbio proveniente de um biodigestor da estação de tratamento de esgoto do Rio de Janeiro.

O mesmo inóculo foi utilizado para a produção de hidrogênio e de metano durante todo o trabalho experimental. O inóculo foi armazenado em geladeira.

4.4 Produção de Hidrogênio em fermentação anaeróbia

A produção de hidrogênio por fermentação foi realizada em frascos tipo penicilina com volume de 100 mL, como ilustrado na Figura 9. As fermentações ocorreram com um volume reacional de 45mL com o meio contendo o inóculo e o PESR, com o pH inicial ajustado para 5,5. Os frascos foram purgados com nitrogênio por 45s e levados a um shaker (Marconi), com rotação de 150 rpm, a 35°C. Após o término da fermentação, as quantidades de hidrogênio, de metano, de gás carbônico, de ácido palmítico, de ácido oléico, de ácido acético, de ácido butírico, de glicerol e de 1,3propanediol foram determinadas, de acordo com a metodologia descrita nos itens 4.5 e 4.6.

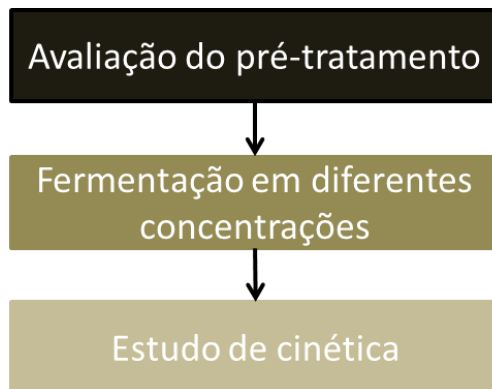
Figura 9 - Esquema da produção de hidrogênio



Fonte: O autor, 2019

O estudo da produção de hidrogênio seguiu as seguintes etapas representadas na Figura 10, onde, após cada etapa, a condição experimental que permitiu o maior rendimento de hidrogênio foi escolhida para o estudo da próxima etapa.

Figura 10 - Etapas de avaliação da produção de hidrogênio.



Fonte: O autor, 2019

4.4.1 Influência do pré-tratamento do inóculo na produção de hidrogênio

O pré-tratamento térmico do inóculo foi realizado na fermentação anaeróbia conduzida com a concentração $23 \text{ g}_{\text{PESR}}\text{L}^{-1}$ durante 24h, a 35°C . Este pré-tratamento foi realizado aquecendo o inóculo a 65°C em um banho termostático por 30 min, a fim de inibir as arqueias metanogênicas consumidoras de hidrogênio, antes de ser adicionado ao frasco penicilina contendo o meio de fermentação. Nesse experimento, três frascos foram incubados por 24h com o lodo pré-tratado termicamente (PTT) outros três com o lodo sem pré-tratamento (SPT).

4.4.2 Influência da concentração de Preparado Enzimático Sólido Residual (PESR)

O efeito da concentração de PESR na fermentação anaeróbia para produção de hidrogênio foi estudado utilizando as seguintes concentrações de PESR ($\text{g}_{\text{PESR}}\text{L}^{-1}$): 15, 23, 31 e $46 \text{ g}_{\text{PESR}} \text{L}^{-1}$. As fermentações foram conduzidas, em triplicata, durante 24h, a 35°C .

4.4.3 Avaliação da cinética de produção de hidrogênio

A cinética da produção de hidrogênio foi conduzida por 48 h, empregando $31 \text{ g}_{\text{PESR}} \text{L}^{-1}$, com lodo pré-tratado termicamente. As amostras, em triplicata, foram retiradas nos intervalos de tempo de: 0, 8, 16, 24, 32, 40 e 48 h para determinação de tempo de maior produção de hidrogênio.

4.4.4 Análise da atividade catalítica do PESR

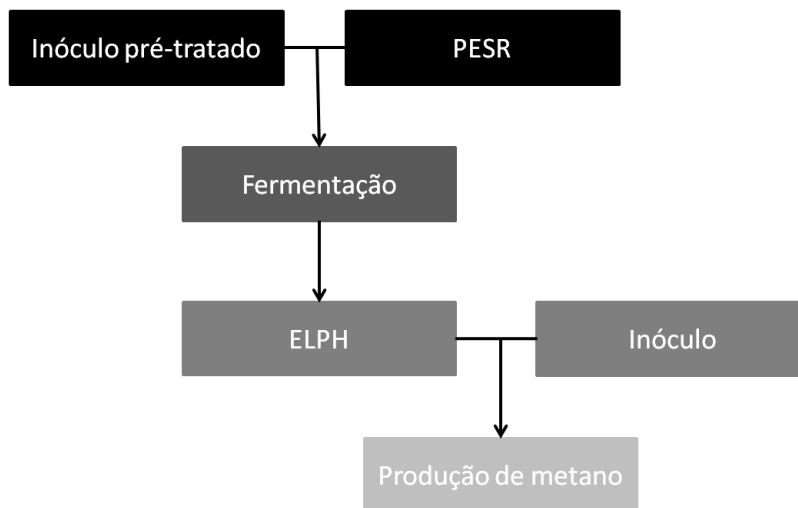
Para verificar se o PESR apresentava atividade catalítica e, desta forma, poderia influenciar na concentração de ácidos graxos liberados no meio de fermentação, foram realizados dois experimentos, em triplicata, nas mesmas condições da fermentação anaeróbia para produção de hidrogênio: frasco tipo penicilina com um volume de trabalho de 45 mL, a 35°C, agitado a 150 rpm durante 24h. Em um experimento ao frasco foi adicionada água destilada e PESR na concentração de 31 g PESR L⁻¹, sem a adição de lodo. Este meio teve o pH inicial ajustado para 5,5. Outro experimento foi realizado nessas mesmas condições, mas aquecendo o PESR previamente a 105°C por 2h em estufa para inativar as enzimas presentes nesse resíduo. Os frascos foram agitados em shaker (Marconi), a 150 rpm, a 35°C, por 24h. Amostras foram retiradas após 24 h para determinação do teor de ácido palmítico e ácido oléico.

4.5 Produção de metano em dois estágios

A produção de metano por digestão anaeróbia foi estudada em processo de um estágio e de dois estágios. A produção de metano em um estágio ocorreu em frasco tipo penicilina de 100 mL com volume de trabalho de 45 mL. O meio foi composto pela suspensão do inóculo *in natura* com o PESR, em pH inicial 7,0. A concentração do PESR foi de 31 g_{PESR}/L em um volume de trabalho de 45 mL. Os frascos foram purgados com nitrogênio por 45s e mantidos em uma incubadora (Marconi), a 35°C, por 35 dias. Amostras, em triplicata, foram retiradas nos intervalos de 0, 4, 7, 10, 14, 21, 28 e 35 dias para determinação da produção de metano, do consumo e produção dos metabólitos.

A produção de metano em processo de dois estágios foi inicialmente conduzida nas mesmas condições do processo em um estágio. No entanto, na produção de metano em dois estágios, a fonte de carbono foi o efluente líquido da produção de (ELPH). A Figura 11 ilustra a produção de metano em dois estágios.

Figura 11 - Fluxograma da produção de metano em processo sequencial de dois estágios



Fonte: O autor, 2019

4.6 Determinação do teor de gases

O teor dos gases hidrogênio, metano e gás carbônico foi determinado em um micro-cromatógrafo de fase gasosa (Agilent Technologies 3000), equipado com detector de condutividade térmica (TCD). O gás de arraste utilizado foi o Nitrogênio P.A. (AIR LIQUIDE). As colunas cromatográficas utilizadas foram HP-PLOT U (3 m x 0,32 mm x 30 mm) e HPLOT Peneira Molecular 5A (10 m x 0,32 mm x 12 mm). A quantificação desses gases foi realizada com o auxílio de uma curva analítica (Anexo A). Essas curvas foram geradas com um controlador de vazão misturando o gás de interesse (hidrogênio P.A. (LINDE), metano P.A. (LINDE) e gás carbônico P.A. (LINDE)) com nitrogênio, até a porcentagem do gás de interesse alcançar a porcentagem almejada. As porcentagens utilizadas para as curvas estão descritas na Tabela 11.

Tabela 11 - Porcentagem dos gases utilizadas para a construção da curva analítica

	Porcentagem do gás na curva analítica							
Hidrogênio	5	10	20	40	60	70	80	100
Metano	5	10	20	40	60	70	80	100
Gás carbônico	5	15	30	50	70	80	90	100

Fonte: O autor, 2019

O volume do gás de interesse produzido foi calculado pela Equação 12. A porcentagem de gás de interesse é a porcentagem obtida com a curva analítica.

$$V = \frac{P_T V_T}{P_{atm}} (\% \text{ gás de interesse}) \quad (12)$$

Sendo:

P_T : pressão total medida com um manômetro mais a pressão atmosférica, antes da retirada da amostra analisada no micro CG

V_T : Volume Total menos o volume de trabalho

P_{atm} : pressão atmosférica

4.7 Determinação da concentração de metabólitos de substratos no meio de fermentação

A concentração de ácido palmítico, de ácido oléico, de ácido acético, de ácido butírico, de glicerol e de 1,3 propanediol foi determinada pelo método cromatográfico.

As amostras do meio de fermentação foram centrifugadas e a fração líquida foi separada para determinação da concentração de ácido acético, de ácido butírico, de glicerol e de 1,3 propanediol por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A fração sólida foi dissolvida com o álcool isopropílico (Cromato Produtos Químicos, 99,9%) e analisada por cromatografia de fase gasosa.

A concentração de ácido acético, ácido butírico, glicerol e 1,3 propanediol (fase líquida obtida na centrifugação do meio de fermentação) foi determinada por CLAE utilizando o sistema de cromatografia líquida da Shimadzu (modelo LC 10-AT), equipado com a coluna HPX 87H, utilizando o detector índice de refração, com H_2SO_4 $0,005 \text{ mmol L}^{-1}$ como fase móvel e $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ de vazão. A concentração desses analitos foi determinada com o auxílio de uma curva padrão (anexo B). As concentrações dos analitos utilizadas para a construção da curva padrão variaram de $0,5$ a 50 mmol L^{-1} (Anexo B). Os padrões utilizados foram ácido acético 99,7%, obtido da VETEC Química Fina Ltda, ácido butírico 99%, glicerol 99,5% e 1,3 propanediol 96%, todos obtidos da Sigma-Aldrich.

A concentração de ácido palmítico e de ácido oléico foi determinada por cromatografia em fase gasosa utilizando um cromatógrafo da Agilent Technologies (modelo 7890B), nitrogênio como gás de arraste, com detector de ionização de chama e a coluna utilizada foi DB-FFAP. Ácido palmítico (98%) foi obtido da ACROS ORGANICS e ácido oléico (P.A.) foi obtido da Synth. A concentração desses analitos foi determinada com o auxílio de uma curva padrão. As concentrações dos analitos utilizadas para a construção da

curva padrão variaram de 0,07 a 1,2 mmol L⁻¹ (Anexo C). Os padrões utilizados foram ácido palmítico 98%, obtido da ACROS ORGANICS, e ácido oléico P.A., obtido da SYNTH.

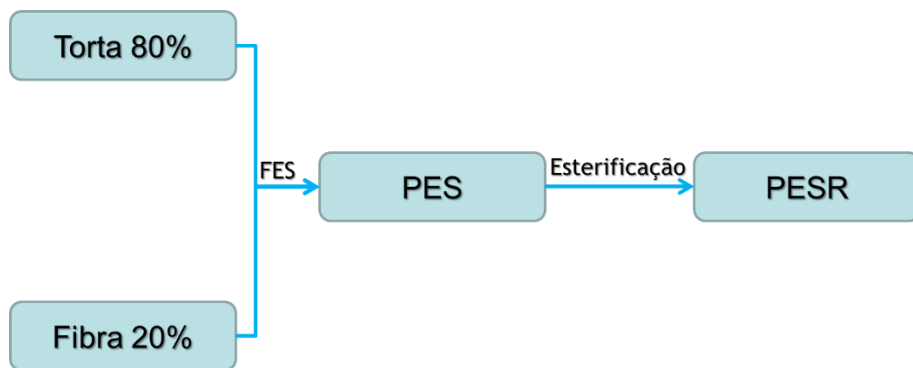
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do PESR

O PESR é o biocatalisador residual do processo de síntese enzimática de biodiesel. Neste processo, conforme relatado no item 1.4, uma grande quantidade de PESR (350 g) é gerada na produção de cada litro de biodiesel. Portanto, o aproveitamento desse material, rico em matéria orgânica, para a produção de hidrogênio por via fermentativa minimiza os custos da produção enzimática de biodiesel, bem como da produção de biohidrogênio.

A caracterização do PESR, bem como de seus componentes originais (torta de palma, fibra da palma e o PES), foi realizada de acordo com a metodologia descrita no item 4.1 e os resultados estão apresentados nas Figura 13, 14, 15 e 16. A Figura 12 ilustra resumidamente as etapas em que cada componente é utilizado até a geração do PESR.

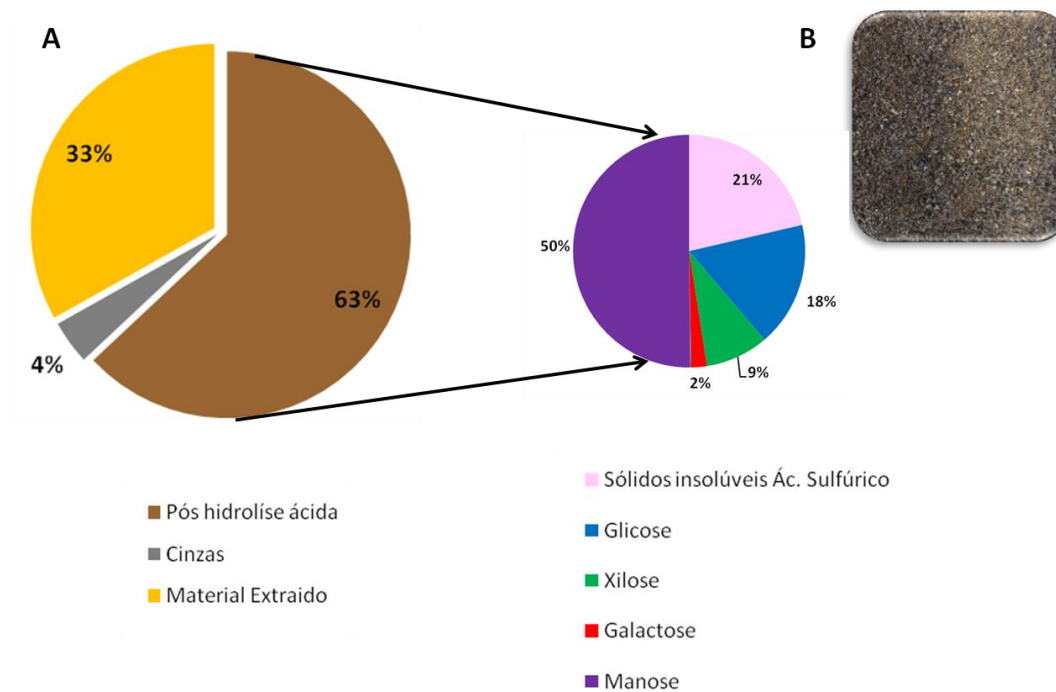
Figura 12 - Esquema resumido da obtenção do PESR



Fonte: O autor, 2019

A torta da palma é proveniente de uma das etapas de extração do óleo de palmiste da amêndoa da palmeira *Elaeisguineensis*. Na Figura 13 estão ilustrados os resultados obtidos da caracterização da torta de palma. O teor de cinzas (resíduo mineral inorgânico) da torta de palma foi de 4% m/m. Do material sólido obtido após extração com solvente (água e etanol) e hidrólise ácida (vide Figura 8), o principal componente é a manose. A porcentagem de manose contida na torta de palma (33% em relação à massa total da torta) está de acordo com a literatura, que relata um teor de 35% de manose na torta (MONTEIRO et al., 2019). A presença de manose na composição da torta de palma pode estar relacionada à manana. A manana é um oligossacarídeo que pode ser composto apenas de D-manose (manana), ou uma combinação de manose e glicose (glucomanana) ou uma combinação com galactose (galactomanana) (FAN et al., 2014; KALIDAS et al., 2017; MONTEIRO et al., 2019). Isto justificaria a quantidade de glicose e galactose encontrada na composição do material sólido após hidrólise ácida, como pode ser observado na Figura 13.

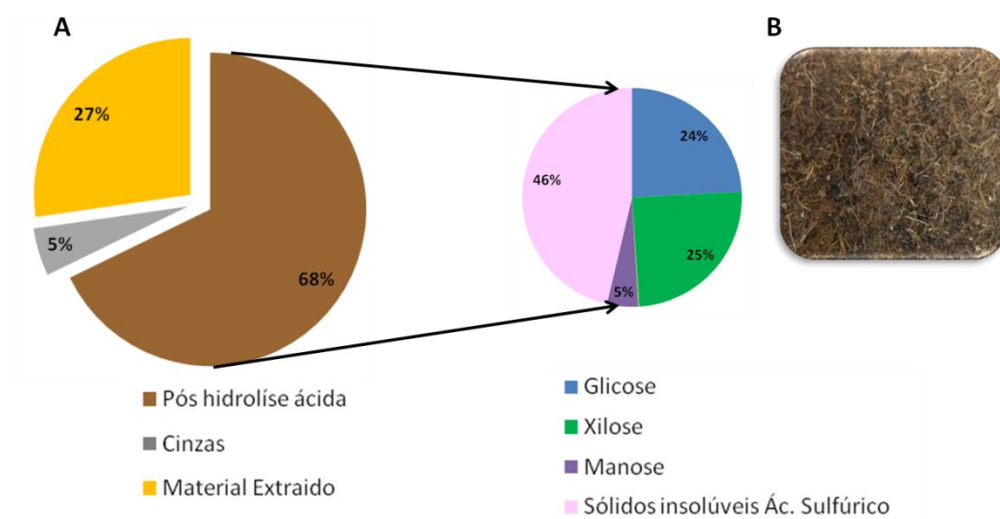
Figura 13 - Caracterização da torta da amêndoa da palmeira *Elaeisguineenses*(A)
Foto da torta (B).



Fonte: O autor, 2019

A caracterização da fibra da semente da palmeira *Elaeis guineenses*, obtida no processo de extração do óleo da polpa do fruto, mostrou uma biomassa rica em glicose e xilose, como pode ser verificado nos resultados apresentados na Figura 14 (KUMNEADKLANG; O-THONG; LARPKIATTAWORN, 2019). A Figura 14 indica que esta biomassa é constituída principalmente de hemicelulose e celulose. A hemicelulose é um heteropolímero composto de carboidratos de cinco e seis carbonos. Dentre esses carboidratos, destacam-se principalmente a xilose e a glicose, o que justificaria a quantidade encontrada desses carboidratos conforme pode-se observar na Figura 14 (DE SÁ et al., 2013; KUMNEADKLANG; O-THONG; LARPKIATTAWORN, 2019; XIANG; MOHAMMED; SAMSU BAHARUDDIN, 2016).

Figura 14 - Caracterização da fibra obtida do fruto da palmeira *Elaeisguineenses*(A) Foto da fibra (B).



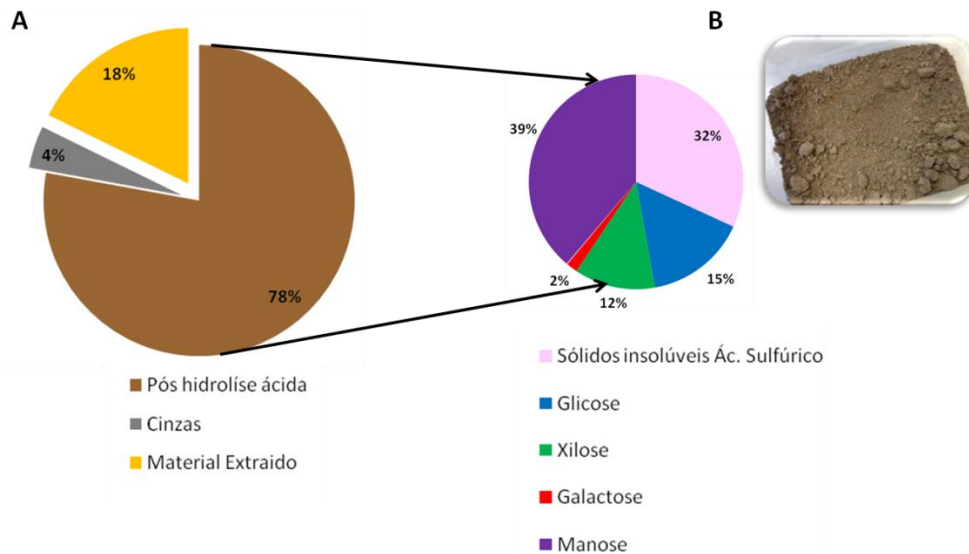
Fonte: O autor, 2019

O PES é a mistura da torta (80%) e da fibra (20%) após incubação e crescimento, por 72h, do fungo *Rhizomucor miehei*. A

Figura 15 apresenta o gráfico resultante da caracterização do PES. Nele é possível observar que a composição da biomassa é uma misturada composição da torta e da fibra do fruto da palmeira *Elaeis guineenses*. No entanto, a porcentagem de material extraído é

relativamente menor (cerca de 10%) em relação à torta e à fibra, indicando um provável consumo desse material pelo fungo *Rhizomucor miehei*.

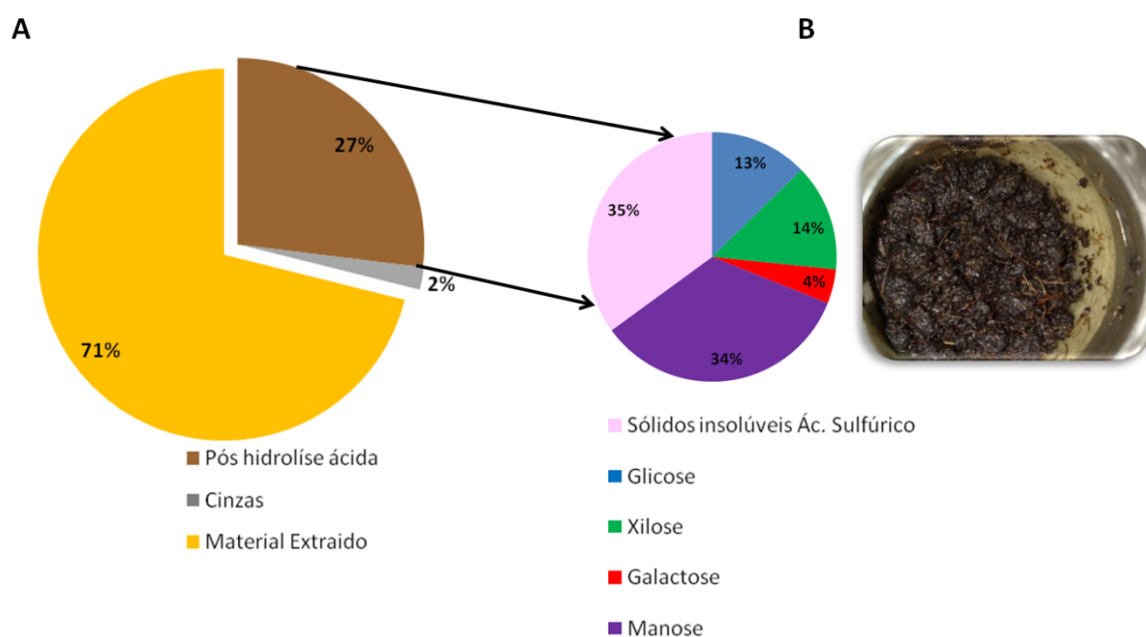
Figura 15 - Gráfico da caracterização do PES (A) Foto do biocatalisador PES (B).



Fonte: O autor, 2019

A Figura 16 apresenta o gráfico da caracterização do PESR. Os carboidratos não apresentam muita diferença em relação ao PES, no entanto, a quantidade de material extraído aumentou significativamente. Isso provavelmente devido à presença de ácidos graxos, de etanol, de triglicerídeos e de ésteres etílicos residuais da reação de síntese de biodiesel que ficaram adsorvidos no PES. A determinação de óleos e graxas no PESR revelou que 60% da massa do PESR é constituída de material lipídico.

Figura 16 - Caracterização do PESR (A) Foto do PESR (B).

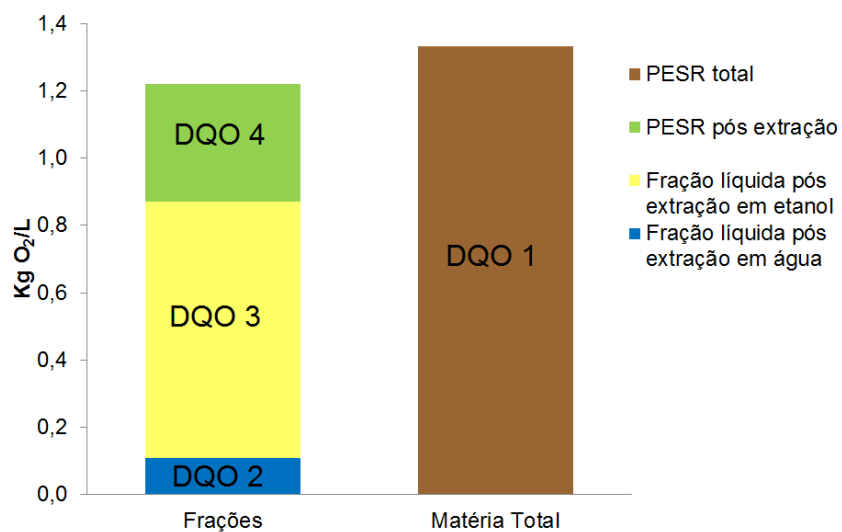


Fonte: O autor, 2019

Análises de DQO foram realizadas em amostras da caracterização pela metodologia de determinação estrutural de carboidratos e lignina na biomassa. A Figura 17 apresenta os resultados de DQO realizadas com o PESR. A DQO1 relativa ao PESR total indica a quantidade de DQO para 1g de PESR *in natura*. A DQO4 é a DQO obtida na análise do material sólido resultante de PESR após a extração com solvente (água e etanol). Já as DQO2 e DQO3 estão relacionadas às frações líquidas após extração em água e etanol, respectivamente.

Na Figura 17 é possível observar que a maior quantidade de matéria orgânica (71%) se encontra na fração líquida após a extração em etanol. Sabendo que 60% da massa do PESR é constituída de óleos e graxas, isso indica que a matéria orgânica que estará mais disponível aos microrganismos será constituída dos ácidos graxos/ésteres residuais da reação de síntese de biodiesel.

Figura 17: Análise de DQO do PESR. DQO1: DQO total do PESR, DQO2: DQO da fração líquida obtida após extração com água do PESR, DQO3: DQO da fração líquida obtida após extração com etanol do PESR, DQO4: DQO do resíduo sólido do PESR após extração com solventes.



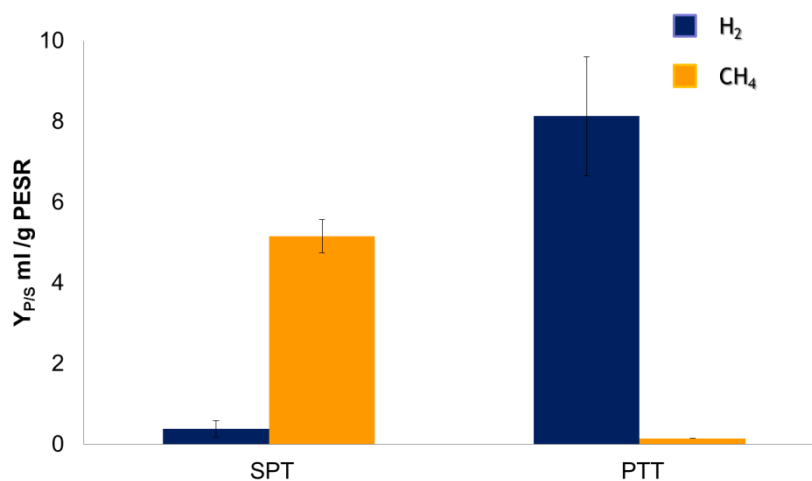
Fonte: O autor, 2019

5.2 Produção de hidrogênio via fermentação

5.2.1 Influência do pré-tratamento térmico do inóculo na produção de Hidrogênio

O pré-tratamento térmico do inóculo (lodo da estação de tratamento de esgotos) foi o pré-tratamento físico escolhido por ser o mais eficiente para a obtenção de maiores rendimentos de hidrogênio segundo a literatura (BUNDHOO; MOHEE; HASSAN, 2015; SONG et al., 2012). Desta forma, a produção de hidrogênio foi investigada a partir da fermentação anaeróbia utilizando lodo *in natura* (SPT) e o lodo após sofrer tratamento térmico (PTT) (aquecimento a 65°C por 30 min). Os resultados obtidos nesses experimentos estão ilustrados na Figura 18, onde é possível observar que os experimentos sem Pré-Tratamento Térmico (SPT) produziram metano ($5,16 \pm 0,21 \text{ mL g}_{\text{PESR}}^{-1}$) e praticamente não exibiram um rendimento significativo de hidrogênio. No experimento utilizando o lodo após Pré-Tratamento Térmico (PTT) foi observado o oposto, um aumento de 95% do rendimento de hidrogênio no meio ($8,13 \pm 1,20 \text{ mL g}_{\text{PESR}}^{-1}$). Isto indica que houve consumo de hidrogênio no experimento com o lodo SPT e que o pré-tratamento térmico foi eficiente em inibir as arqueias metanogênicas do inóculo.

Figura 18 - Avaliação do pré-tratamento térmico do inóculo na produção de hidrogênio e de metano. Os experimentos foram conduzidos com concentração de $23 \text{ g}_{\text{PESR}}\text{L}^{-1}$, durante 24h, a 35°C. SPT: rendimento de hidrogênio e de metano na fermentação conduzida com o lodo sem pré-tratamento térmico. PTT: rendimento de hidrogênio e de metano na fermentação conduzida com o lodo com pré-tratamento térmico por 30 min a 65°C. Em que $Y_{\text{P/S}}$ é o rendimento de gás produzido (ml) por PESR (g)



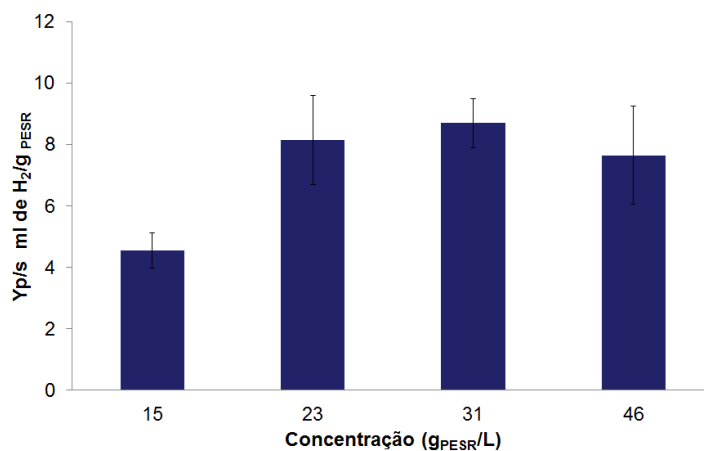
Fonte: O autor, 2019

5.2.2 Influência da concentração de PESR na produção de hidrogênio

O estudo variando as concentrações de PESR teve o intuito de selecionar a concentração de matéria prima mais adequada para aumentar o rendimento de hidrogênio. A Figura 19 mostra o gráfico do rendimento de hidrogênio obtido nas fermentações conduzidas com concentrações de 15, 23, 31 e 46 g PESR L⁻¹. A concentração de 31 g PESR L⁻¹ permitiu a obtenção do maior rendimento de hidrogênio (172 ± 32 mL H₂ L⁻¹ g PESR⁻¹). Com concentrações maiores de PESR, 46 g PESR L⁻¹, a média do rendimento de hidrogênio diminuiu. Porém, considerando o desvio padrão, os resultados com 31 e 46 g PESR L⁻¹ possuem valores próximos. No entanto, a fim de evitar o efeito de inibição por substrato optou-se por utilizar a concentração de 31 g PESR L⁻¹ nos experimentos seguintes.

O efeito de inibição por substrato é observado quando a quantidade de substrato na fermentação é tão alta que a produção de subprodutos passa a causar um efeito de inibição. A quantidade de subproduto provoca a inibição no consumo do substrato por ser tóxico ao microrganismo consumidor ou por uma inversão do equilíbrio químico (KARAOSMANOGLU GORGEÇ; KARAPINAR, 2019).

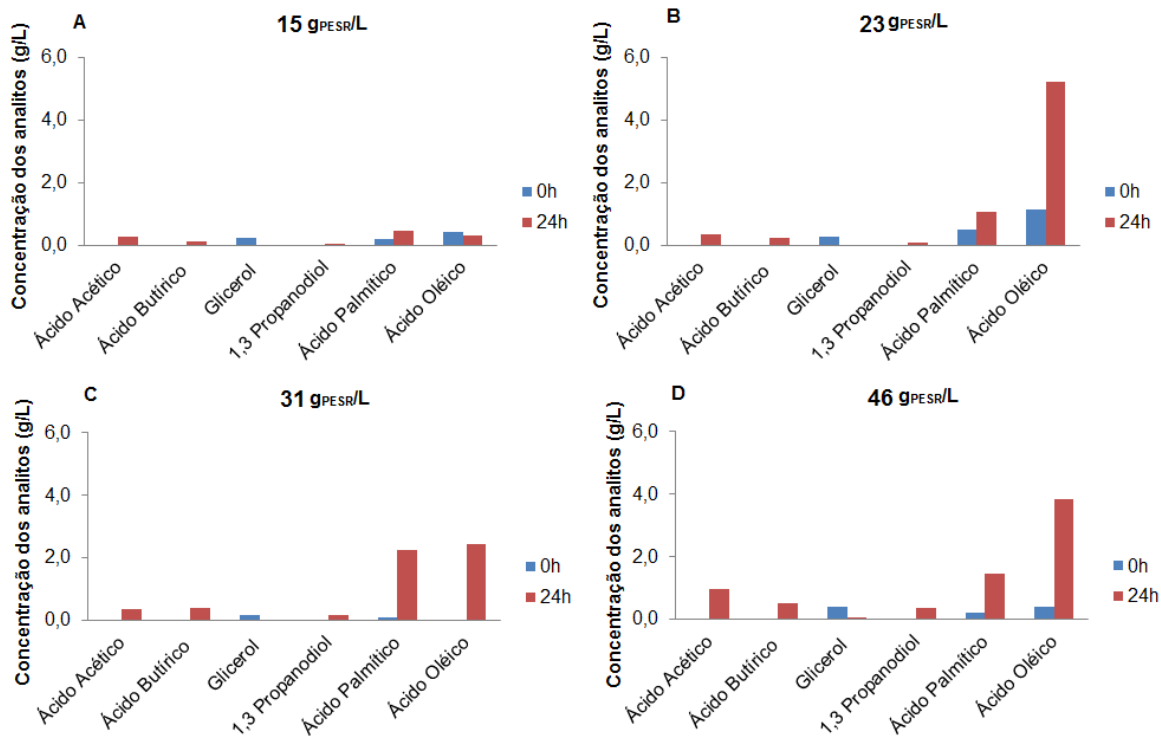
Figura 19 - Influência da concentração de PESR (15, 23, 31 e 46 g PESR L⁻¹) no rendimento em hidrogênio. A fermentação foi conduzida por 24h, a 35°C com o lodo pré-tratado termicamente a 65°C por 30 min.



Fonte: O autor, 2019

Amostras do meio fermentativo foram retiradas no início (0h) e após 24h de fermentação. A concentração (g L^{-1}) dos principais componentes no meio está apresentada na Figura 20 para as diferentes concentrações de PESR empregadas na fermentação. Nestes gráficos observa-se que inicialmente no meio fermentativo estão presentes o ácido palmítico, o ácido oléico e o glicerol (substâncias provenientes do meio reacional da síntese de biodiesel, que ficaram adsorvidas no PESR). Após 24h de fermentação, todo o glicerol é consumido e são formados o ácido acético, o ácido butírico e o 1,3 propanodiol. De forma geral, a concentração desses metabólitos formados aumentou com o aumento da concentração inicial de PESR. A concentração de ácido palmítico e de ácido oleico também aumentou durante a fermentação.

Figura 20 - Influência da concentração de PESR na concentração de analitos no meio fermentativo no início (0h) e ao final da fermentação (24 h) a 35°C. A: 15g PESR^L⁻¹. B: 23g PESR^L⁻¹. C: 31g PESR^L⁻¹. D: 46g PESR^L⁻¹



Fonte: O autor, 2019

5.2.3 Avaliação da cinética de produção de hidrogênio

Após a determinação das melhores condições para a produção de hidrogênio, a fermentação anaeróbia, conduzida com 31g PESR L⁻¹, a 35°C, foi acompanhada em diversos tempos e os resultados desses experimentos estão ilustrados na Figura 21. Neste gráfico da cinética da produção de hidrogênio, a linha laranja apresenta a produção experimental de

hidrogênio e a linha azul mostra a estimativa de produção teórica calculada pela equação de Gompertz descrita na Equação 13.

$$H(t) = H_{m\acute{a}x} \exp^{-\exp \frac{R_{m\acute{a}x} e}{H_{m\acute{a}x}} (\lambda - t) + 1} \quad (13)$$

Sendo:

H(t): produção de hidrogênio (em mL) em função do tempo (em h),

H_{máx}: máximo de hidrogênio produzido (em mL),

λ: fase lag (horas),

R_{máx}: produtividade máxima (em mL.h⁻¹)

e: exponencial de 1.

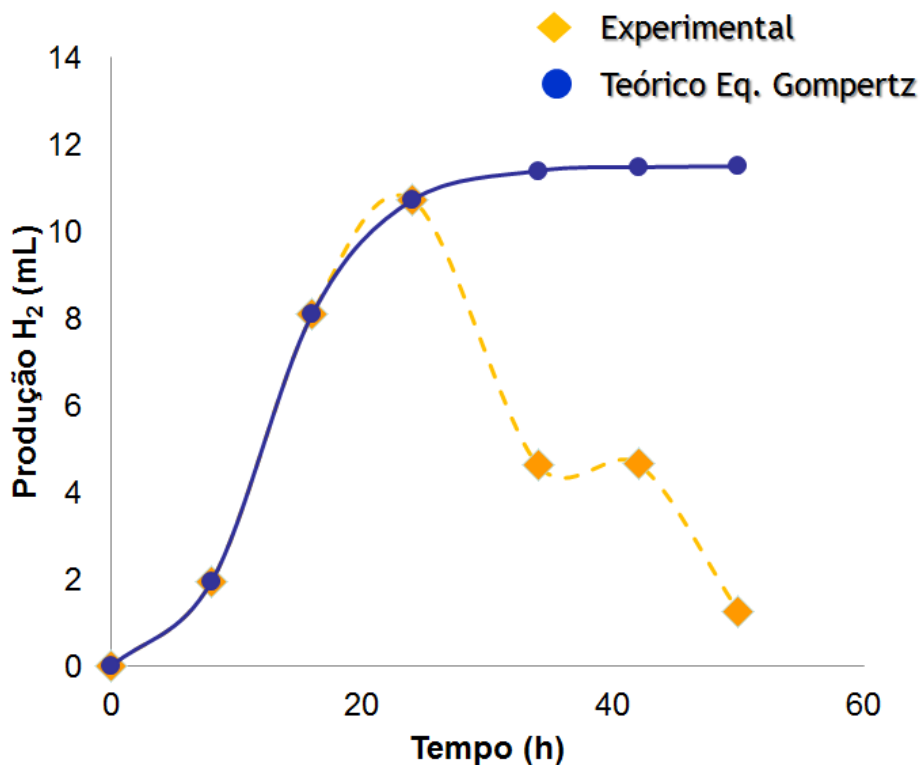
O modelo de Gompertz supõe que a produção de gás seja proporcional à atividade microbiana. Porém, essa proporcionalidade diminui ao longo do tempo seguindo a cinética de primeira ordem. Esse decaimento pode ser atribuído à perda de eficiência da fermentação ao longo do tempo (ALTAŞ, 2009; BASAK et al., 2018; TANG et al., 2008).

A Equação 14 descreve o modelo matemático encontrado com a ferramenta SolverdoExcel2010. O máximo de produção teórica de hidrogênio foi de 9,82 mL, enquanto que, o valor experimental obtido foi próximo a este valor (10,73 ±2mL de hidrogênio em 24h). Pela equação de Gompertz, a fase adaptativa determinada foi de aproximadamente 6 h, corroborando com os resultados experimentais obtidos.

$$H(t) = 9,82 \exp^{-\exp \frac{1,04e}{9,28} (6,17 - t) + 1} \quad (14)$$

Os resultados experimentais mostram que a produção de hidrogênio diminuiu após 24h. Isto ocorre por um provável consumo do hidrogênio na fase acetogênica. As bactérias homoacetogênicas possuem a capacidade de esporular. Por isso, o pré-tratamento térmico não é tão eficaz no processo de inibição destes microrganismos. Essas bactérias convertem o hidrogênio em ácido acético (SÁ; CAMMAROTA; FERREIRA-LEITÃO, 2014).

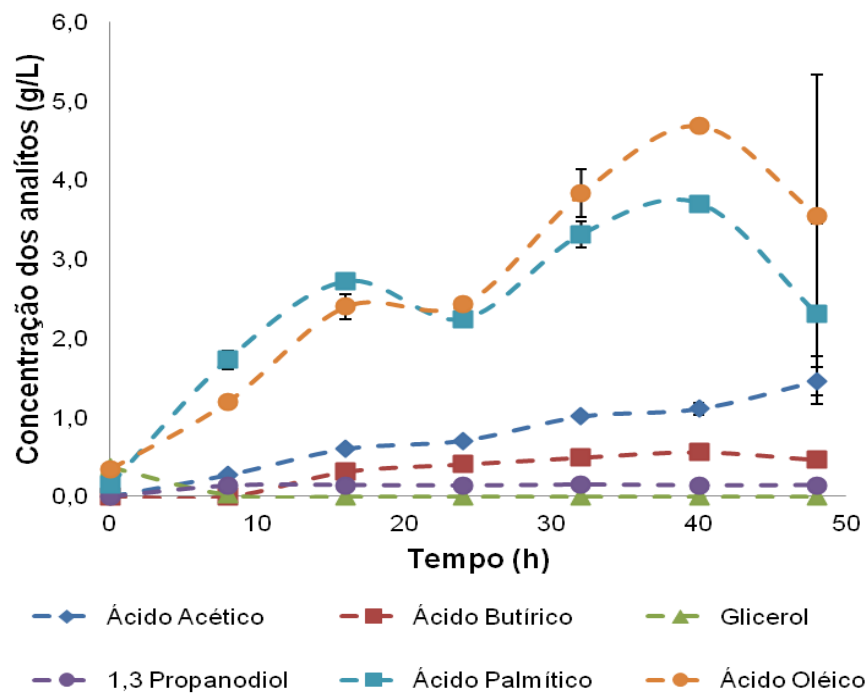
Figura 21 - Cinética da produção experimental de hidrogênio (linha laranja) e da produção teórica (linha azul) descrita pela equação de Gompertz. A fermentação ocorreu ao longo de 48h, a 35°C e contendo 31g PESR L⁻¹.



Fonte: O autor, 2019

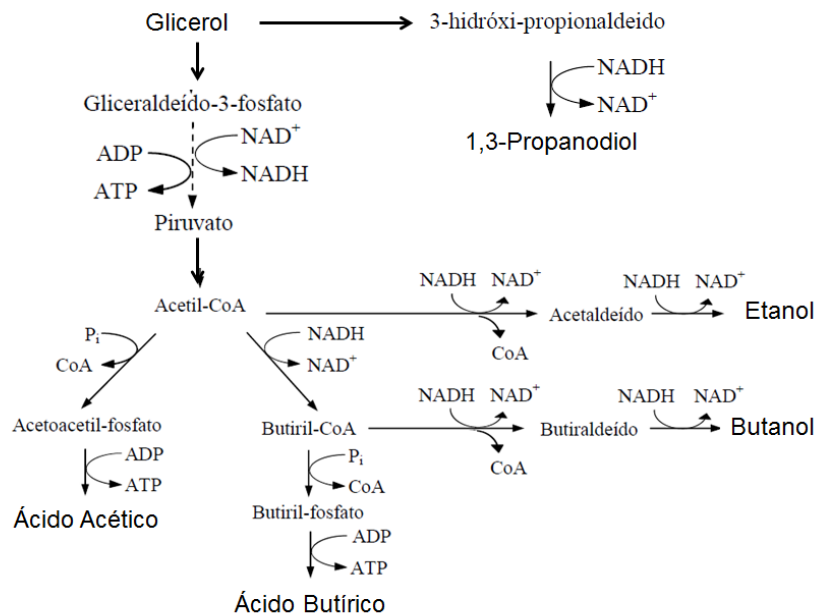
Na Figura 22 estão apresentadas as concentrações dos metabólitos presentes no meio fermentativo ao longo do estudo de cinética da produção de hidrogênio. Neste gráfico observa-se que em 8h todo o glicerol foi consumido, enquanto que a concentração de 1,3 propanodiol aumenta até esse tempo e depois permanece constante em 0,14 g L⁻¹. A produção de 1,3propanodiolé proveniente de um desvio da rota metabólica de produção de hidrogênio utilizando o glicerol como substrato. Este desvio é ilustrado Figura 23 (MANGAYIL et al., 2019; ROSSI et al., 2012; SARMA et al., 2019; WISCHRAL et al., 2016).

Figura 22 - Concentração de analitos no meio fermentativo durante a fermentação anaeróbia para produção de Hidrogênio, conduzida por 48 h, a 35°C, empregando 31g_{PESR}L⁻¹.



Fonte: O autor, 2019

Figura 23 - Rota metabólica resumida do glicerol, apresentando o desvio da rota para formação de 1,3 propanodiol.



Fonte: WISCHRAL et al., 2016

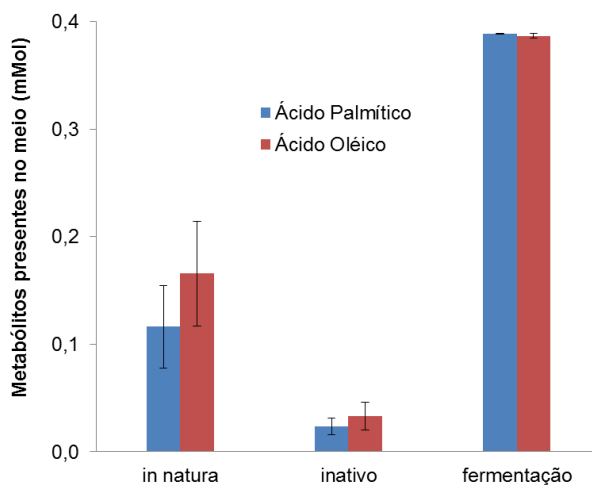
A produção de ácido acético e de ácido butírico aumentou ao longo da fermentação. Além disso, a razão molar de ácido acético/ácido butírico foi maior do que 1, indicando que a fermentação ocorre com preferência pela rota do ácido acético (DE SÁ et al., 2011).

As concentrações de ácido palmítico e de ácido oléico aumentaram até 40h e diminuíram bruscamente em 48h. Isto indica que ao longo da fermentação ocorre a liberação e consumo destes ácidos graxos. Uma hipótese para esse perfil da concentração dos ácidos oléico e palmítico seria sua possível dessorção do PESR e/ou pela produção desses ácidos por hidrólise enzimática dos triglicerídeos adsorvidos no PESR. As lipases responsáveis pela hidrólise enzimática dos triglicerídeos poderiam ainda estar ativas no PESR ou serem produzidas pelos microrganismos do lodo empregado como inóculo.

Para avaliar essas possibilidades, dois testes foram conduzidos. No primeiro, o PESR foi previamente aquecido em estufa 105°C por 2h, visando inativar as enzimas ainda ativas nesse resíduo (PESR inativo), e não foi adicionado lodo ao meio reacional, que continha 31g PESR L⁻¹. Esse experimento foi o que apresentou a menor concentração dos ácidos oléico e palmítico (Figura 24). Provavelmente ocorreu a dessorção desses ácidos do PESR, que passaram para o meio líquido. No segundo experimento, denominado *in natura*, o PESR não

passou por nenhum pré-tratamento e não foi adicionado lodo ao meio ($31\text{g}_{\text{PESR}}\text{L}^{-1}$), sendo observado um aumento na concentração de ácidos graxos de aproximadamente 80% em relação ao experimento conduzido com o PESR inativo. Esse aumento, provavelmente, foi devido à ação das lipases não inativadas presentes no PESR, que hidrolisaram os triglicerídeos adsorvidos no PESR, liberando ácidos graxos. Comparando o experimento *in natura* com os resultados da fermentação (conduzida com $31\text{g}_{\text{PESR}}\text{L}^{-1}$, na presença de inóculo) após 24 h, observa-se um aumento de 70% para o ácido palmítico e de 57% para o ácido oléico. Esse aumento ocorre mesmo com consumo dos mesmos, indicando que a ação dos microrganismos presentes no lodo anaeróbico também contribui para a liberação deste ácido no meio.

Figura 24 - Influência da atividade catalítica do PESR na liberação de ácidos palmítico e oléico ao longo de 24h a 35°C. Inativo: experimento realizado com o PESR (31g PESR L⁻¹) previamente inativado (105 °C por 2h) na ausência de lodo PTT. In natura: experimento realizado com o PESR (31g PESR L⁻¹) na ausência de lodo PTT. Fermentação: experimento realizado com o PESR (31g PESR L⁻¹) na presença de lodo PTT.



Fonte: O autor, 2019

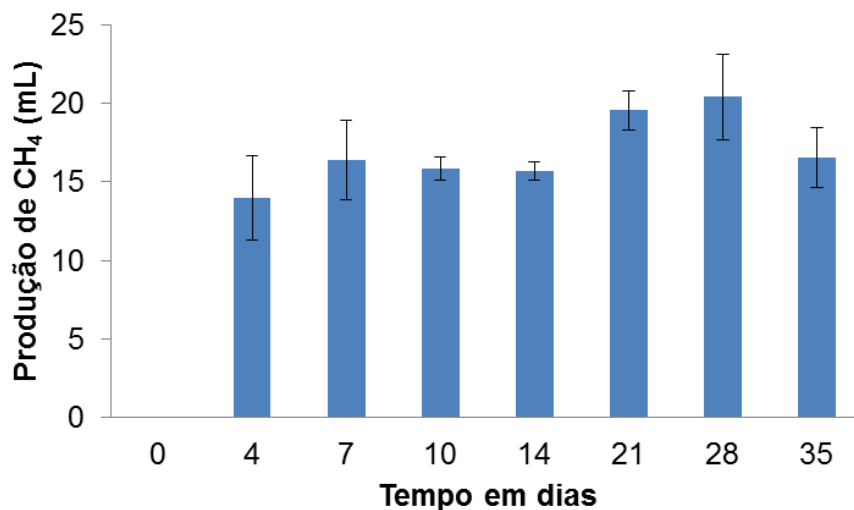
5.3 Produção de metano

5.3.1 Produção de metano em um estágio

A produção de metano por digestão anaeróbia em um estágio foi estudada empregando a mesma carga orgânica (31g PESR L⁻¹) e temperatura (35°C) da produção de hidrogênio, com a diferença do pH inicial 7,0). Os resultados obtidos ao longo de 35 dias

estão apresentados na Figura 25. Neste gráfico é possível observar que a produção de metano alcança o maior valor em 28 dias.

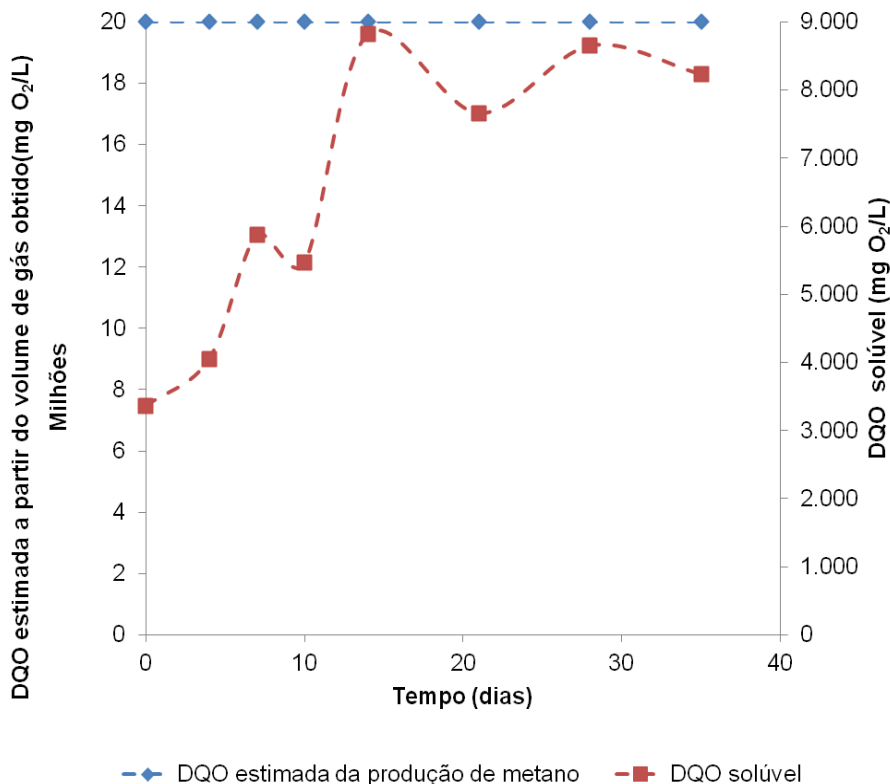
Figura 25 - Produção de metano por fermentação anaeróbia em processo de um estágio ao longo de 35 dias, a 35°C, empregando 31g PESRL⁻¹.



Fonte: O autor, 2019

A Figura 26 ilustra o gráfico com as medidas de DQO estimada a partir do volume de metano obtido e solúvel da digestão anaeróbia ao longo dos 35 dias. A DQO solúvel foi determinada na amostra líquida do meio fermentativo. De acordo com os resultados apresentados na Figura 26, observa-se que a DQO solúvel aumenta durante os 35 dias, indicando que, ao longo da digestão, parte da matéria orgânica está se tornando mais disponível aos microrganismos. A DQO estimada a partir do volume de metano obtido foi calculada considerando o volume de metano gerado, sabendo-se que para cada 1 mL de metano gerado, 350 g O₂L⁻¹ são consumidos (DAI et al., 2016). Verifica-se, então, de acordo com os resultados da Figura 26 uma DQO estimada a partir do volume de metano obtido baixa (47,3 ml O₂ L⁻¹), devido à pequena produção de metano. Esse cálculo só considera a porcentagem de carbono consumido pela produção de metano, não contabilizando a porcentagem da produção de gás carbônico.

Figura 26 - Variação da DQO estimada da produção de metano e DQO solúvel na produção de metano em processo de um estágio, conduzido por 35 dias, a 35°C, empregando $31\text{g}_{\text{PESR}}\text{L}^{-1}$, pH inicial 7,0.

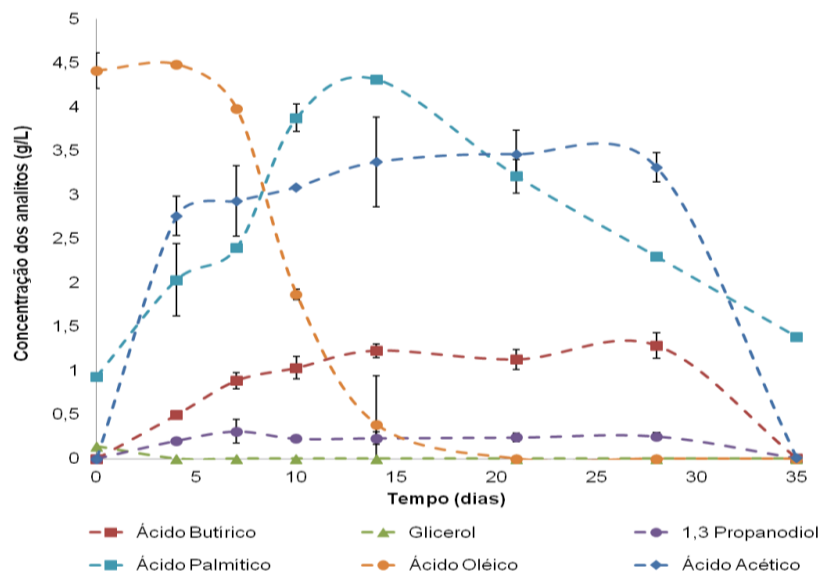


Fonte: O autor, 2019

A concentração de alguns metabólitos e componentes presentes no PESR foram determinadas na digestão anaeróbia ao longo de 35 dias e seus resultados apresentados na Figura 27. Neste gráfico pode-se observar que a produção de ácido acético aumentou até o décimo dia e, após esse tempo, este ácido foi consumido totalmente, verifica-se que o glicerol foi totalmente consumido em 4 dias. O 1,3-propanediol se mantém constante até 28 dias e em 35 dias diminui, indicando seu consumo pelo consórcio microbiano. A taxa de produção do ácido butírico é maior que a de consumo até 28 dias, e em 35 dias o ácido butírico é todo consumido. A concentração de ácido oléico aumenta até o tempo de 4 dias, e depois diminui até que em 21 dias é todo consumido, indicando sua transferência do PESR para o meio

fermentativo, seguida pelo seu consumo pelos microrganismos. Comparando as concentrações de ácido oléico e palmítico, observa-se o ácido oléico é preferencialmente consumido em relação ao palmítico pelos microrganismos presentes no lodo.

Figura 27 - Concentração de analitos no meio fermentativo durante a digestão anaeróbia para produção de metano em processo de um estágio, conduzida por 35 dias, a 35°C, empregando 31g PESRL⁻¹, pH inicial 7,0.



Fonte: O autor, 2019

5.3.2 Produção de metano em processo sequencial de dois estágios

Considerando o baixo rendimento em metano e a pequena redução na DQO estimada através do volume de gás obtido durante a produção de metano de um estágio, decidiu-se investigar a produção de hidrogênio e de metano em um processo sequencial. Além disso, ao final da fermentação para produção de hidrogênio, a carga orgânica no efluente ainda é elevada para descarte no meio ambiente. Assim, a produção de metano em processo de dois

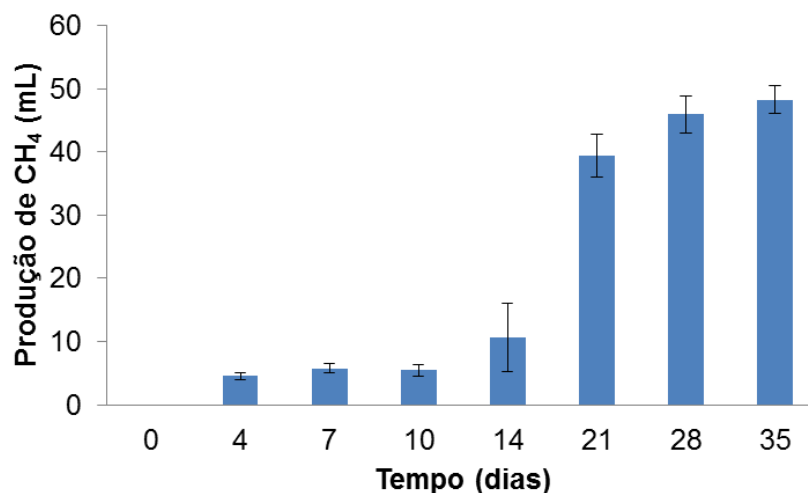
estágios poderia diminuir a carga orgânica do efluente e permitir a produção de outro vetor energético em um intervalo de tempo menor.

Como pode ser observado pelos resultados apresentados na Figura 28 a produção de metano em dois estágios foi melhor que a produção de metano em processo de um estágio. A quantidade de metano obtida aumentou significativamente com o tempo até 21 dias e, então, manteve um aumento em uma taxa menor até os 35 dias avaliados. O volume máximo de metano produzido após 35 dias foi 48,2 mL, enquanto que no processo de um estágio foi de apenas 16,6 mL. Alguns fatores que podem ter influenciado essa variação na produção de metano: a carga orgânica inicial e o estágio de produção de hidrogênio.

A relação de DQO:SSV da produção de metano em um estágio foi maior ($2 \times 10^7:1$) do que a empregada em processo de dois estágios (2:1). Isso porque a produção em um estágio utilizou a mesma proporção da produção de hidrogênio ($30 \text{g}_{\text{PESR}} \text{L}^{-1}$), enquanto que na produção de metano em dois estágios foi usada uma relação de 2:1 de DQO:SSV. Essa diferença pode ter levado a um efeito de inibição pelo substrato (GORGEC; KARAPINAR, 2019).

Outro fator que pode justificar o aumento na produção de metano no processo de dois estágios é que ele foi conduzido nas condições ótimas para a produção de hidrogênio (pH 5,5 e Lodo PTT), que favorecem a geração de ácido acético e ácido butírico por exemplo. Já a produção de metano em um estágio foi conduzida nas condições ótimas das arqueias metanogênicas (pH 7,0 e Lodo SPT), que são a última etapa presente no consórcio microbiano (Figura 2).

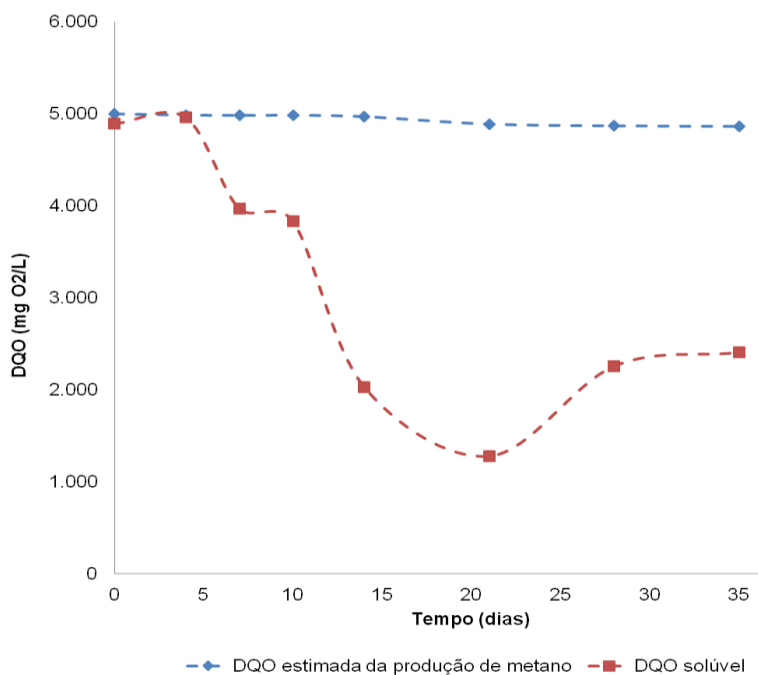
Figura 28 - Produção de metano por fermentação anaeróbia em processo de dois estágios ao longo de 35 dias, a 35°C, empregando 31g PESRL⁻¹epH inicial 7,0.



Fonte: O autor, 2019

A Figura 29 apresenta o gráfico da DQO estimada a partir do volume de metano obtido e DQO solúvel ao longo do tempo na produção de metano em processo sequencial de dois estágios. Neste gráfico observa-se que a DQO estimada a partir do volume de gás obtido foi 3 vezes maior que a da produção de metano em processo de um estágio. Além disso, observa-se também que a DQO solúvel reduziu ao longo do tempo. O valor de DQO da fração solúvel na produção de metano em processo sequencial de dois estágios é similar ao valor da DQO total (fração solúvel + fração sólida), devido ao fato do ELPH (efluente da produção de hidrogênio por fermentação anaeróbia) utilizado na produção de metano em processo sequencial de dois estágios ser praticamente constituído de uma fase líquida, em que a fase sólida já havia sido previamente degradada. Com isso, a redução do valor da DQO experimental da produção de metano em dois estágios foi de aproximadamente 51%.

Figura 29 - Variação da DQO estimada a partir do volume de metano obtido e DQO solúvel na produção de metano em processo de dois estágios, conduzido por 35 dias, a 35°C, empregando 31g PESR L⁻¹ e pH inicial 7,0.



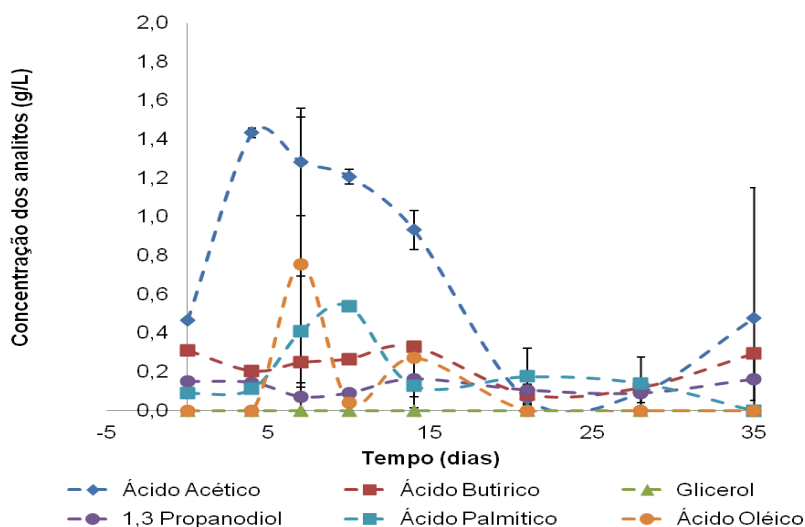
Fonte: O autor, 2019

A variação na concentração de alguns analitos durante a produção de metano em processo sequencial de dois estágios está ilustrada na Figura 30. Neste gráfico observa-se que a taxa de formação do ácido acético é bem maior que a taxa de consumo nos primeiros 4 dias de fermentação, quando, então, ela passa a diminuir até 21 dias, e o ácido acético é praticamente todo consumido. Após esse tempo, a taxa de produção volta a ser maior que a de consumo.

A Figura 31 representa o mesmo gráfico da Figura 30 sem o perfil de produção/consumo do ácido acético, para melhor observação da concentração dos outros analitos. Neste gráfico observa-se que não há glicerol no meio no início da produção de metano, mas que provavelmente há liberação de glicerol ao longo do processo. Isto ocorre devido ao 1,3 propanediol aumentar entre 4 e 14 dias. O ácido oleico foi consumido mais

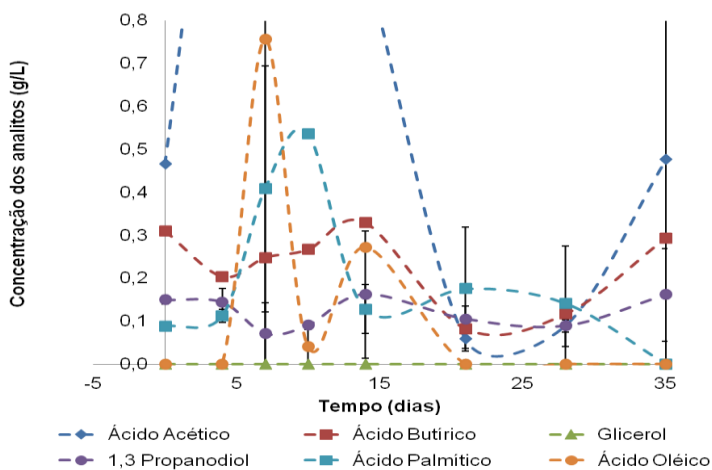
rápido do que o ácido palmítico, que só foi completamente consumido em 35 dias. O ácido butírico apresentou o perfil de consumo e produção ao longo dos 35 dias.

Figura 30 - Concentração de analitos no meio durante a produção de metano em processo de dois estágios, conduzido por 35 dias, conduzida por 35 dias, a 35°C, empregando 31g PESR L⁻¹ e, pH inicial 7,0.



Fonte: O autor, 2019

Figura 31 - Concentração de analitos no meio fermentativo durante a produção de metano em processo de dois estágios, conduzido por 35 dias, a 35°C, empregando 31g PESR L⁻¹, pH inicial 7,0.



Fonte: O autor, 2019

CONCLUSÕES

- ✓ É possível produzir hidrogênio via fermentação utilizando o biocatalisador residual da produção de biodiesel (PESR) como fonte de carbono e lodo da estação de tratamento de esgotos como inóculo;
- ✓ O pré-tratamento térmico do lodo anaeróbio favorece a produção de hidrogênio. Quando o lodo foi aquecido a 65°C por 30 minutos antes de ser adicionado ao meio fermentativo, a produção de hidrogênio aumentou 95%;
- ✓ O aumento da concentração de PESR aumentou a produção de hidrogênio até a concentração de 31g PESR L⁻¹. Nesta condição, o rendimento em hidrogênio foi 172 ± 32 mLH₂L⁻¹g_{PESR}⁻¹após 24h;
- ✓ É possível produzir metano a partir do efluente da produção de hidrogênio com maior rendimento.
- ✓ O processo sequencial de dois estágios para produção de hidrogênio e metano permitiu um rendimento de 214 ± 1 mLCH₄/gDQO;
- ✓ A redução de DQO do meio na produção de metano em dois estágios foi de cerca de 51%;
- ✓ A produção de metano em dois estágios apresentou uma eficiência de 61% comparado com o potencial teórico de rendimento de metano por DQO;
- ✓ O processo sequencial de dois estágios resultou em um rendimento de 172 ± 32 mLH₂/L/g_{PESRE} 214 ± 1 mLCH₄/gDQO na produção de hidrogênio e metano respectivamente. O que permitiu a redução de DQO do meio de cerca de 51%. Desta forma, diminuindo a carga orgânica desse resíduo, que seria descartado no meio ambiente após a produção enzimática de biodiesel, e permitindo a obtenção de dois vetores energéticos, hidrogênio e metano, através de tecnologia limpa;
- ✓ O PESR é um resíduo com potencial para a produção de hidrogênio e de metano em processo sequencial.

Sugestões para trabalhos futuros

- Identificar a rota de preferencial de consumo dos ácidos graxos do PESR pelos organismos do lodo anaeróbio de Estação de Tratamento de Esgoto (ETE);
- Estudar a influência da pressão interna do reator no consumo de hidrogênio pelas bactérias homoacetogênicas;
- Estudar a influência da pressão parcial de hidrogênio no consumo de hidrogênio pelas bactérias homoacetogênicas;
- Analisar a população microbiana do inóculo visando identificar os principais gêneros;
- Avaliar a produção de metano em um estágio com uma carga de matéria orgânica menor;
- Avaliar o ciclo de vida dos biocombustíveis.

REFERÊNCIAS

- ADAV, S. S. et al. Functional consortium for hydrogen production from cellobiose: Concentration-to-extinction approach. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 9, p. 2546–2550, 2009.
- AGUIEIRAS, E. C. G. et al. Biodiesel production from *Acrocomia aculeata* acid oil by (enzyme/enzyme) hydroesterification process: Use of vegetable lipase and fermented solid as low-cost biocatalysts. **Fuel**, v. 135, p. 315–321, 2014.
- AGUIEIRAS, E. C. G. et al. Influence of the raw material on the final properties of biodiesel produced using lipase from *Rhizomucor miehei* grown on babassu cake as biocatalyst of esterification reactions. **Renewable Energy**, v. 113, p. 112–118, 2017a.
- AGUIEIRAS, E. C. G. et al. Simultaneous Enzymatic Transesterification and Esterification of an Acid Oil Using Fermented Solid as Biocatalyst. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 94, n. 4, p. 551–558, 2017b.
- AGUIEIRAS, E. C. G. et al. Production of lipases in cottonseed meal and application of the fermented solid as biocatalyst in esterification and transesterification reactions. **Renewable Energy**, v. 130, p. 574–581, 2019a.
- AGUIEIRAS, E. C. G. et al. Production of lipases in cottonseed meal and application of the fermented solid as biocatalyst in esterification and transesterification reactions. **Renewable Energy**, v. 130, p. 574–581, jan. 2019b.
- AGUIEIRAS, E. C. G.; SOUZA, S. L.; LANGONE, M. A. P. Estudo do comportamento da lipase comercial lipozyme rm im em reações de esterificação para obtenção de biodiesel. **Química Nova**, v. 36, n. 5, p. 646–650, 2013.
- AKOBI, C. et al. Single-stage and two-stage anaerobic digestion of extruded lignocellulosic biomass. **Applied Energy**, v. 184, p. 548–559, 2016.
- ALTAŞ, L. Inhibitory effect of heavy metals on methane-producing anaerobic granular sludge. **Journal of Hazardous Materials**, v. 162, n. 2–3, p. 1551–1556, 2009.
- AMY TIKKANEN. **Clostridium**. Disponível em: <<https://www.britannica.com/science/Clostridium>>. Acesso em: 18 abr. 2019.
- ARGUN, H. et al. Biohydrogen production by dark fermentation of wheat powder solution: Effects of C/N and C/P ratio on hydrogen yield and formation rate. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 7, p. 1813–1819, 2008.
- 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, n. 20, p. 8543–8548, 2009.
- BAGHCHEHSARAEI, B. et al. Fermentative hydrogen production by diverse microflora. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, n. 10, p. 5021–5027, 2010.

- BALAT, M. et al. Main routes for the thermo-conversion of biomass into fuels and chemicals. Part 2: Gasification systems. **Energy Conversion and Management**, v. 50, n. 12, p. 3158–3168, 2009.
- BALDI, F.; PECORINI, I.; IANNELLI, R. Comparison of single-stage and two-stage anaerobic co-digestion of food waste and activated sludge for hydrogen and methane production. **Renewable Energy**, v. 143, p. 1755–1765, 2019.
- BARMAN, N. S.; GHOSH, S.; DE, S. Gasification of biomass in a fixed bed downdraft gasifier - A realistic model including tar. **Bioresource Technology**, v. 107, p. 505–511, 2012.
- BASAK, B. et al. Process kinetic studies of biohydrogen production by co-fermentation of fruit-vegetable wastes and cottage cheese whey. **Energy for Sustainable Development**, v. 47, p. 39–52, 2018.
- BUNDHOO, M. A. Z.; MOHEE, R.; HASSAN, M. A. Effects of pre-treatment technologies on dark fermentative biohydrogen production: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 157, p. 20–48, 2015.
- CHANG, A. C. C. et al. Biomass gasification for hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 21, p. 14252–14260, 2011.
- CHANG, S.; LI, J. Z.; LIU, F. Evaluation of different pretreatment methods for preparing hydrogen-producing seed inocula from waste activated sludge. **Renewable Energy**, v. 36, n. 5, p. 1517–1522, 2011.
- CHONG, M. L. et al. Biohydrogen production from biomass and industrial wastes by dark fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 8, p. 3277–3287, 2009.
- DAI, X. et al. Simultaneous enhancement of methane production and methane content in biogas from waste activated sludge and perennial ryegrass anaerobic co-digestion: The effects of pH and C/N ratio. **Bioresource Technology**, v. 216, p. 323–330, 2016.
- DE HOON, M. J. L.; EICHENBERGER, P.; VITKUP, D. Hierarchical evolution of the bacterial sporulation network. **Current Biology**, v. 20, n. 17, p. 1–7, 2010.
- DE SÁ, L. R. V. et al. Simultaneous analysis of carbohydrates and volatile fatty acids by HPLC for monitoring fermentative biohydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 23, p. 15177–15186, 2011.
- DENG, C. et al. Can acid pre-treatment enhance biohydrogen and biomethane production from grass silage in single-stage and two-stage fermentation processes ? **Energy Conversion and Management**, v. 195, n. May, p. 738–747, 2019.
- DEPARTMENT FOR ECONOMIC AND SOCIAL INFORMATION AND POLICY ANALYSES, S. D. **SeriesF_67E.pdf**, 1997.
- DHYANI, V.; BHASKAR, T. A comprehensive review on the pyrolysis of lignocellulosic biomass. **Renewable Energy**, v. 129, p. 695–716, 2018.

DINESH, G. K.; CHAUHAN, R.; CHAKMA, S. Influence and strategies for enhanced biohydrogen production from food waste. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 92, n. May 2017, p. 807–822, 2018.

DUMAN, G. et al. Sustainable hydrogen production options from food wastes. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 43, n. 23, p. 10595–10604, 2018.

ELBESHBIHY, E. et al. A critical review on inhibition of dark biohydrogen fermentation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 79, n. October 2015, p. 656–668, 2017.

ENGLIMAN, N. S. et al. Influence of iron (II) oxide nanoparticle on biohydrogen production in thermophilic mixed fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 45, p. 27482–27493, 2017.

ESCAMILLA-ALVARADO, C. et al. Energy analysis of in-series biohydrogen and methane production from organic wastes. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 29, p. 16587–16594, 2014.

FABER, M. DE O.; FERREIRA-LEITÃO, V. S. Optimization of biohydrogen yield produced by bacterial consortia using residual glycerin from biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 219, p. 365–370, 2016.

FERREIRA-LEITÃO, V. et al. The Protagonism of Biocatalysis in Green Chemistry and Its Environmental Benefits. **Catalysts**, v. 7, n. 12, p. 9, 2017.

FREIRE, D. M. G. et al. Efficient biohydrogen production via dark fermentation from hydrolyzed palm oil mill effluent by non-commercial enzyme preparation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 49, p. 29166–29174, 2017.

FU, S. F. et al. Hydrogen and methane production from vinasse using two-stage anaerobic digestion. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 107, n. 189, p. 81–86, 2017.

GARRITANO, A. N. et al. Palm oil mill effluent (POME) as raw material for biohydrogen and methane production via dark fermentation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 92, n. April, p. 676–684, 2018.

GORGEK, F. K.; KARAPINAR, I. Production of biohydrogen from waste wheat in continuously operated UPBR : The effect of influent substrate concentration. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, n. 32, p. 17323–17333, 2019.

HALLENBECK, P. C.; BENEMANN, J. R. Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 27, n. 11–12, p. 1185–1193, nov. 2002.

HAWKES, F. R. et al. Sustainable fermentative hydrogen production: Challenges for process optimisation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 27, n. 11–12, p. 1339–1347, 2002.

JUNG, F.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G. Impact of enzymatic pre-hydrolysis on batch activated sludge systems dealing with oily wastewaters. **Biotechnology Letters**, v.

24, n. 21, p. 1797–1802, 2002.

KARAOSMANOGLU GORGEÇ, F.; KARAPINAR, I. Production of biohydrogen from waste wheat in continuously operated UPBR: The effect of influent substrate concentration. **International Journal of Hydrogen Energy**, n. xxxx, 2019.

KHAN, M. A. et al. Optimization of process parameters for production of volatile fatty acid, biohydrogen and methane from anaerobic digestion. **Bioresource Technology**, v. 219, p. 738–748, 2016.

KHAN, M. A. et al. Biohydrogen production from anaerobic digestion and its potential as renewable energy. **Renewable Energy**, v. 129, p. 754–768, 2018.

KRISHNAN, S. et al. Process enhancement of hydrogen and methane production from palm oil mill effluent using two-stage thermophilic and mesophilic fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 30, p. 12888–12898, 2016.

KUMNEADKLANG, S.; O-THONG, S.; LARPKIATTAWORN, S. Characterization of cellulose fiber isolated from oil palm frond biomass. **Materials Today: Proceedings**, v. 17, p. 1995–2001, 2019.

LAKSHMIDEVI, R.; MUTHUKUMAR, K. Enzymatic saccharification and fermentation of paper and pulp industry effluent for biohydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, n. 8, p. 3389–3400, 2010.

LAY, C. H. et al. Anaerobic hydrogen and methane production from low-strength beverage wastewater. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, n. 28, p. 14351–14361, 2019.

LEE, D. J.; SHOW, K. Y.; SU, A. Dark fermentation on biohydrogen production: Pure culture. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 18, p. 8393–8402, 2011.

LEE, H. S. et al. An electron-flow model can predict complex redox reactions in mixed-culture fermentative BioH₂: Microbial ecology evidence. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 104, n. 4, p. 687–697, 2009.

LEE, M. J. et al. Sodium (Na⁺) concentration effects on metabolic pathway and estimation of ATP use in dark fermentation hydrogen production through stoichiometric analysis. **Journal of Environmental Management**, v. 108, p. 22–26, 2012a.

LEE, M. J. et al. Sodium (Na⁺) concentration effects on metabolic pathway and estimation of ATP use in dark fermentation hydrogen production through stoichiometric analysis. **Journal of Environmental Management**, v. 108, p. 22–26, 2012b.

LENARDÃO, E. J. et al. “Green chemistry” - Os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 123–129, 2003.

LIN, C.; SHEI, S.-H. Heavy metal effects on fermentative hydrogen production using natural mixed microflora. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 2, p. 587–593, 2007.

LIU, H. et al. Enrichment of the hydrogen-producing microbial community from marine intertidal sludge by different pretreatment methods. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 24, p. 9696–9701, 2009.

LIU, Y. et al. Biodiesel synthesis directly catalyzed by the fermented solid of Burkholderia cenocepacia via solid state fermentation. **Fuel Processing Technology**, v. 106, p. 303–309, 2013.

ŁUKAJTIS, R. et al. Hydrogen production from biomass using dark fermentation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 91, n. April 2017, p. 665–694, 2018.

MAINTINGUER, S. I. et al. Fermentative hydrogen production with xylose by Clostridium and Klebsiella species in anaerobic batch reactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 21, p. 13508–13517, 2011.

MANGAYIL, R. et al. Co-production of 1,3 propanediol and long-chain alkyl esters from crude glycerol. **New Biotechnology**, v. 53, n. July, p. 81–89, 2019.

MASSANET-NICOLAU, J. et al. Utilising biohydrogen to increase methane production, energy yields and process efficiency via two stage anaerobic digestion of grass. **Bioresource Technology**, v. 189, p. 379–383, 2015.

MATHEWS, J.; WANG, G. Metabolic pathway engineering for enhanced biohydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 17, p. 7404–7416, 2009.

MESSIAS, J. M. et al. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 32, n. 2, p. 213–234, 2011.

MIDILLI, A. et al. On hydrogen and hydrogen energy strategies. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 9, n. 3, p. 255–271, 2004.

MOHAMMADI, P. et al. Effects of different pretreatment methods on anaerobic mixed microflora for hydrogen production and COD reduction from palm oil mill effluent. **Journal of Cleaner Production**, v. 19, n. 14, p. 1654–1658, 2011.

MOLINER, R.; LÁZARO, M. J.; SUELVES, I. Analysis of the strategies for bridging the gap towards the Hydrogen Economy. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 43, p. 19500–19508, 2016.

MONLAU, F. et al. Do furanic and phenolic compounds of lignocellulosic and algae biomass hydrolyzate inhibit anaerobic mixed cultures? A comprehensive review. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 5, p. 934–951, 2014.

MONTEIRO, A. F. et al. High concentration and yield production of mannose from açai (Euterpe oleracea Mart.) seeds via mannanase-catalyzed hydrolysis. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 10939, 29 dez. 2019.

O-THONG, S.; PRASERTSAN, P.; BIRKELAND, N. K. Evaluation of methods for preparing hydrogen-producing seed inocula under thermophilic condition by process performance and microbial community analysis. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 2, p.

909–918, 2009.

PHUMMALA, K. et al. Delignification of disposable wooden chopsticks waste for fermentative hydrogen production by an enriched culture from a hot spring. **Journal of Environmental Sciences (China)**, v. 26, n. 6, p. 1361–1368, 2014.

PITWELL, L. R. (1997). Standard Methods. In Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater-5220 CHEMICAL OXYGEN DEMAND (COD) (pp. 5–13). <https://doi.org/10.2105/SMWW.2882.103>

PRABAKAR, D. et al. Advanced biohydrogen production using pretreated industrial waste: Outlook and prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 96, n. August 2017, p. 306–324, 2018.

PROFETI, L. P. R.; TICIANELLI, E. A.; ASSAF, E. M. Production of hydrogen via steam reforming of biofuels on Ni/CeO₂-Al₂O₃ catalysts promoted by noble metals. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 12, p. 5049–5060, 2009.

RABELO, S. C. et al. Bioresource Technology Production of bioethanol , methane and heat from sugarcane bagasse in a biorefinery concept. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 17, p. 7887–7895, 2011.

REDAÇÃO AUTOESPORTE. **Bombando na web**. Disponível em: <<https://revistaautoesporte.globo.com/Noticias/noticia/2017/05/toyota-nissan-e-honda-se-unem-por-carros-hidrogenio.html>>. Acesso em: 13 maio. 2019.

RIBEIRO VASCONCELOS DE SÁ, L. et al. Fermentative biohydrogen production using hemicellulose fractions: Analytical validation for C5 and C6-sugars, acids and inhibitors by HPLC. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, n. 40, p. 13888–13900, 2015.

ROCHA, G. J. M. et al. Steam explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 35, n. 1, p. 274–279, 2012.

RODRIGUES, C. V. et al. Crude glycerol by transesterification process from used cooking oils: Characterization and potentialities on hydrogen bioproduction. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 33, p. 14641–14651, 2016.

ROSSI, D. M. et al. Bioconversion of residual glycerol from biodiesel synthesis into 1,3-propanediol and ethanol by isolated bacteria from environmental consortia. **Renewable Energy**, v. 39, n. 1, p. 223–227, 2012.

SÁ, L. R. V DE. et al. Pentoses, hexoses and glycerin as substrates for biohydrogen production: An approach for Brazilian biofuel integration. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 7, p. 2986–2997, 2013.

SÁ, L. R. V. DE; CAMMAROTA, M. C.; FERREIRA-LEITÃO, V. S. Hydrogen production by anaerobic fermentation - general aspects and possibility of using brazilian agro-industrial wastes. **Química Nova**, v. 37, n. 5, p. 857–867, 2014.

SABESP. **Norma Técnica Interna SABESP NTS 004 DQO-Demanda Química de Oxigênio**. 1997.

SANT'ANNA, R. **Convivemos por três dias com o Toyota Mirai , o primeiro carro de série movido a hidrogênio**. Disponível em: <<https://oglobo.globo.com/economia/carros/convivemos-por-tres-dias-com-toyota-mirai-primeiro-carro-de-serie-movido-hidrogenio-22688055>>. Acesso em: 8 jan. 2019.

SARMA, S. et al. Homologous overexpression of hydrogenase and glycerol dehydrogenase in *Clostridium pasteurianum* to enhance hydrogen production from crude glycerol. **Bioresource Technology**, v. 284, n. March, p. 168–177, 2019.

SERRES, J. D. DA S. et al. A combined sorption and kinetic model for multiphasic ethyl esterification of fatty acids from soybean soapstock acid oil catalyzed by a fermented solid with lipase activity in a solvent-free system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 120, p. 84–92, 2017.

SHI, X.-X. et al. Enhanced bio-hydrogen production from sweet sorghum stalk with alkalization pretreatment by mixed anaerobic cultures. **International Journal of Energy Research**, v. 31, n. August 2007, p. n/a-n/a, 2009.

SILVA, G. et al. Scale-up of biodiesel synthesis in a closed-loop packed-bed bioreactor system using the fermented solid produced by *Burkholderia lata* LTEB11. **Chemical Engineering Journal**, v. 316, p. 341–349, 2017.

SILVA, J. S. et al. Cashew apple bagasse as new feedstock for the hydrogen production using dark fermentation process. **Journal of Biotechnology**, v. 286, n. April, p. 71–78, 2018.

SLUITER, A. et al. **Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass**. n. August, 2012.

SOARES, D. et al. Biodiesel production from soybean soapstock acid oil by hydrolysis in subcritical water followed by lipase-catalyzed esterification using a fermented solid in a packed-bed reactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 15–23, 2013.

SONG, Z. X. et al. Effects of pretreatment method of natural bacteria source on microbial community and bio-hydrogen production by dark fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 7, p. 5631–5636, 2012.

SOUZA, M. S. et al. Biodiesel synthesis via esterification of feedstock with high content of free fatty acids. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 154, n. 1–3, p. 253–267, 2009.

SOVACOL, B. K.; BROSSMANN, B. Symbolic convergence and the hydrogen economy. **Energy Policy**, v. 38, n. 4, p. 1999–2012, 2010.

SRIKANTH, S.; MOHAN, S. V. Regulatory function of divalent cations in controlling the acidogenic biohydrogen production process. **RSC Advances**, v. 2, n. 16, p. 6576–6589, 2012.

TANG, G.-L. et al. Biohydrogen production from cattle wastewater by enriched anaerobic mixed consortia: Influence of fermentation temperature and pH. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 106, n. 1, p. 80–87, 2008.

URBANIEC, K.; BAKKER, R. R. Biomass residues as raw material for dark hydrogen fermentation - A review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, n. 9, p. 3648–3658, 2015.

WANG, H. et al. Effects of sludge pretreatments and organic acids on hydrogen production by anaerobic fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 22, p. 8731–8735, 2010.

WANG, J.; WAN, W. Influence of Ni²⁺ concentration on biohydrogen production. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 18, p. 8864–8868, 2008a.

WANG, J.; WAN, W. Comparison of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing bacteria from digested sludge. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 12, p. 2934–2941, 2008b.

WANG, W. et al. Biohydrogen and methane production by co-digestion of cassava stillage and excess sludge under thermophilic condition. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 4, p. 3833–3839, 2011.

WANG, W. et al. Optimization of biohydrogen and methane recovery within a cassava ethanol wastewater/waste integrated management system. **Bioresource Technology**, v. 120, p. 165–172, 2012.

WANG, X. J. et al. Influence of gaseous end-products inhibition and nutrient limitations on the growth and hydrogen production by hydrogen-producing fermentative bacterial B49. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 32, n. 6, p. 748–754, 2007.

WISCHRAL, D. et al. Production of 1,3-propanediol by *Clostridium beijerinckii* DSM 791 from crude glycerol and corn steep liquor: Process optimization and metabolic engineering. **Bioresource Technology**, v. 212, p. 100–110, 2016.

WONG, Y. M.; WU, T. Y.; JUAN, J. C. A review of sustainable hydrogen production using seed sludge via dark fermentation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 34, p. 471–482, 2014.

WÜNSCHIERS, R.; LINDBLAD, P. Hydrogen in education - A biological approach. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 27, n. 11–12, p. 1131–1140, 2002.

XIANG, L. Y.; MOHAMMED, M. A.; SAMSU BAHARUDDIN, A. Characterisation of microcrystalline cellulose from oil palm fibres for food applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 148, p. 11–20, 2016.

XIAOLONG, H. et al. Effect of Sodium Ion Concentration on Hydrogen Production from Sucrose by Anaerobic Hydrogen-producing Granular Sludge¹. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 14, n. 4, p. 511–517, 2006.

XU, L. et al. Mechanisms of ultraviolet disinfection and chlorination of *Escherichia coli*:

Culturability, membrane permeability, metabolism, and genetic damage. **Journal of Environmental Sciences (China)**, v. 65, p. 356–366, 2018.

YANG, G.; WANG, J. Various additives for improving dark fermentative hydrogen production: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 95, n. April, p. 130–146, nov. 2018.

YU, H. Q. M.; TAY, J. H.; FANG, H. H. P. the Roles of Calcium in Sludge Granulation During Uasb Reactor Start-Up. **Pergamon**, v. 35, n. 4, p. 1052–1060, 2001.

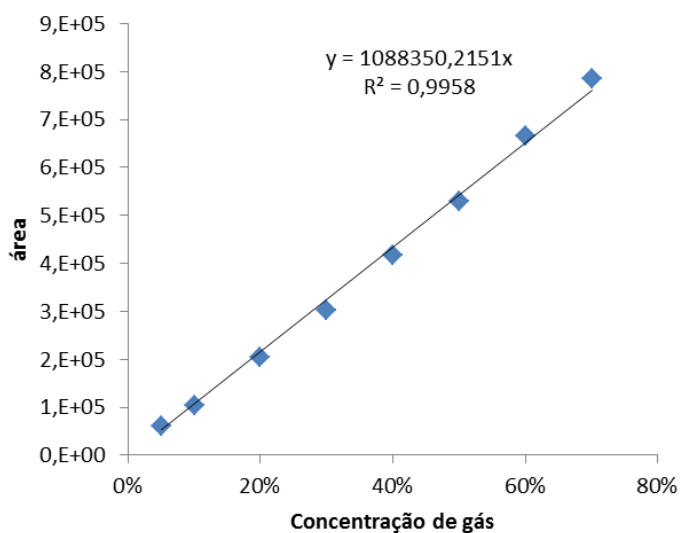
ZHANG, K.; REN, N. Q.; WANG, A. J. Enhanced biohydrogen production from corn stover hydrolyzate by pretreatment of two typical seed sludges. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 27, p. 14653–14662, 2014.

ZHAO, X. et al. Deeply mechanism analysis of hydrogen production enhancement of *Ethanoligenens harbinense* by Fe^{2+} and Mg^{2+} : Monitoring at growth and transcription levels. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 31, p. 19695–19700, 2017.

ZIARA, R. M. M. et al. Lactate wastewater dark fermentation: The effect of temperature and initial pH on biohydrogen production and microbial community. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, n. 2, p. 661–673, 2019.

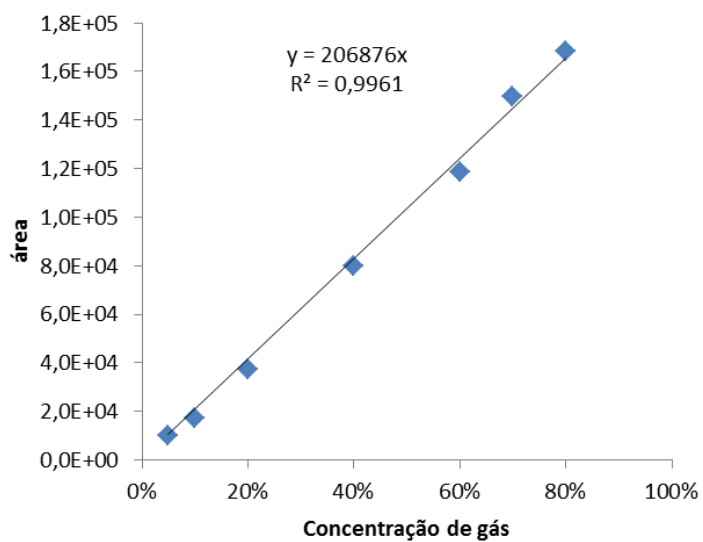
ANEXO A - Curvas analíticas dos gases

Figura 32 - Curva analítica do gás hidrogênio

Curva padrão de Hidrogênio

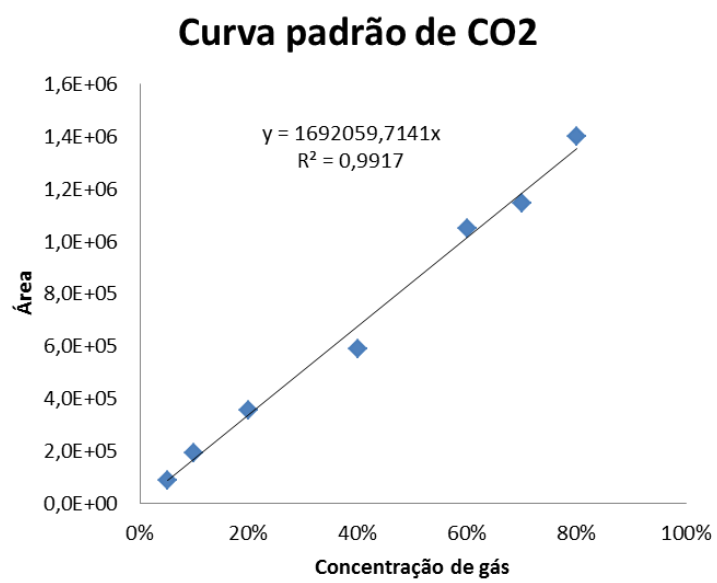
Fonte: O autor, 2019

Figura 33 - Curva analítica do gás metano

Curva padrão de Metano

Fonte: O autor, 2019

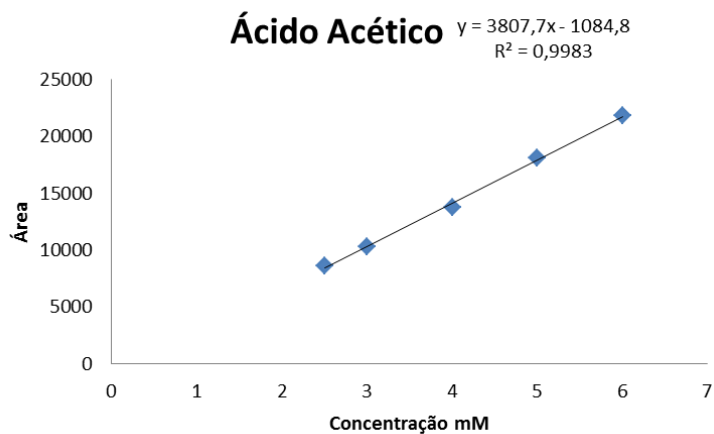
Figura 34 - Curva analítica do gás carbônico



Fonte: O autor, 2019

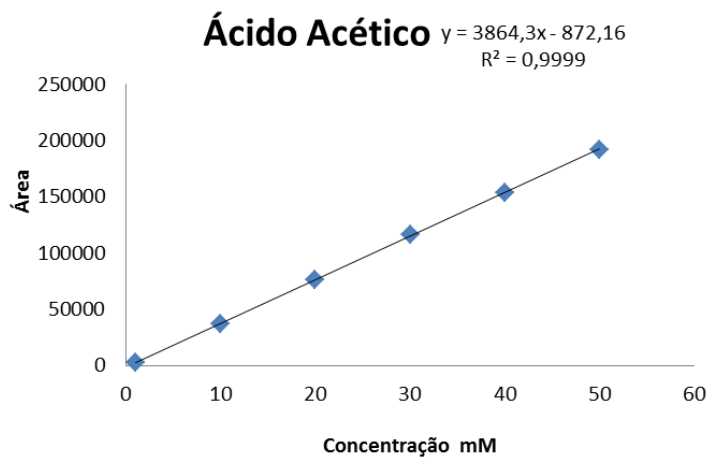
ANEXO B - Curvas analíticas dos ácidos voláteis, glicerol e 1,3 propanodiol

Figura 35 - Curva analítica do ácido acético variando de 2,5mM a 6 mM.



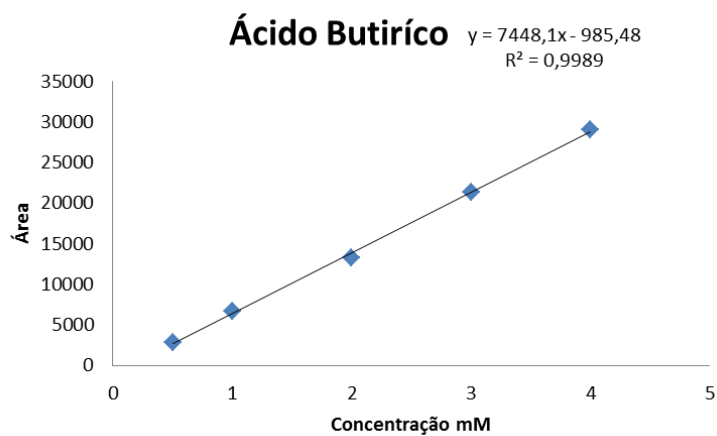
Fonte: O autor, 2019

Figura 36 - Curva analítica do ácido acético variando de 1mM a 50mM.



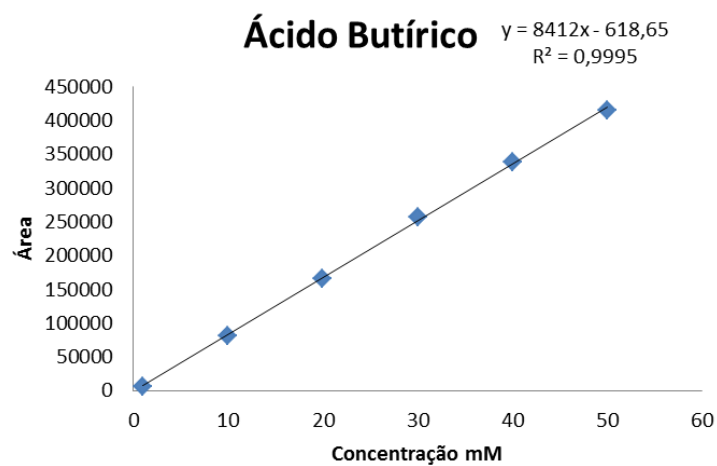
Fonte: O autor, 2019

Figura 37 - Curva analítica do ácido butírico variando de 0,5mM a 4mM.



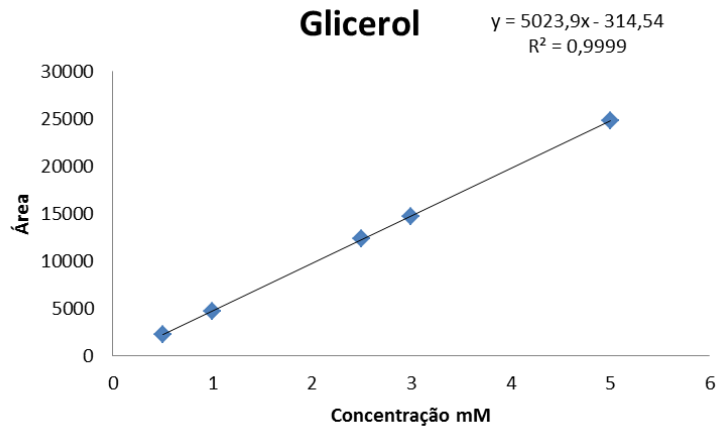
Fonte: O autor, 2019

Figura 38 - Curva analítica do ácido butírico variando de 1mM a 50mM.



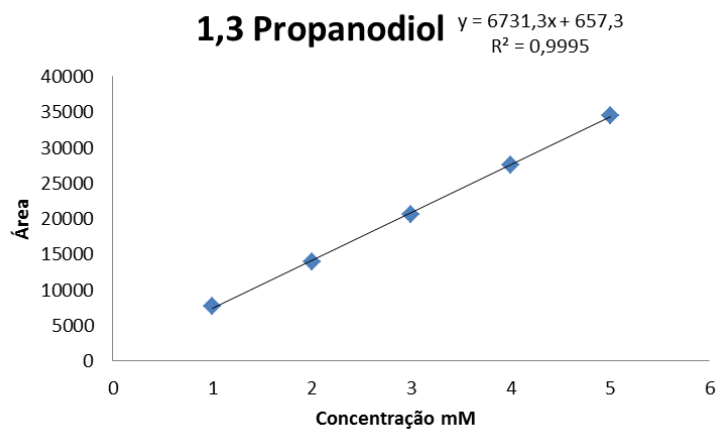
Fonte: O autor, 2019

Figura 39 - Curva analítica do glicerol variando de 0,5mM a 5 mM.



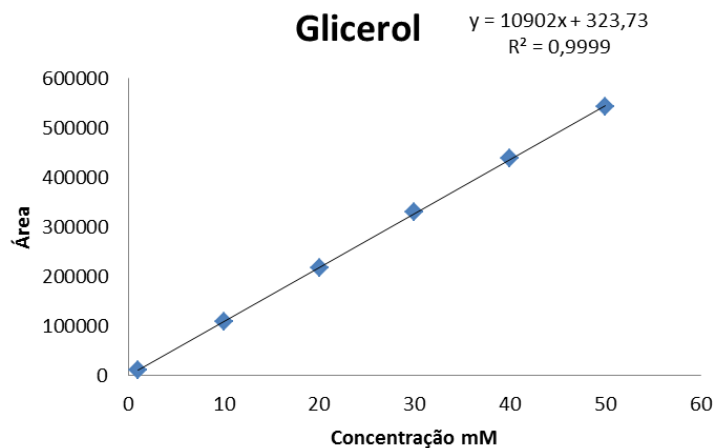
Fonte: O autor, 2019

Figura 40 - Curva analítica do glicerol variando de 1 mM a 50 mM.



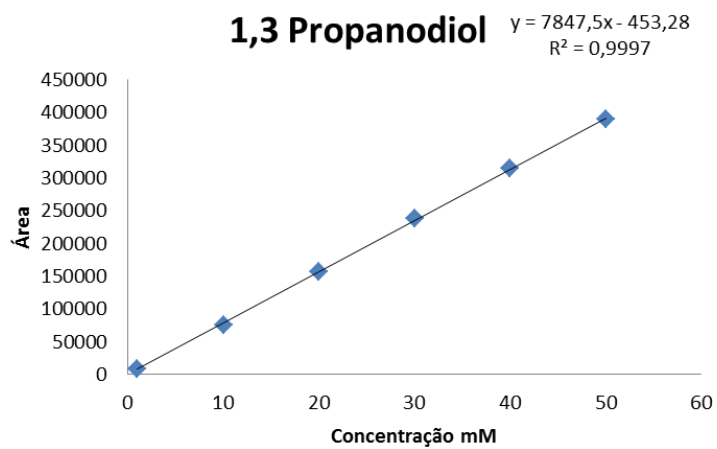
Fonte: O autor, 2019

Figura 41 - Curva analítica do 1,3 propanodiol variando de 1 mM a 5 mM.

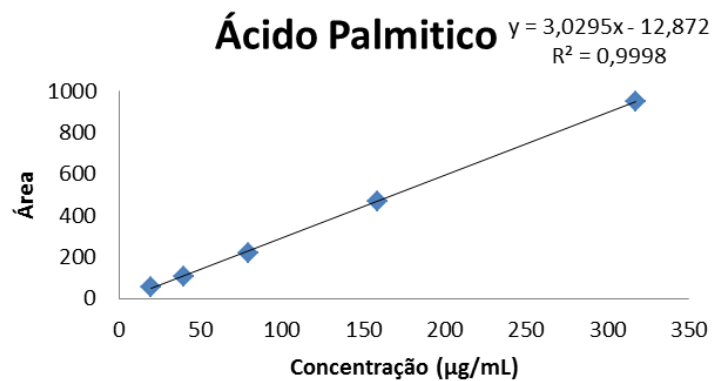


Fonte: O autor, 2019

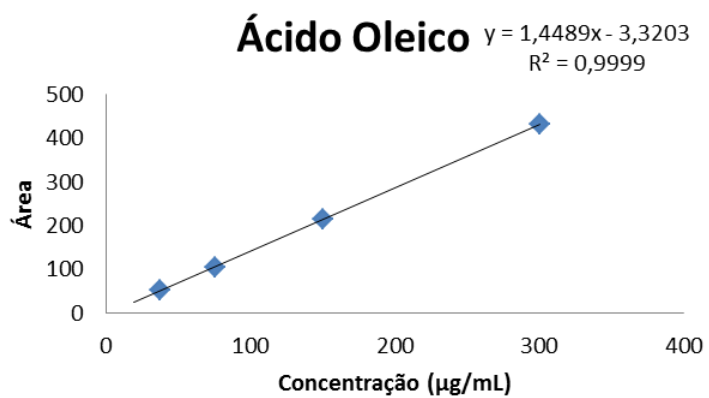
Figura 42 - Curva analítica do 1,3 propanodiol variando de 1 mM a 50 mM.



Fonte: O autor, 2019

ANEXO C - Curvas analíticas dos ácidos graxosFigura 43 - Curva analítica do ácido palmítico variando de 19 $\mu\text{g L}^{-1}$ a 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ 

Fonte: O autor, 2019

Figura 44 - Curva analítica do ácido oléico variando de 46 $\mu\text{g L}^{-1}$ a 370 $\mu\text{g L}^{-1}$ 

Fonte: O autor, 2019